



HAL
open science

RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIEN AN POLLEN AUS BIENENHONIG. I. Vergleich verschiedener Präparationsmethoden

Jost-H. Dustmann, Katharina Bote

► **To cite this version:**

Jost-H. Dustmann, Katharina Bote. RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIEN AN POLLEN AUS BIENENHONIG. I. Vergleich verschiedener Präparationsmethoden. *Apidologie*, 1985, 16 (3), pp.331-340. <hal-00890663>

HAL Id: hal-00890663

<https://hal.science/hal-00890663v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIEN AN POLLEN AUS BIENENHONIG

I. Vergleich verschiedener Präparationsmethoden

Jost-H. DUSTMANN und Katharina BOTE

Nieders. Landesinstitut für Bienenforschung, Wehlstr. 4 a, D-3100 Celle

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Vergleich und Weiterentwicklung verschiedener Präparationstechniken der Raster-Elektronenmikroskopie (REM) werden Wege aufgezeigt, wie man den aus Honig gewonnenen Pollen aufbereitet, um hiermit eine praktikable Anwendung der REM-Technik für die botanische Bestimmung der Honig-Pollenarten (Melissopalynologie) vorzustellen.

EINLEITUNG

Die Identifizierung der im Bienenhonig vorkommenden Pollen (Melissopalynologie) wird mit dem Lichtmikroskop bei einer bis zu 1 000 fachen Vergrößerung durchgeführt (ZANDER, 1935 ; LOUVEAUX, MAURIZIO und VORWOHL, 1978). Dieser Bereich ist ausreichend für den größten Teil der Routineuntersuchungen des Honigs. In einzelnen Fällen ist jedoch lichtmikroskopisch eine Differenzierung von Pollen aufgrund der eingeschränkten Schärfentiefe nicht mehr möglich. Mit Hilfe des Raster-Elektronenmikroskops (REM) können Ultrastrukturen der Exine und arten-, ggf. auch varietätenspezifische Unterschiede in der Morphologie erkannt werden. An Trockenpollen wurden auf diese Weise Ultrastrukturen in zahlreichen Arbeiten zur Pollenmorphologie demonstriert (BURRICHTER *et al.*, 1968 ; SMIT, 1973 ; FOGLE, 1977 ; SCHWERDTFEGER, 1978 ; WEBER, 1981 ; KLUNGNESS und PENG, 1983). Die Bedeutung des REM für die Identifikation von in Honig gequollenen Pollen wurde bereits 1969 von VAN LAERE, LAGASSE und DE METS erkannt. Hier ergeben sich jedoch besondere Schwierigkeiten : der Erhalt guter Ergebnisse hängt in hohem Masse von der Isolation und Präparation der Pollen aus dem Honigsediment, von der Beschaffenheit des Honigs (kristalline Masse, etc.) sowie dem Gehalt an Pollenkitt ab.

Untersuchungen von Pollen aus dem Honigsediment sind entweder ohne spezielle Präparation (VAN LAERE, LAGASSE und DE METS, 1969) oder mit Hilfe der Acetolyse (WEBER, 1982) durchgeführt worden. Da die aufwendige Methode der Acetolyse (ERDTMAN, 1960) mit einem hohen Mass an Beschädigung und Verlust einzelner Pollen verbunden ist, suchten wir in dieser nach einer *einfachen* Methode, die den Pollenkitt und andere störende Substanzen schonend entfernt und damit die Ultrastruktur der Exine gut sichtbar macht, ohne daß der Quellungs-zustand des Pollen verlorengeht.

MATERIAL UND METHODE

Für die Versuchsreihe wurden zwei in der Zusammensetzung unterschiedliche Honige verwendet. Die Unterschiede lagen sowohl in dem Gehalt an kristalliner Masse wie auch in der Herkunft des Nektars und damit des Pollenspektrums. Zur Beurteilung der verschiedenen Methoden wurden bestimmte Pollen unterschiedlicher Größe und Struktur photographisch festgehalten (Tab. 1).

