

Байдарка, алмазный нож и четыре микроскопа

Н.Е. Завьялова, Е.В. Карасев, С.В. Полева

Завьялова Наталья Евгеньевна,
*кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН.*

Карасев Евгений Владимирович,
*кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН.*

Полева Светлана Вячеславовна,
*кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Кафедры морфологии и систематики высших растений
биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.
Проект РФФИ № 15-14-20078*

Звероящеры давно стали любимыми детскими игрушками; рассуждая о них, мы представляем себе и дремучие заросли, в которых они бродили. Но, прежде чем реконструировать облик растительности далекого прошлого, ученый-палеоботаник имеет дело с породой, в которой встречаются разрозненные кусочки ископаемых растений. Какой же путь проходит ископаемая находка в процессе изучения? От момента, когда ее найдут, до момента, когда исследователь осознает, что он узнал и понял о ней все, что в его силах. Какой путь преодолевает исследователь-палеоботаник, изучающий эту находку?

К местонахождению ископаемых растений нас приближают поезда и лодки. В работе мы используем инструменты разной, все возрастающей, точности. Начинаем в дальней экспедиции геологическим молотком. Тяжело нагруженные собранными коллекциями ископаемых растений,

возвращаемся в лабораторию. Далее вооружаемся препаровальными иглами и химическими реактивами, используем световые микроскопы: стереомикроскоп, позволяющий наблюдать объект в отраженном свете, и просвечивающий световой микроскоп – для наблюдения в проходящем свете. После них наступает черед алмазного ножа, ультратома и электронных микроскопов: сканирующего и трансмиссионного. Ископаемая летопись сохранила не всю информацию о вымерших организмах, но задача ученого - извлечь всю информацию, которая все же сохранилась, из изучаемого объекта и сделать ее доступной для всех. Поэтому прогресс палеонтологии тесно связан с прогрессом микроскопической техники. Последовательное применение разных микроскопов к одному объекту позволяет скомпенсировать конструкционные ограничения каждого микроскопа и получить наиболее полную информацию об изучаемом объекте.



Фото 1. Местонахождение Исады располагается на правом берегу реки Сухона, недалеко от деревень Исады и Пуртовино (Вологодская область). Возраст вмещающих отложений около 258 млн. лет. Первые образцы из этих мест собрал в 1887 г. выдающийся российский ученый-геолог и палеонтолог Владимир Прохорович Амалицкий в ходе масштабных работ по рекам Сухона и Северная Двина. В.П. Амалицкий открыл богатейшую фауну водных и наземных амфибий и рептилий, которая произвела сенсацию в научном сообществе и послужила основой для создания экспозиции фауны пермского периода в Палеонтологическом музее в Москве. В Исадах Амалицкий обнаружил многочисленные ганоидные чешуи и скелеты палеонисковых рыб. Раскопки в Исадах были возобновлены в 1920-х гг. В течение XX в. отложения реки Сухона изучали десятки научных экспедиций. К настоящему времени из Исад известен богатейший комплекс наземной фауны позвоночных, рыб, двустворок, остракод, конхострак и насекомых. Комплекс ископаемых растений является одним из самых представительных среди комплексов позднепермских местонахождений Европейской части России. Попастъ на разрез можно, только преодолев Сухону.



Фото 2. В ископаемом состоянии растения сохраняются в виде разрозненных остатков, таких как отпечатки листьев, шишки (стробилюсы), окаменевшие стволы, извлеченные из геологической породы пыльцевые зерна. Палеоботанику нужно распознать среди набора разнородных растительных фоссилей части, принадлежавшие некогда растениям одной и той же таксономической группы, и воссоздать облик вымершего растения. Так происходит сбор ископаемого материала.



Фото 3. Обнаружен отпечаток стробила ископаемого голосеменного растения.



Фото 4. Первичный просмотр с помощью светового стереоскопического микроскопа (стереомикроскопа) собранного за день материала. В качестве осветителя используются последние лучи заходящего солнца.



Фото 5. Так хранятся собранные остатки ископаемых растений.



