

KRYSTYNA JUCHNIEWICZ

## O METODACH BADANIA ANATOMICZNEGO LIŚCI W PALEOBOTANICE

Paleobotanicy, zajmując się szczątkami roślin ocalałymi z dawnych, nieraz bardzo odległych epok geologicznych, spotykają się z wieloma bardzo różnorodnymi trudnościami.

Pomijając nawet fakt, że im dawniejszy okres geologiczny reprezentują badane szczątki roślinne, tym mniejsze jest ich podobieństwo do współczesnych roślin, to przecież największą bodaj trudność dla badacza-paleobotanika stanowi ogromna fragmentaryczność znajdujących się szczątków roślinnych. Wypadki jednoczesnego znalezienia powiązanych ze sobą kilku różnych części rośliny jak łodyga, pień, liście, kwiaty, owoce lub nasiona — są niesłychanie rzadkie, szczególnie w odniesieniu do starszych okresów geologicznych. Tym bardziej ważne jest jak najbardziej wszechstronne i dokładne zbadanie każdego znalezionego fragmentu rośliny. Duże zastosowanie znalazły metody badań anatomicznych do kopalnego drewna oraz owoców i nasion.

Liście — jedne z najczęściej spotykanych szczątków roślinnych — są bardzo trudne do oznaczania wobec wielopostaciowości w obrębie osobników, dużej zmienności gatunkowej i występującej niejednokrotnie konwergencji morfologicznej gatunków należących do odległych nieraz jednostek systematycznych. Wykrycie systematycznej przynależności badanego szczątki liściowego wymaga więc od badacza dużego doświadczenia i wnikliwości.

Dużym ułatwieniem i potwierdzeniem oznaczenia liści na podstawie morfologicznej mogą być badania anatomiczne, o ile stan zachowania badanego szczątki liściowego na to pozwala. W wypadku, kiedy struktura morfologiczna liścia nie zachowała się lub fragment liścia jest zbyt mały do badań morfologicznych, można także stosować same badania anatomiczne (analiza nabłonkowa).

Niektórzy paleobotanicy, szczególnie starej szkoły, wysuwają zastrzeżenia co do możliwości oznaczania liści wyłącznie na podstawie analizy budowy nabłonka, podając jako argument występowanie w anatomicznej budowie nabłonka konwergencji między różnymi grupami systematycznymi. Źródłem takiego poglądu jest fakt, że pierwsze nowoczesne prace nad zastosowaniem w paleobotanice budowy nabłonka liści ukazały się zaledwie na początku XX w. (np. Karczewski 1906, Nathorst 1912 — za Potonie i Gothan 1913), a na szerszą skalę stosowane

są od niedawna. Wśród paleobotaników, którzy najbardziej przyczynili się do upowszechnienia tej metody należy wymienić Jurasky'ego, Weylanda i wielu innych. Jednak nawet w chwili obecnej, kiedy badania nad anatomią nabłonka liści posunęły się już znacznie naprzód, nieliczni tylko paleobotanicy stosują je na szeroką skalę. Wynika to stąd, że zagadnienie jest trudne i wciąż jeszcze niedostatecznie zbadane, a samo przygotowanie obiektu do badań dość pracochłonne. Przy tym wartość taksonomiczna budowy nabłonka u różnych rodzin jest niejednakowa. Wiele z nich jak np. *Coniferae*, *Gramineae*, *Cyperaceae* mają budowę ustaloną i charakterystyczną dla tych rodzin, natomiast inne rodziny np. *Palmae* i *Saxifragaceae* wykazują dość znaczne zróżnicowanie nabłonka. Jest to zresztą na ogół zgodne ze zróżnicowaniem morfologicznym tych rodzin, co wyraża się w znacznej liczbie podrodzin.

Z powodu tej różnej wartości taksonomicznej przy określaniu rodzin, wynikają zastrzeżenia pewnych badaczy nad przydatnością badań anatomicznych nabłonka przy oznaczaniu liści gatunków kopalnych. Należy jednak pamiętać, że takie same, a może i większe zbieżności obserwujemy w budowie morfologicznej liści. Różnica jest ta, że morfologię liści jako łatwiej dostępną badano już od bardzo dawna i została ona dość dokładnie przeanalizowana i spopularyzowana w botanice i paleobotanice. Systematyczne badania anatomiczne liści natomiast są ciągle jeszcze niepełne i niewystarczające oraz brak jest tak wyczerpującej klasyfikacji, jakiej dokonano dla morfologii liścia.

Metody techniczne stosowane w paleobotanice do badań anatomicznych liści mogą być różne i są zależne od sposobu i stanu zachowania szczątka.