TAB. 1. — Zu Vergleichszwecken herangezogene Pollen
 TABL. 1. — Pollen grains used for purpose of comparison

PA 1010 (Mischtracht mit viel <i>Rosaceae</i> , wenig kristalline Masse) (mixed honey-flow with a great amount of <i>Rosaceae</i> , only a few crystalline compounds)		
Pollen Pollen	Größe Dimension	Vergrößerung Magnification
<i>Cornus</i> sp.	≈ 55 µm	× 1 000 / × 2 000
<i>Prunus</i> sp.	≈ 30 µm	× 2 000 / × 3 000
<i>Brassica</i> sp.	≈ 25 µm	× 2 000 / × 5 000
Übersicht Over-all view		× 700
PA 1063 (Mischtracht aus <i>Ericaceae</i> , <i>Leguminosae</i> u.a., viel kristalline Masse) (mixed honey-flow of <i>Ericaceae</i> , <i>Leguminosae</i> a.o., great amount of crystalline compounds)		
Pollen Pollen	Größe Dimension	Vergrößerung Magnification
<i>Zea mays</i>	≈ 85 µm	× 1 000 / × 2 000
<i>Centaurea</i> sp.	≈ 40 µm	× 2 000 / × 5 000
<i>Calluna vulgaris</i>	≈ 35 µm	× 2 000 / × 5 000
<i>Trifolium repens</i>	≈ 25 µm	× 3 000 / × 5 000
Übersicht Over-all view		× 700

Nach zweimaligem Auswaschen mit aqua dest. und Zentrifugieren bei 3 500 U/Min. wurden die Honigsedimente nach folgenden Methoden behandelt :

Methode I

Das Sediment wurde auf ein ca. 4 cm² großes Stück Edelstahl-Drahtgewebe ($w = 0,02$ mm, $d = 0,02$ mm) überführt. Das Gewebe wurde anschließend zusammengefaltet, ohne daß das Sediment austrocknen konnte. Das Gewebe mit dem Sediment wurde folgendermassen weiterbehandelt : 1 Stunde in 50 % Aceton, 1 Min. Ultraschallbad, 1 Stunde 50 % Aceton, 1 Stunde 50 % Ethanol, 1 Stunde 70 % Ethanol, 1 Stunde 90 % Ethanol, 4 Stunden 100 % Ethanol, 1 Stunde Amylacetat, Critical Point Drying (CPD) mit flüssigem Kohlendioxid. Mit Hilfe eines beidseitigen Klebebandes wurden die Pollen vom Drahtgewebe auf den Probenträger übertragen.

Methode II

Das Sediment wurde wie bei Methode I in ein Edelstahl-Drahtgewebe übertragen und folgendermassen weiterbehandelt : 1 Stunde in 20 % Aceton, 1 Min. Ultraschallbad. Ein Exsiccator wurde mit Aceton + wasserfreien Calciumchlorid-Kristallen versehen. Auf die Porzellaneinlage wurde ein Schälchen mit weiteren Calciumchlorid-Kristallen sowie ein Schälchen mit ca. 5 ml 20 % Aceton, in welchem sich das Gewebe befand, gestellt. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde das Aceton kurz zum Kochen gebracht. Im geschlossenen Exsiccator wird die Feuchtigkeit über Nacht dem Präparat entzogen und von den Calciumchlorid-Kristallen aufgenommen. Anschließend Critical Point Drying (CPD) mit flüssigem Kohlendioxid. Mit Hilfe eines beidseitigen Klebebandes wurden die Pollen vom Drahtgewebe auf den Probenträger übertragen.

Methode III

Hier wurde verfahren wie bei Methode II, wobei auf die Reinigung im Ultraschallbad verzichtet wurde.

Methode IV

Bei dieser Methode wurde das Sediment im Drahtgewebe an der Luft getrocknet, auf das Ultraschallbad verzichtet, über Aceton entwässert und weiter über CPD mittels flüssigem Kohlendioxid getrocknet.

Methode V

Das Sediment wurde direkt auf den Probenteller gebracht und an der Luft getrocknet. Auf weitere Arbeitsgänge wurde verzichtet.

Alle Proben wurden anschließend im Sputter-Coater ISI PS-2 mit einer Goldschicht von 400 Å bedampft. Die Untersuchungen wurden mit dem Raster-Elektronenmikroskop ISI Super-II durchgeführt. Das Edelstahl-Drahtgewebe wurde von der Firma HAVER und BOECKER, Oelde, bezogen.