Фото 6. Отпечатки наиболее часто встречающихся растений. Слева – побеги хвойных, справа – отпечатки ланцетных листьев и семяночных органов семенных папоротников рода *Tatarina*, типичные представители так называемой Татариновой флоры. Такие семяночные папоротники являются характерной чертой верхнепермских (татарских) отложений, от которых и получил название род ископаемых листьев семенных папоротников и весь комплекс ископаемых растений. Семяночные папоротники были достаточно хорошо изучены в 1980-х гг., для них надежно установлены связи между захороненными в разрозненном состоянии листьями, семяночными органами, семенами и спорангиями. Пыльца семенных папоротников из спорангиев также известна. При этом семяночным папоротникам из пермских отложений свойственен один тип пыльцевых зерен, а семяночным папоротникам из триасовых – другой. Более того, пыльца сходной морфологии известна также и у других групп голосеменных растений, не связанных близким родством с семяночными папоротниками. Нами предпринято изучение оболочек пыльцевых зерен, чтобы, во-первых, найти признаки, позволяющие различить пыльцу сходной морфологии, но производившуюся неродственными растениями, а во-вторых, на основании строения оболочки выдвинуть предположения о путях эволюции пыльцевых зерен семенных папоротников одного типа из палеозойских отложений к другому типу пыльцы из мезозойских отложений.



Фото 7. Изучение отпечатков ископаемых растений с помощью современного стереомикроскопа с мощным блоком оптики и цифровой камерой. Под стереомикроскопом – найденный в Исадах пыльцевой орган ископаемого семенного папоротника, из которого есть надежда извлечь пыльцевые зерна.



Фото 8. Остатки генеративных органов с сохранившимися внутри них пыльцевыми зернами – одни из наиболее многообещающих находок для получения информации об ископаемых растениях.



Фото 9. Из этих пыльцевых органов благодаря обработке плавиковой кислотой и едким калием были извлечены пыльцевые зерна.

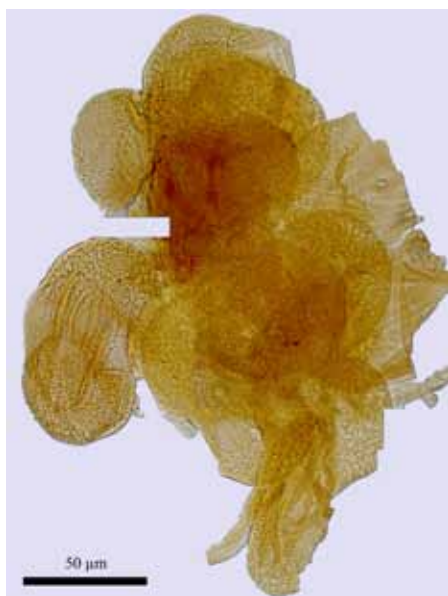


Фото 10. Несколько пыльцевых зерен, извлеченных из спорангия, сняты под просвечивающим световым микроскопом, использован иммерсионный объектив.

