

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И АНАТОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТАТКОВ ИСКОПАЕМЫХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА

---

*О. А. Гаврилова, Н. Е. Завьялова, М. В. Теклёва,  
Н. В. Носова, Н. В. Горденко, Е. В. Карасёв,  
В. С. Маркевич, Е. В. Бугдаева*

Результаты морфологических исследований остатков ископаемых высших растений и комплексный анализ данных по ископаемым и современным их представителям являются ценным источником информации для филогенетических реконструкций. Пыльца, споры, фитолеймы — часто встречающиеся, а во многих случаях ещё и единственные сохранившиеся палеоботанические объекты. Получение всей возможной информации об их строении необходимо для указания их ботанической, таксономической принадлежности, установления филогенетических связей растений, которым эти остатки принадлежали. Традиционно микрообъекты исследуют с помощью сначала светового (СМ) и далее сканирующего электронного (СЭМ) микроскопов; трансмиссионный электронный микроскоп (ТЭМ) применяется значительно реже. Для исследований под ТЭМ, а в некоторых случаях и на световом уровне, микрообъекты подвергают дополнительной, иногда довольно сложной, подготовке; в конечном итоге получают ультратонкие срезы. Таким образом, объект целиком не сохраняется, что является существенным минусом метода, т. к. многие палеоботанические находки уникальны. Поиски неdestructивной (не разрушающей объект) методики изучения структур ведутся уже давно. Одной из таких успешных методик является конфокальная микроскопия (КЛСМ) и изучение структур на серийных виртуальных срезах. КЛСМ позволяет провести реконструкцию трёхмерного облика объекта, рассмотреть его со всех сторон и выяснить изменение структур как на серийных виртуальных срезах, так и на произвольно направленных срезах уже реконструированного объекта. Дополнительным преимуществом метода является то, что для исследования на КЛСМ подходит уже подготовленный для световой микроскопии препарат.

Нами были изучены растительные остатки с помощью КЛСМ LSM 780 (Carl Zeiss) в Центре коллективного пользования БИН РАН, программное обеспечение Zen 2011. Для работы была применена методика исследования оболочки современных пыльцевых зёрен (Гаврилова, 2014). При изучении остатков ископаемых высших растений нами использовался мацерационный метод. Дополнительное окрашивание не проводилось. После предварительного просмотра препарата и выбора объекта сканирование велось с использованием лазера 561 нм при объективе главным образом  $\times 63$  с масляной иммерсией, в отдельных случаях при объективах  $\times 40$  или  $\times 100$  тоже с масляной иммерсией. Расстояние между виртуальными срезами составляло около 0,2 мкм. Измерения объектов и деталей их строения проводились с помощью программного обеспечения КЛСМ.

Так, нами были исследованы пыльцевые зёрна *Cycadopites* (рис. 1: 1, 2), полученные из пыльцевых камер семян *Allicospermum* spp. из юрских отложений Узбекистана (Ангрен) (Zavialova et al., 2014a, b).

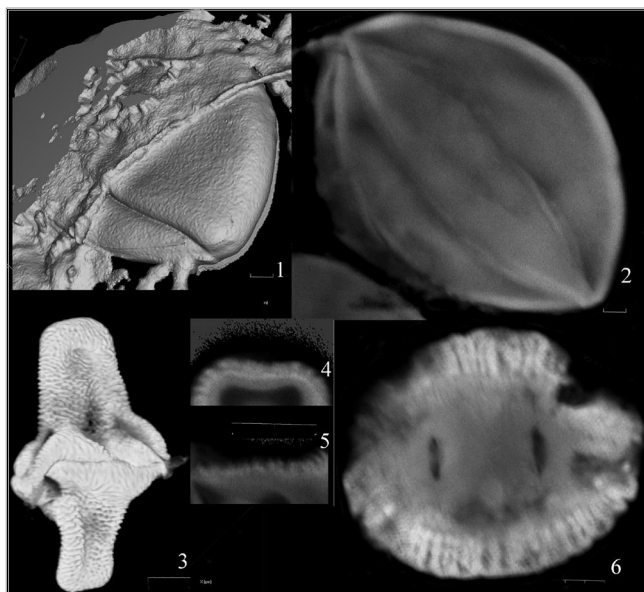


Рис. 1. Пыльцевые зёрна *Cycadopites* (1, 2), *Pseudointegricorpus clarireticulatum* (3–5), *Wodehouseia spinata* (6);