Angesichts der Frage, ob für die relativ stabilen gequollenen Pollen ebenso wie für Trockenpollen spezielle Präparationsschritte wie das CPD entfallen könnten, begannen wir mit der aufwendigsten und umfassendsten Methode, um darauf aufbauend zu den übrigen Methoden bis hin zur einfachsten hinzuarbeiten. Die Methode I, von LYNCH und WEBSTER (1975) zur Analyse von Trockenpollen entwickelt, mußte dabei für die Isolation von Pollen aus dem Honigsediment abgewandelt werden. Ebenso wurde die herkömmliche « Diffusion Dehydratation » — Methode modifiziert, die zur Vorbehandlung für das Critical Point Drying mit flüssiger Kohlensäure eingesetzt wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Auswertung aller o.a. Methoden zeigte sich, daß mit den Methoden I und II die weitaus besten Ergebnisse erzielt werden konnten (Abb. 3-6). Die Pollen beider Honige sind hervorragend isoliert, in einem guten Quellungszustand geblieben und zeigen eine sehr saubere Struktur der Exine. Bei der Methode II sind nur vereinzelt Fremdteilchen auf der Pollenoberfläche zu beobachten, was sich bei Analysen in den meisten Fällen als nicht störend auswirken dürfte. Da die Methode I wesentlich zeitaufwendiger ist, sollte sie weniger für Routinezwecke, sondern für die Herstellung von Vergleichspräparaten verwendet werden. Bei beiden Methoden ist eine quantitative Erfassung der Pollen möglich (Abb. 1). Das Gewebe ist nach einem Ausglühen wieder zu verwenden.

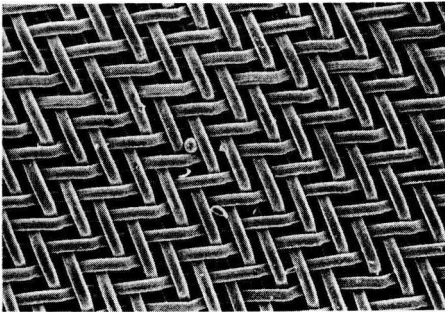


ABB. 1. — *Edelstahl-Drahtgewebe*
($w = 0,02$ mm) nach dem Abheben
der Pollen mittels beidseitigem Klebeband,
Vergrößerung $\times 150$

FIG. 1. — *High-duty wire screen*
($w = 0.02$ mm) after taking off
the pollen grains using an adhesive,
magnification $\times 150$

Bei den Arbeiten zeigte sich, daß auch bei der Melissopalynologie mittels REM, eine Vergleichsphotosammlung von gequollenen Pollen von besonderer Wichtigkeit ist. Um eine solche Sammlung zu erhalten, wurden Trockenpollen in filtriertem Honig bei 37°C in ca. 3 Tagen zum Quellen gebracht und nach Methode I präpariert. Charakteristische Quellungsformen und Ultrastrukturen der Exine werden in vielen Fällen erst im gequollenen Zustand des Pollen deutlich (Abb. 2).

Die Methoden III, IV und V erwiesen sich als nicht geeignet, zum Teil als unbrauchbar: bei Methode III wurde bei beiden Honigen eine starke Verklumpung der Pollen sowie Schichten auf der Pollenoberfläche dichtbar (Abb. 3-6). Dadurch wird deutlich, daß trotz einer Behandlung mit Aceton, ein vollständiges Entfernen des Pollenkitts nur mit Hilfe des Ultraschallbades zu erreichen ist. Die Methode IV zeigt viele Unreinheiten im Präparat und führt teilweise zu nicht gut ausgequollenen Pollen (Abb. 3-6). Dieses ist auf das Antrocknen des Sedimentes vor der Entwässerung und dem CPD zurückzuführen. Ein weiterer Nachteil dieser

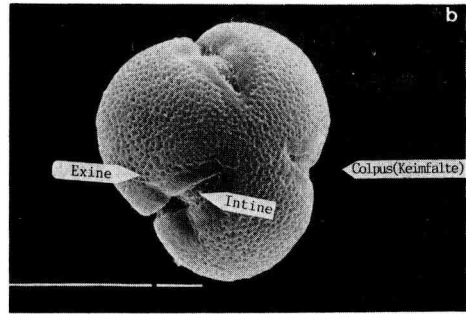
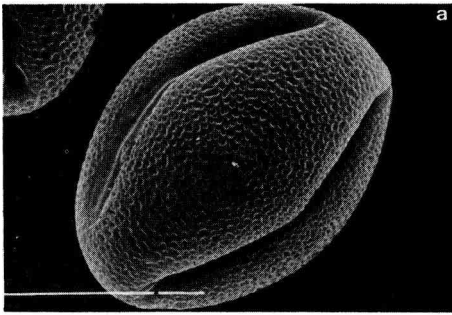