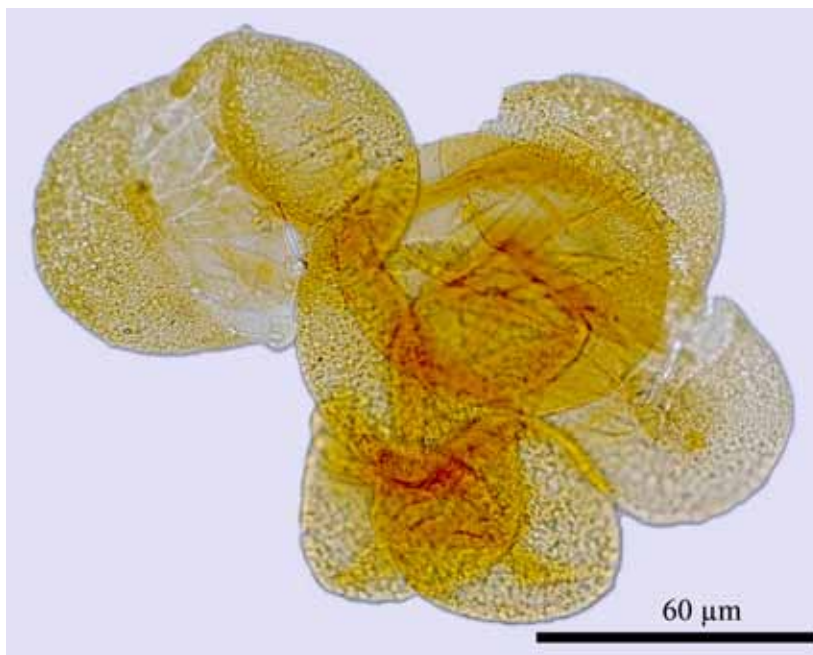
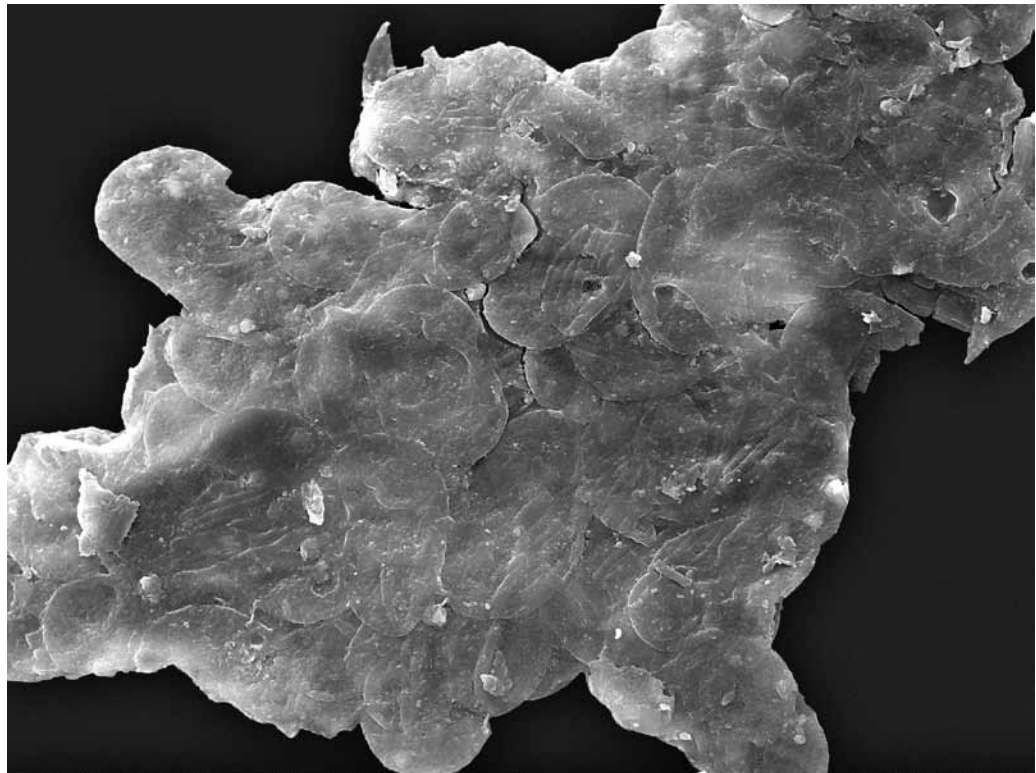


Фото 11. Пыльцевые зерна – с двумя воздушными мешками и ребристым телом. Видимая мелкая сетка – текстура – это внутренние перегородки оболочки. Такие пыльцевые зерна очень характерны для геологических отложений пермского возраста. Их производили голосеменные растения нескольких групп, на всех континентах того времени. Есть предположение, что ребристое тело было удобно для изменения объема пыльцевого зерна и защиты мужского гаметофита от высыхания в период путешествия пылинки из мужской шишки к женской, а неродственные группы голосеменных подхватили моду на ребра, приспособившись к сухому и жаркому климату.