1. W pierwszym rzędzie ważne jest, czy zachowała się substancja organiczna.

a) W wypadku gdy mamy do dyspozycji jedynie odcisk liścia bez śladów substancji organicznej — nie mamy możliwości przeprowadzenia badań anatomicznych. Jeśli jednak skała, w której zachował się odcisk liścia jest drobnoziarnista np. ił, łupek, a sam odcisk liścia wyraźny — możemy spróbować, czy nie uda się nam uzyskać obrazu anatomicznego powierzchni liścia stosując metodę mikroskopowych preparatów odlewowych.

Metoda ta polega na sporządzeniu delikatnego, przejrzystego odlewu badanej powierzchni. W tym celu przygotowujemy roztwór celoidyny lub celluloidu o konsystencji gliceryny. Można również zastosować inne znane obecnie «plastyki» jak np. polistyren, polimetakrylan butylu i inne. Różnica między nimi polega w zasadzie na użyciu innych rozpuszczalników i różnic w czasie krzepnięcia preparatów. Oczywiście najszybciej otrzymamy preparat stosując «plastyk» o najbardziej lotnym rozpuszczalniku np. eter, aceton, octan etylu.

Przystępując do sporządzenia preparatów kładziemy szklaną bagietką dużą kroplę płynnego plastyku na badanym obiekcie starając się, by pokryła ona powierzchnię nie większą niż 1 cm<sup>2</sup>. Większe preparaty przygotowane tą metodą mogą ulegać zniekształceniom, lepiej więc wykonać kilka mniejszych odlewów obok siebie. Po całkowitym wyschnięciu i utworzeniu się na obiekcie cieniutkiej błonki plastikowej — podważamy ją delikatnie na brzegach, a następnie ściągamy pincetką.

Brzegi błonki ścinamy żyłką i robimy preparat zatapiając w substancji inaczej załamującej światło niż użyty przez nas plastik lub podbarwiając ją lekko. Można też oglądać preparaty «na sucho» w świetle odbitym bądź przy użyciu kontrastu fazowego.

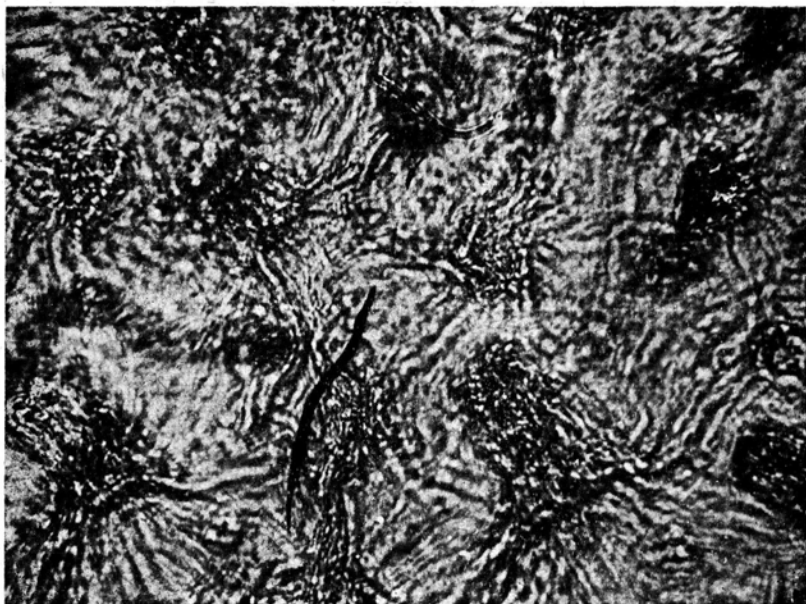
b) Jeżeli dysponujemy odciskiem liścia ze zwęgloną substancją organiczną, np. okazy karbońskie — możemy wykonać preparaty właściwej skórki liścia (Karczewski 1906, Barthel 1961, 1962).

W tym celu małym meselkiem odbijamy delikatnie od okazu fragment liścia przeznaczony do zbadania. Jest to niezbędne, gdyż w okazach karbońskich zachodzi bardzo ściśle zespolenie zwęglonej substancji organicznej ze skałą. Następnie ten odłupany odłamek skały ze zwęglonym fragmentem liścia wrzucamy do naczynka szklanego, np. próbówki i działamy kwasem, najlepiej  $\text{HNO}_3$  \*. Podgrzewając można reakcję przyspieszyć. Następnie przemywamy wodą i zalewamy rozcieńczoną zasadą np. KOH. Otrzymane fragmenty skórki (nabłonka) przemywamy ostrożnie wodą destylowaną i sporządzamy zwykłym sposobem preparat przeglądowny w glicerynie lub trwały w glicerożelatynie.