ABB. 2. — Pollen von *Euphorbia* spec.
 (a) Trockenpollen; (b) Gequollener Pollen, präpariert nach Methode I;
 Kleiner Markierungsstrich = 5 μ m
 FIG. 2. — Pollen of *Euphorbia* spec.
 (a) Dry pollen; (b) Swollen pollen, prepared by method I; Short marker = 5 μ m

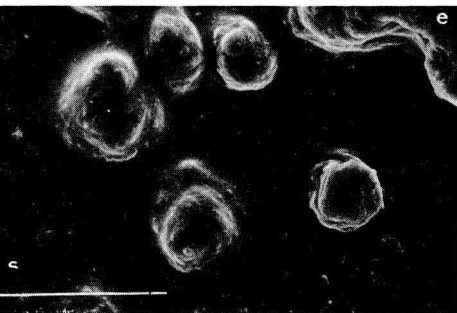
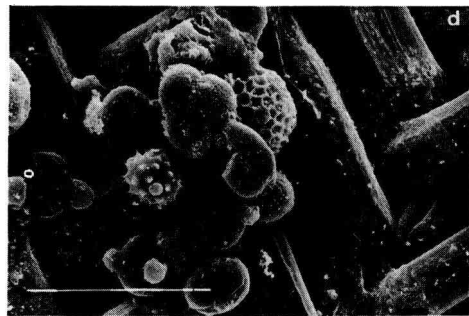
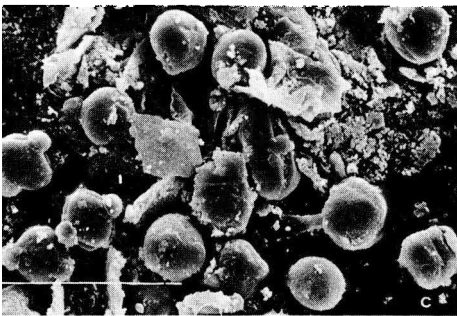
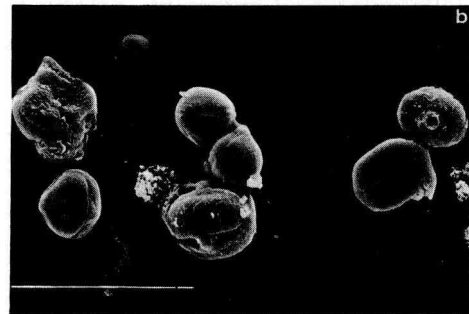
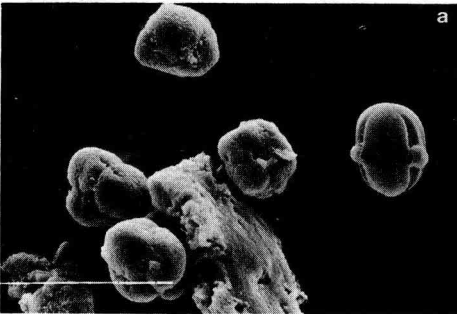


ABB. 3. — Präparat-Übersicht
 des Honigs PA 1063
 (a) Methode I; (b) Methode II; (c) Methode III;
 (d) Methode IV; (e) Methode V; kleiner Markierungsstrich = 5 μ m

FIG. 3. — Specimen over-all view
 of the honeysample PA 1063
 (a) Method I; (b) Method II; (c) Method III;
 (d) Method IV; (e) Method V;
 Short marker = 5 μ m