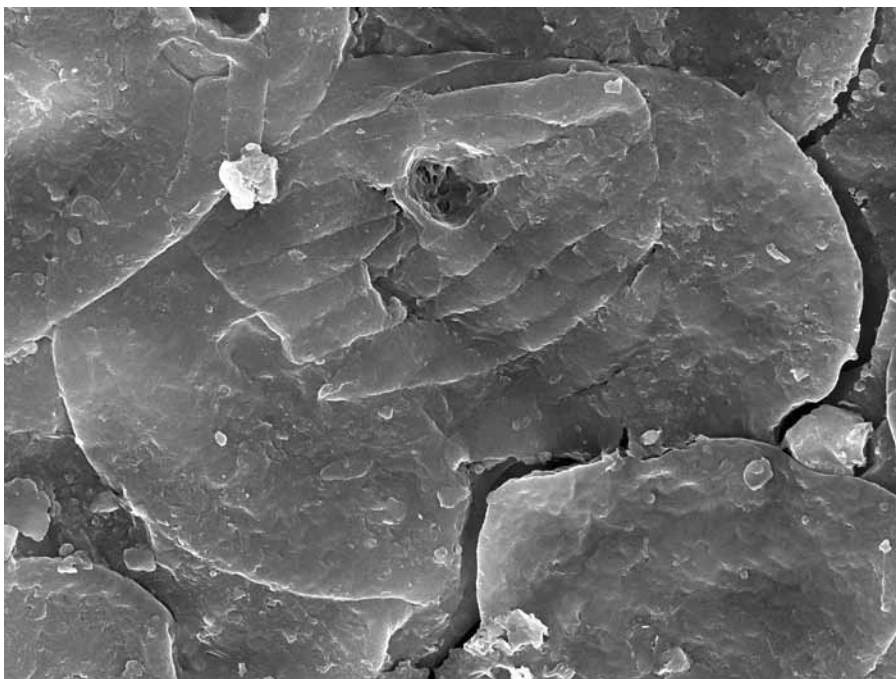


Фото 12. Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) – необходимый инструмент в любом исследовании поверхности клеточных стенок растений. Он состоит из колонны, где создается поток электронов, бомбардирующих объект исследования, и установлены детекторы, которые анализируют потоки электронов, проваимодействовавших с объектом исследования. Обработанный сигнал от детекторов передается на компьютер, который строит изображение. СЭМ позволяет подробно рассматривать элементы поверхности образцов нанометровых размеров. Однако предъявляет к образцу особые требования: для получения качественного изображения на больших увеличениях объект должен выдерживать помещение в вакуум и бомбардировку электронами, то есть быть сухим и электропроводным. Из всех объектов живой природы именно ископаемый материал в наибольшей степени удовлетворяет требованиям электронной микроскопии и позволяет получить информацию без потери свойств живого, которые он за миллионы лет залегания в породах потерял естественным образом. На фото – один из СЭМ Палеонтологического института. На мониторах видно изучаемое ископаемое полевое зерно.



SEM HV: 30.00 kV WD: 4.140 mm VEGA\\ TESCAN
 Vac: HiVac Det: SE Detector 100 µm
 SM: RESOLUTION Date(m/d/y): 05/29/14 Paleontology Institute RAS

Фото 13. Комок пыльцевых зерен, извлеченных из спорангия. Пыльцевые зерна очень уплощены. СЭМ показывает только поверхность пыльцевых зерен. Наружный слой оболочки сплошной и полностью скрывает внутреннюю сетку. Кроме того, у каждого пыльцевого зерна видна только одна из двух сторон: или проксимальная (когда-то прилегавшая к центру тетрады, на ней расположены ребра), или дистальная (сторона, удаленная от центра тетрады, она лишена ребер, через ее утонченный участок когда-то мужской гаметофит покидал оболочку).