2, 4–6 — виртуальные срезы, 1, 3 — реконструированные пыльцевые зёрна; 1, 2, 6 — масштабная линейка 5 мкм, 3–5 — масштабная линейка 10 мкм

Пыльцевые зёрна овальных очертаний, средних размеров ( $30 \times 43$  мкм). Исследованный материал имел очень специфическую сохранность: пыльцевые зёрна располагались в плотной группе, наложенными друг на друга, на обрывках кутикулы, отдельные пыльцевые зёрна нам отделить не удалось. В результате после изучения общей морфологии под СМ мы не были уверены в том, одноапертурные ли пыльцевые зёрна или трёхапертурные. КЛСМ показал, что кутикула имеет примерно тот же максимум флуоресценции (рис. 1: 1), что и оболочки пыльцевых зёрен. В данном случае не удавалось рассмотреть зёрна со всех сторон для установления апертурного типа, однако виртуальные срезы, произведенные вдоль и поперёк реконструированных зёрен, показали, что пыльца однобороздная. Экзина зёрен тонкая, толщиной около 1,5 мкм, однородная; мелкие элементы скульптуры поверхности не различимы.

На пыльцевых зёрнах *Pseudointegricorpus clarireticulatum* (Samoilovitch) Takahashi (Tekleva et al., 2014) из отложений свиты Фурпао (поздний маастрихт, Дальний Восток/Китай) удалось рассмотреть сетчатую структуру поверхности (рис. 1: 3), в этом случае данные КЛСМ вполне сравнимы с результатами СЭМ исследований. На виртуальных срезах различимы покровная, столбиковая эктэзина 1,2–1,9 мкм толщиной и эндэкзина от 0,8 до 2,1 мкм толщиной, выяснено распределение эндэкзинных утолщений (рис. 1: 4, 5). В плане общей морфологии трипрокетатных зёрен с помощью КЛСМ удалось рассмотреть пыльцу со всех сторон и описать выросты, а также полости внутри зёрен. Из тех же отложений была исследована пыльца *Wodehouseia spinata* Stanley (рис. 1: 6). Зёрна  $25 \times 32$  мкм в диаметре с удлинёнными порами ( $1,1 \times 4,2$  мкм в диаметре) имеют толстую покровную, столбиковую экзину толщиной около 4,5 мкм. Хорошо заметен тонкий покров и высокие столбики, однако подстилающий слой и эндэкзина, вероятно, очень тонкие и в КЛСМ не различимы. На поверхности обнаружены редкие шипы от 1 до 3 мкм по высоте/основанию, более мелкие скульптурные элементы не выявлены.

Мегаспоры *Maexisporites rugulaeferus* Karasev et Turnau (местонахождение Шолга, Подосиновецкий район, Кировская область, вохминская свита, индский ярус) (Karasev, Turnau, 2014) довольно крупные и сначала были исследованы с объективом  $\times 40$ . Целиком спору реконструировать не удалось из-за толстой, пропускающей луч оболочки. После реконструкции верхней половины споры было обнаружено, что

для изображения поверхности существенно информативнее использовать СЭМ. При реконструкции части оболочки с объективом  $\times 100$  на виртуальных срезах удалось получить некоторую информацию об ультраструктуре спородермы (рис. 2: 1). Оболочка споры толщиной около 15 мкм, двухслойная. Внешний слой толщиной около 10 мкм, плотный, мелкогранулированный, гранулы около 0,3 мкм в диаметре, внутренний слой ламеллярный, толщиной около 5 мкм, ламеллы толщиной около 1 мкм.