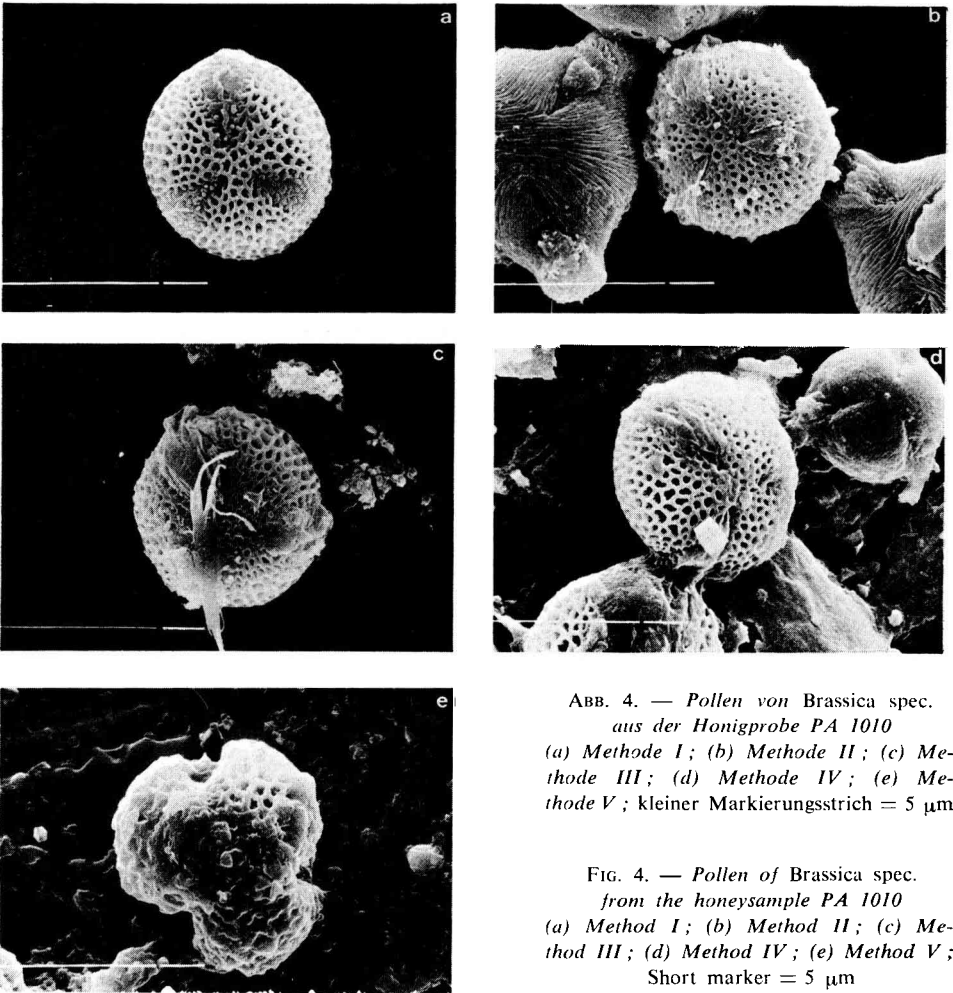


ABB. 4. — Pollen von *Brassica* spec.
aus der Honigprobe PA 1010
(a) Methode I; (b) Methode II; (c) Me-
thode III; (d) Methode IV; (e) Me-
thode V; kleiner Markierungsstrich = 5 μ m

FIG. 4. — Pollen of *Brassica* spec.
from the honeysample PA 1010
(a) Method I; (b) Method II; (c) Me-
thod III; (d) Method IV; (e) Method V;
Short marker = 5 μ m

Methode besteht darin, daß der Teil des Gewebes, auf dem sich das angetrocknete Sediment befindet, ausgeschnitten und auf den Probenteller gebracht wird. Das Gewebe kann daher nicht erneut verwendet werden.

Die Methode V zeigt für einzelne Pollen der Probe PA 1010 erstaunlicherweise gute Ergebnisse. Die schlechten Resultate der Probe PA 1063 machen aber deutlich, daß bei Methode V nur bei bestimmten Pollenspektren bzw.