SEM HV: 30.00 kV WD: 4.178 mm VEGA\\ TESCAN
 Vac: HiVac Det: SE Detector 20 µm
 SM: RESOLUTION Date(m/d/y): 05/29/14 Paleontology Institute RAS

Фото 14. Пыльцевое зерно лежит проксимальной стороной к наблюдателю. Можно различить его ребристое тело и два гладких воздушных мешка. Поскольку СЭМ показывает только поверхность образца, то сетчатых перегородок мешка не видно – они скрыты сплошным наружным слоем оболочки пыльцевого зерна. Это пыльцевое зерно видно на мониторе на фото 12.



Фото 15. Чтобы электронный луч мог просветить изучаемый объект, он должен быть очень тонким – примерно 60 нм. Все биологические объекты, в том числе и ископаемые, гораздо крупнее. Поэтому их режут на кусочки и изучают по частям. Пыльцевое зерно в этом отношении идеальный объект. Его можно порезать целиком. Для этого пылинку заливают в эпоксидные смолы и режут как муху в янтаре. Эпоксидную смолу с ископаемой пылинкой (после того как при постоянной повышенной температуре в термостате она стала твердой – заполимеризовалась) зажимают в специальный держатель.

Фото 16. В держателе излишек смолы удаляют с тем, чтобы позднее нож ультрамикротомы резал не пустую смолу, а изучаемый объект.

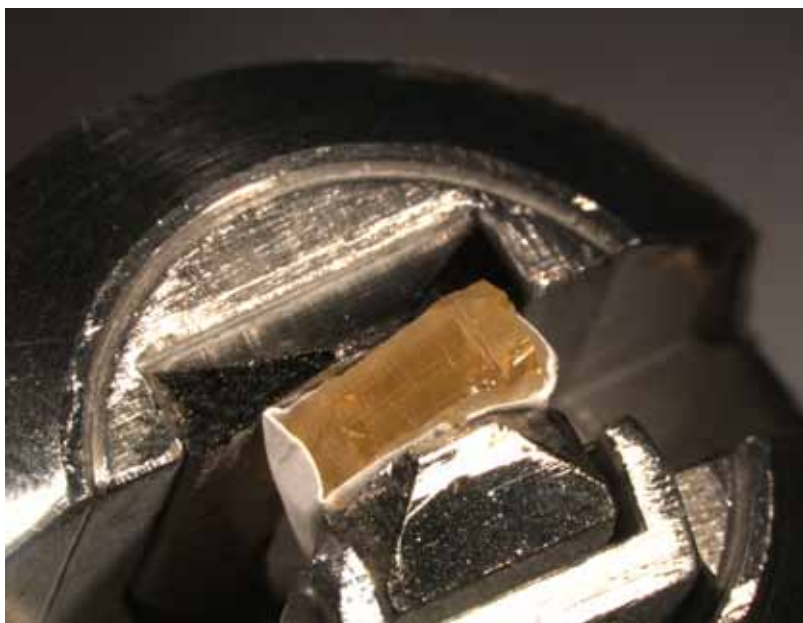


Фото 17. Отвердевшую смолу затачивают в форме пирамидки, с которой и получают ультратонкие срезы. От долгого лежания в отложениях ископаемые мнутся, пыльца не исключение. Срезы удобнее делать с пылинки, сориентированной в профиль, поэтому в этом блоке ископаемая пыльца видна как тонкая коричневая полоска.