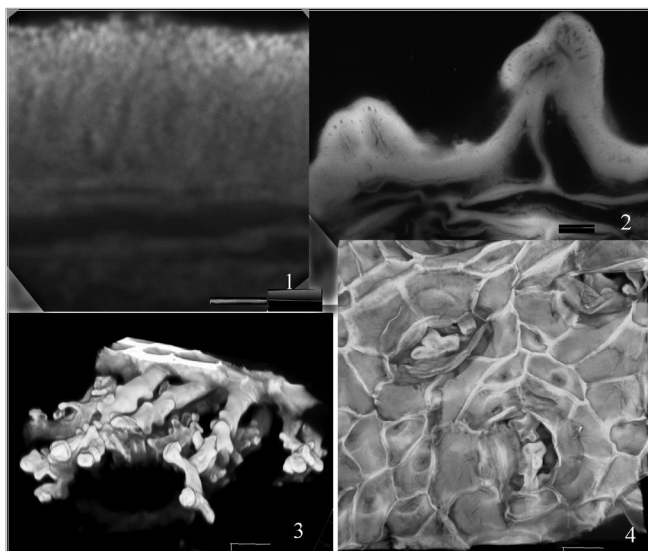


Рис. 2. Оболочка споры *Maexisporites rugulaeferus* (1),  
 листа *Sciadopityoides ukrainensis* (2) и *S. brevifolia* (3, 4);

1, 2 — виртуальные срезы, 3, 4 — реконструированные структуры;  
 1 — масштабная линейка 10 мкм, 2–4 — масштабная линейка 20 мкм.

С помощью КЛСМ были исследованы фитолеймы листьев *Sciadopityoides ukrainensis* (Doludenko) Sveshnikova из юрских отложений Западной Украины (рис. 2: 2) и *S. brevifolia* (L. Abramova) Hvalj из меловых отложений бассейна реки Анабар (север Сибири) (рис. 2: 3, 4). На виртуальных поперечных срезах папилл, расположенных вдоль устьичной зоны на абаксиальной поверхности листа *S. ukrainensis*, можно увидеть их внутреннее строение. На рис. 2: 3 изображены реконструированные ветвистые папиллы вдоль устьичной зоны на абаксиальной поверхности листа *S. brevifolia*. При

реконструкции сложноустроенные папиллы можно рассмотреть со всех сторон, а на просвет и на виртуальных срезах внутри папилл обнаруживается полость. Устьица (рис. 2: 4), чётко не различимые в СМ, при исследовании в КЛСМ становятся ясными и измеряемыми. Изображения устьиц вполне сравнимы с фотографиями на СЭМ, хотя и менее чёткие.

Таким образом, применение КЛСМ для изучения растительных остатков даёт возможность получать часто уникальную информацию об общем строении и ультраструктуре микрообъектов, используя при этом уже подготовленный постоянный препарат, хотя, несомненно, не может заменить трудоёмкую, но более информативную электронную микроскопию.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, проекты № 13–04–015118-а, 14–04–0044, и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских учёных (МК-2369.2014.4).

## Список литературы

*Гаврилова О. А.* Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) для исследования морфологии оболочки пыльцевых зёрен // Бот. журн. 2014. Т. 99. № 10. С. 1139–1147.

*Karasev E. V., Turnau E.* Earliest Triassic (Induan) megaspores from Russia: taxonomy and stratigraphy // Ann. Soc. Geol. Poloniae. 2014. in press.

*Tekleva M., Markevich V., Budgaeva E., Ge Sun, Gavrilova O.* *Pseudointegricolpus clarireticulatum* (Samoilovitch) Takahashi: morphology and ultrastructure // Historical Biol.: Int. J. Paleobiology. 2014. DOI: 10.1080/08912963.2014.918117

*Zavialova N., Gordenko N., Nosova N., Polevova S.* The fine morphology of pollen grains from the pollen chamber of a supposed ginkgoalean seed from the Middle Jurassic of Uzbekistan (Angren locality) // Plant Syst. Evol. 2014a. DOI 10.1007/s00606–014–1024-x

*Zavialova N., Nosova N., Gordenko N., Gavrilova O.* The fine morphology and affinity of pollen grains associated with seeds from Jurassic of Uzbekistan // Abstr. 9th Europ. Palaeobot. — Palynol. Conference. Padova — Italy, 2014b. P. 317.