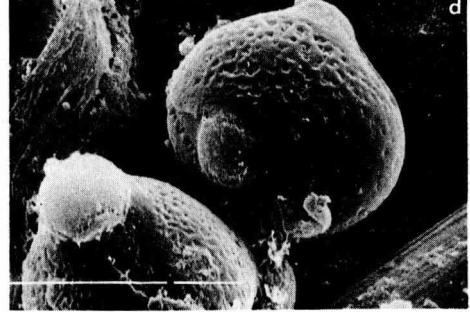
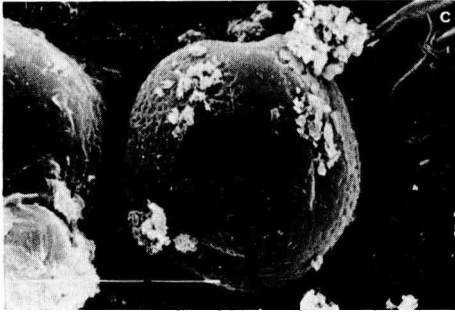
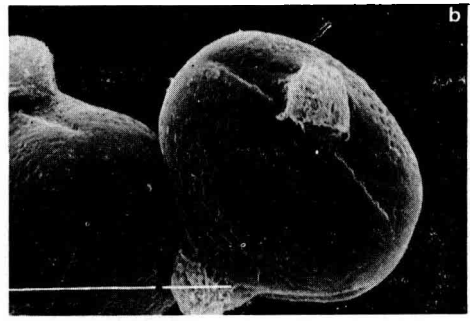
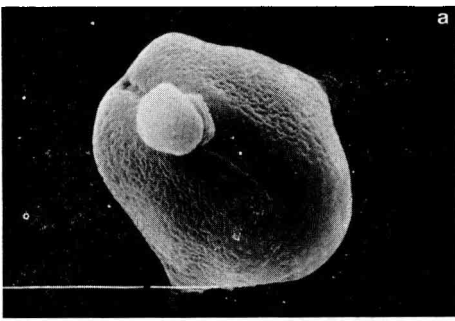


ABB. 5. — Pollen von *Trifolium* spec. aus der Honigprobe PA 1063
 (a) Methode I; (b) Methode II; (c) Methode III; (d) Methode IV;
 Kleiner Markierungsstrich = 5 μ m

FIG. 5. — Pollen of *Trifolium* spec. from the honeysample PA 1063
 (a) Method I; (b) Method II; (c) Method III; (d) Method IV; Short marker = 5 μ m

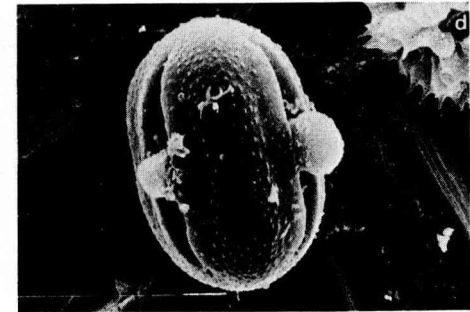
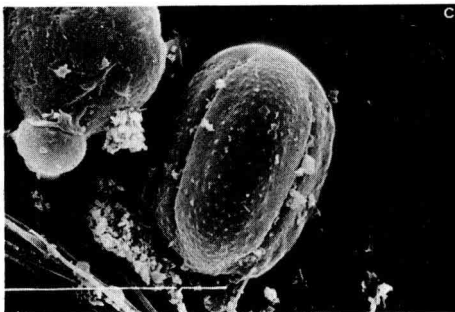
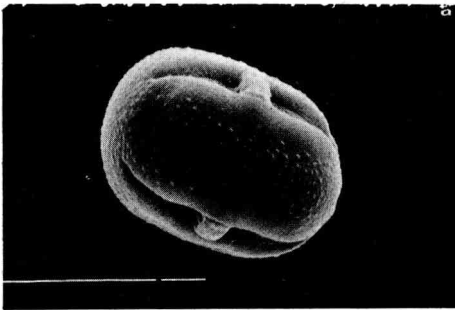


ABB. 6. — Pollen von *Centaurea* spec. aus der Honigprobe PA 1063
 (a) Methode I; (b) Methode II; (c) Methode III; (d) Methode IV;
 Kleiner Markierungsstrich = 5 μ m

FIG. 6. — Pollen of *Centaurea* spec. from the honeysample PA 1063
 (a) Method I; (b) Method II; (c) Method III; (d) Method IV; Short marker = 5 μ m

Trachtherkünften des Honigs ein gutes Ergebnis erzielt werden kann (Abb. 3-4). Somit ist auch diese Methode für die Melissopalynologie ungeeignet.

Alle Pollenphotos wurden in den Abb. 3-6 vergleichend zusammengestellt.

Eingegangen im März 1985.

Angenommen im Mai 1985.

RÉSUMÉ

ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DU POLLEN DU MIEL

I. COMPARAISON DES DIVERSES METHODES DE PREPARATION

L'identification des grains de pollen présents dans le miel (méliissopalynologie) se fait habituellement en microscopie optique, mais il existe de nombreux cas où cela ne suffit pas pour déterminer la nature de la miellée.