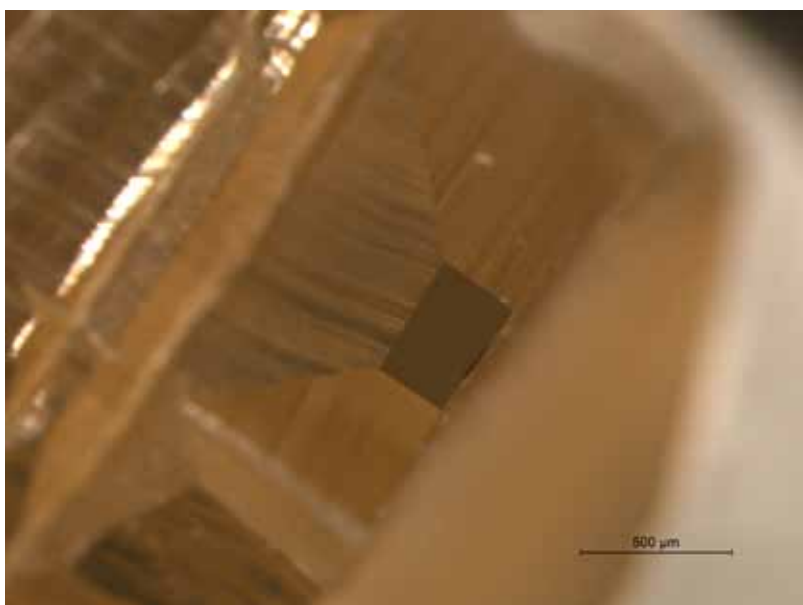




Фото 18. Ультратонкие срезы изготавливают на специальном приборе – ультрамикротоме, оснащенный алмазным или стеклянным ножом.



Фото 19. Ленты ультратонких срезов монтируют на опорных сеточках как на предметном стекле для светового микроскопа.



Фото 20. Для безопасной переноски сеток со срезами используют специальные контейнеры.



Фото 21. Работа на просвечивающем электронном микроскопе сопряжена с большими трудностями подготовки образца исследования. Поскольку в этом приборе анализируется поток электронов, прошедших сквозь образец, не повредив его, анализируемый образец должен быть очень тонким – ультратонким! Ультратонкие срезы образца помещают в специальную камеру в средней части колонны микроскопа и наблюдают тени от него, спроецированные на специальный экран в нижней части колонны. Современные трансмиссионные электронные микроскопы (ТЭМ) оснащены ССD-камерами, которые оцифровывают изображение и выводят его на экран монитора. ТЭМ позволяют биологам работать на максимальных для биологических объектов увеличениях – от нескольких клеток до отдельных макромолекул. Можно наблюдать и атомные решетки, но это уже не есть задача биолога.

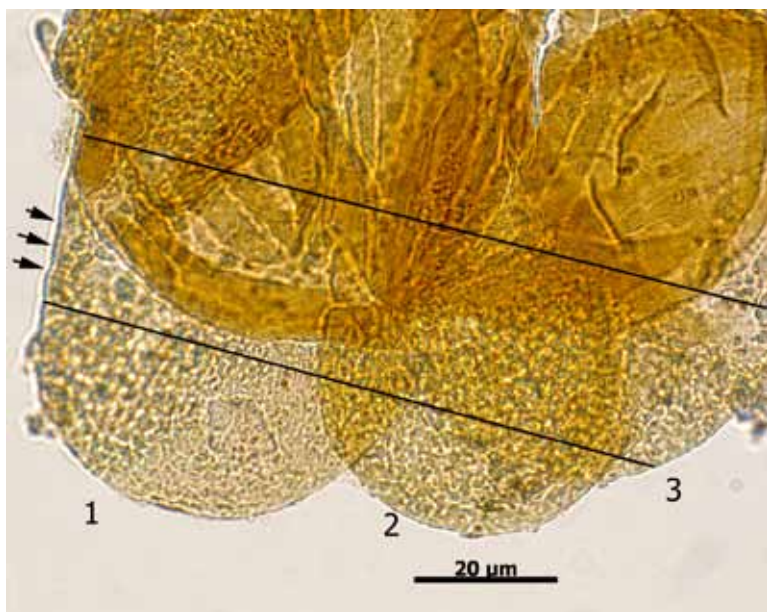


Фото 22. Фотография показывает положение серии ультратонких срезов, прошедших через оболочки трех пыльцевых зерен. Первые срезы серии затронули только воздушные мешки пыльцевых зерен. Последние срезы прошли через тела пыльцевых зерен.

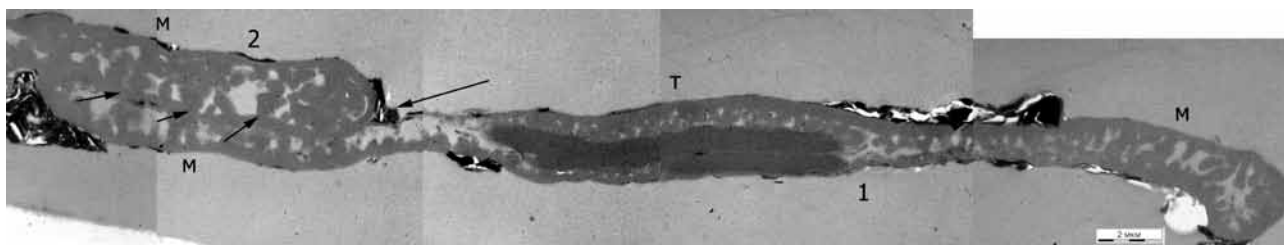


Фото 23. Живое пыльцевое зерно – трехмерное. В ископаемом состоянии остается только верхняя часть его оболочки (экзина), которая еще и уплощается под давлением геологических пород, так что оболочка ископаемых пыльцевых зерен подобна спущенному мячу. Пространство, в котором когда-то располагались клетки мужского гаметофита, представлено лишь узкой щелью между проксимальной и дистальной экзиной. При плохой сохранности эту щель можно и не заметить. Счастливым образом для ученых именно к экзине относится подавляющее большинство признаков пыльцевых зерен, по которым можно определить, какому растению это пыльцевое зерно принадлежало. Морфологическое разнообразие пыльцевых зерен позволяет определить как минимум, к какому семейству принадлежало материнское растение. Фото показывает срез через пыльцевое зерно 1 (фото 22); частично видно и пыльцевое зерно 2 (граница между пыльцевыми зернами отмечена стрелками). Пыльцевое зерно 2 срезано в области мешка (м), а пыльцевое зерно 1 – в периферической части тела (т): виден внутренний слой оболочки (эндэкзина), он более электронно-плотный, чем наружный слой (эктэкзина). Эктэкзина дистальной стороны очень тонкая и образует аперттуру – специализированный участок оболочки, через который мужской гаметофит выходил оплодотворять женский. Мешки оказались полностью заполненными перегородками, в отличие, например, от воздушных мешков пыльцевых зерен современной сосны. Единое изображение составлено из нескольких ультратонких срезов.

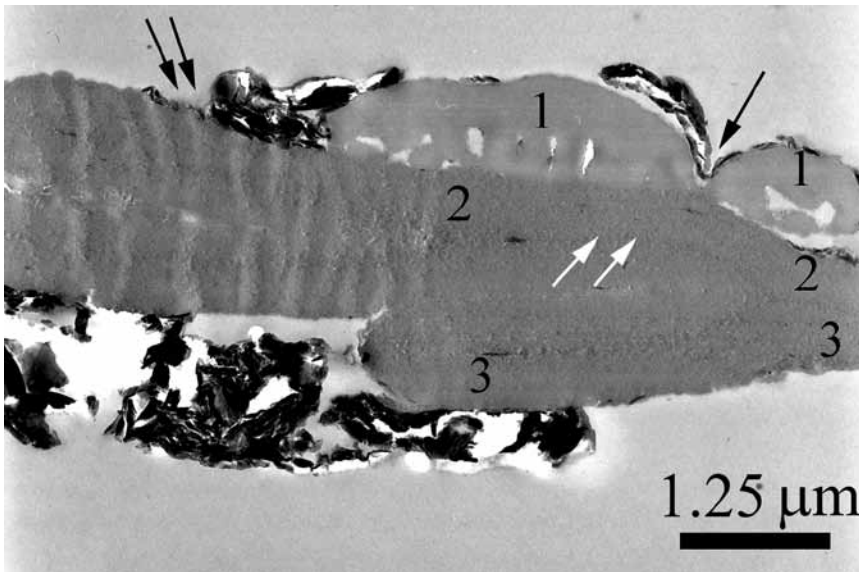


Фото 24. Участок среза в центральной части тела. С проксимальной стороны видны два ребра (1). Во впадинах между ребрами эктэксина резко утончается (черная стрелка) и исчезает (две черные стрелки). Впадины выполнены более эластичной эндэкзиной, которая была способна сминаться в складки (2 – проксимальная часть эндэкзины, 3 – дистальная часть, белые стрелки указывают положение полностью исчезнувшей в процессе фоссилизации полости пыльцевого зерна).