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet, mieux que la microscopie optique, de reconnaître les différences dans l'ultrastructure du pollen. Contrairement au pollen sec, l'analyse des grains de pollen gonflés dans le miel pose des problèmes de préparation de l'échantillon pour la M.E.B. Par comparaison et développement des diverses méthodes citées dans la littérature, nous présentons dans cette étude une application pratique de la MEB à la méliissopalynologie.

Les résultats montrent que la méthode II (transfert du sédiment du miel dans un crible métallique, déshydratation à l'acétone, bain d'ultrasons, dessiccation au point critique (DPC) suffit pour une analyse de routine. La méthode I, qui requiert beaucoup plus de temps et dans laquelle le sédiment est en outre traité par une gamme d'alcools, semble particulièrement adéquate pour réaliser une série comparative de photographies de grains de pollen gonflés. En aucun cas on ne doit supprimer des étapes de la préparation, telles que le bain d'ultrasons ou le DPC. Le DPC n'est important que pour les grains de pollen $> 50 \mu$, les grains de pollen plus petits restant stables à l'état gonflé mais, afin d'éviter des erreurs, le DPC devrait toujours être effectué. Les méthodes III, IV et V ne donnent pas, d'après nos analyses, de résultats satisfaisants pour la méliissopalynologie.

SUMMARY

SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF POLLEN FROM HONEY

I. COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF PREPARATION

The identification of pollen grains found in honey (melissopalynology) normally is made by light microscopy, but there are many cases where this is not sufficient to determine the kind of honey flow.

Using scanning electron microscopy (SEM) differences in ultrastructure of pollen can be recognized better than by light microscopy. In contrast to analysis of dry pollen, the analysis of pollen grains swollen in honey is quite different by SEM. By comparison and development of several methods cited in the literature we have shown in this study a practical application of the S.E.M.-technique for melissopalynology.

The results demonstrate that method II [transfer of honeysediment into a wire screen, dehydration in acetone, ultrasonic bath, critical point drying (CPD)] is sufficient for routine analysis. The more time consuming method I in which the sediment is taken through an alcohol series seems appropriate for making photographs of swollen pollen grains for purposes of comparison. Single steps of preparation as ultrasonic bath and CPD can never be omitted. CPD is especially important for pollen grains $> 50 \mu\text{m}$, smaller pollen grains remain stable in swollen conditions. In order to avoid errors, CPD should always be applied. We found that methods III, IV and V were not satisfactory.

LITERATURVERZEICHNIS

- BURRICHTER E., AMELUNXEN F., VAHL J., GIELE T., 1968. — Pollen- und Sporennntersuchungen mit dem Oberflachen-Rasterelektronenmikroskop. *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**, 226-237.
- ERDTMAN G., 1960. — The acetolysis method. *Svensk Bot. Tidsskr.*, **54** (4), 561-564.
- FOGLE H.W., 1977. — Identification of tree fruit species by pollen ultrastructure. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **102** (5), 548-551.
- KLUNGNES L.M., PENG Y., 1983. — A scanning electron microscopic study of pollen loads collected and stored by honeybees. *J. Apic. Res.*, **22** (4), 264-271.
- VAN LAERE O., LAGASSE A., DE METS M., 1969. — Use of the scanning electron microscope for investigating pollen grains isolated from honey samples. *J. Apic. Res.*, **8** (3), 139-145.
- LOUVEAUX J., MAURIZIO A., VORWOHL G., 197. — Methods of palynology. *Bee World*, **59**, 139-157.
- SMIT A., 1973. — A scanning electron microscopical study of the pollen morphology in the genus *Quercus*. *Acta Bot. Neerl.*, **22** (6), 655-665.
- SCHWERDTFEGER G., 1978. — Die Pollenkörner unserer Obstarten und anderer Rosaceen in Aufnahmen mit dem Raster Elektronenmikroskop *Gartenbauwissenschaft*, **43** (4), 145-156.
- WEBER M.O., 1981. — Pollen diversity and identification in some Plumbaginaceae. *Pollen et Spores*, **23** (3-4), 321-348.
- WEBER M.O., 1982. — Die Identifizierung und Repräsentierung des *Quercus*-Pollen in einigen spanischen Orangenhonigen. *Apidologie*, **13** (4), 369-381.
- ZANDER E., 1935. — *Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig*. Verlag der Reichsfachgruppe Imker e.V., Berlin.