Фото 25. Участок среза в области ребер (обозначены звездочками). Впадины между ребрами (обозначены стрелками) выполнены эндэкзиной. Во время путешествия пыльцевого зерна из мужского генеративного органа к женскому оболочка защищала гаметофит от высыхания. В зависимости от влажности окружающей среды, ребра раскрывались или закрывались. На этой иллюстрации ребра раскрыты.

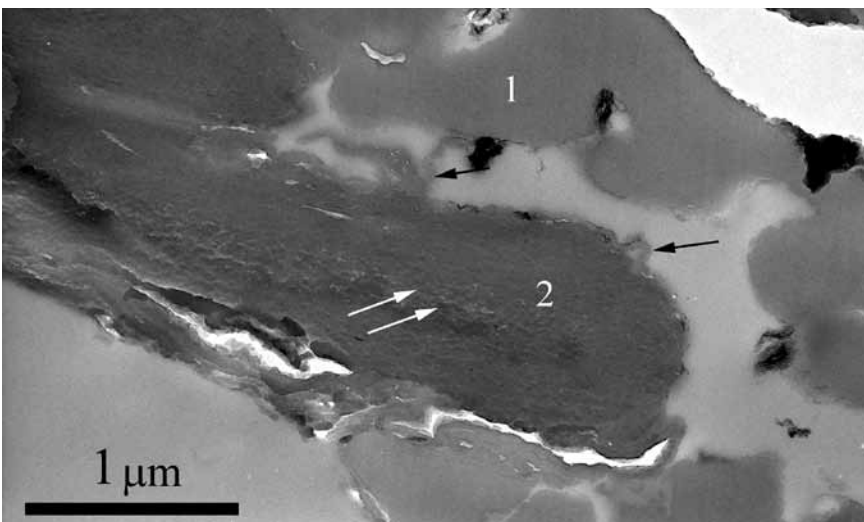


Фото 26. Участок среза в центральной части тела одного из пыльцевых зерен. Эндэкзина по ультраструктуре, вероятно, была ламеллярной, то есть состояла из стопки протяженных пластинок. В процессе фоссилизации ламеллы были сильно уплощены, и их истинную природу не всегда удается распознать. 1 – эктэксина; 2 – эндэкзина; (белые стрелки) указывают на положение полости гаметофита; (черная стрелка) показывает верхнюю из стопки ламелл. Ламеллярная эндэкзина характерна для пыльцевых зерен голосеменных растений.



Фото 27. Ископаемая летопись сохранила не всю информацию о вымерших организмах, но задача ученого: всю информацию, которая все же сохранилась, из изучаемого объекта извлечь. Нужно увидеть все детали строения, вплоть до самых мельчайших. Поэтому в арсенале палеонтолога все многообразие микроскопов. И в XIX в., и в наши дни палеонтология следует за развитием микроскопической техники, с надеждой пробуя на себе все новинки и изобретения. На фото - здание Палеонтологического института им. А.А. Борисяка Российской академии наук.

Правильное завершение исследования – это публикация в рецензируемом научном журнале. Для начала поданные рукописи оценивают несколько ученых, хорошо знакомых с проблематикой. Если качество поданной работы их убеждает, статья появляется в печати и становится доступной всему научному сообществу. В прошлые века единым языком науки была латынь, но в наше время быстрее всего становятся доступными для ученых всех стран

публикации на английском языке. Результаты этой работы опубликованы в статье *Exine ultrastructure of in situ Protohaploxypinus from a Permian peltasperm pollen organ, Russian Platform. Review of Palaeobotany and Palynology 213: 27-41*. Надежно проверенные выводы исследований становятся известными и широкой публике в научно-популярных изданиях и, наконец, попадают в учебники как основной корпус научной картины мира.