Najszerze możliwości stosowania badań anatomicznych liści wobec częstotliwości występowania odpowiednio zachowanej substancji organicznej mamy w kopalnych florach trzecio- i czwartorzędowych. We florach tych okresów odciski liści wraz z substancją organiczną pozwalającą na zbadanie anatomiczne spotykamy najczęściej w iłach i glinkach. Niekiedy w iłach przewarstwiających trzeciorzędowe węgle brunatne występują warstwy o dużym nagromadzeniu fragmentów liści, gałązek, łusek i innych szczątków roślinnych w postaci sieczki. W tym ostatnim przypadku bryłę ze szczątkami roślinnymi należy rozgotować w zwykłej wodzie lub lepiej z dodatkiem KOH, przepłukać dokładnie na sicie i wyłowić fragmenty nabłonka lub liści (tzw. szlamowanie). Jeżeli liście zachowane są w ile — rozgotowywanie nie zawsze jest konieczne dla wydobycia szczątków liści, gdyż rozłupując ił zgodnie z uławiceniem znajdujemy często odciski liści z pozostałymi na nich częściami organicznymi dającymi się łatwo zdjąć, np. we florze trzeciorzędowej Turowa. Fragmenty substancji organicznej liści (kutykule) występują również czasem w węglach brunatnych (Jählichen, diss.) i także dają się łatwo oddzielić. Unikalnym stanem zachowania liści kopalnych jest warstwa liściowa w eoceńskim węglu brunatnym w Geiseltal (NRD) składająca się z samych liści doskonale w całości zachowanych — tzw. «Blätterkohle». Również bardzo dobrze zachowane szczątki liści spotyka się w złożu mioceńskim Wiesa k. Kamieńca (NRD).

We wszystkich wspomnianych przypadkach możemy postępować podobnie, mianowicie umieszczamy badany fragment liścia w szklanym naczyniu i przeprowadzamy macerację jednym z poniższych sposobów.

\* Chcąc otrzymać preparat morfologiczny całego liścia, przyklejamy obiekt stroną organiczną do szkiełka, zabezpieczamy powierzchnię szkiełka np. parafiną, a następnie rozpuszczamy ostrożnie skałę przy pomocy kwasu fluorowodorowego (konieczne specjalne digestorium i odpowiednie naczynia). Wy-preparowany w ten sposób liść po dokładnym wymyciu można następnie macerować jednym ze zniższych sposobów.



Rys. 1. Nabłonek liścia kopalnego pnącza *Dioscorea* sp. (*Dioscoreaceae*). Ze zbiorów paleobotanicznych Muzeum Ziemi PAN. Flora kopalna Turowa k. Bogatyni. Pow. ca 1000 $\times$ . — Fot. K. J.

Maceracja przy pomocy wody utlenionej jest bardzo powolna i słabo działająca — stosujemy ją więc do najbardziej delikatnego materiału. Jest to środek prosty i znany, toteż nie omawiam bliżej jego stosowania.

Maceracja wodą Javelła jest nieco silniejsza, ale również dość delikatna.

Maceracja kwasem azotowym: skrawek zalewamy rozcieńczonym  $\text{HNO}_3$  na kilka godzin lub dłużej. Następnie przemywamy wodą destylowaną. Jeśli maceracja zaszła w stopniu niezadowalającym — można zalać słabym roztworem amoniaku lub rozcieńczoną zasadą na kilka minut i znowu przemyć kilkakrotnie wodą.

Maceracja mieszaniną Schultzego jest najczęściej stosowana. Zachodzi podobnie do poprzedniej, ale jest nieco silniejsza i szybsza. Mieszaninę Schultzego przygotowujemy w butelce z doszlifowanym korkiem, zalewając rozcieńczonym kwasem azotowym nieco  $\text{KClO}_3$  i następnie mieszając do rozpuszczenia. Po nasyceniu roztworu powinien na dnie pozostać nadmiar  $\text{KClO}_3$ . Dobry efekt daje zalanie obiektu na parę minut słabym roztworem amoniaku — po dokładnym rozmiękczeniu go w mieszaninie Schultzego i wypłukaniu wodą destylowaną. Zamiast amoniaku można używać buforu fosforanowego o pH 7,4—8,0, przerywając następnie jego działanie dodaniem 20% roztworu  $\text{NaCl}$ .

Maceracja mieszaniną  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + bezwodnik kwasu octowego — jest silniejsza od poprzednich i może być stosowana tylko do grubego i twardego materiału liściowego, a więc do liści kopalnych stosunkowo niezbyt często znajduje zastosowanie. Metoda ta jest bardzo szybka. Wadą jej jest, że należy bardzo uważać



Rys. 2. Dla porównania nabłonek liścia gatunku współczesnego *Dioscorea glabra* Roxb. Zielnik Uniw. Wrocławskiego: okaz z Indii nr 324, zebr. Meebold w 1896 r. — preparat nr 331 z kolekcji Prac. Paleob. Muzeum Ziemi PAN. Pow. ca 1000 ×. — Fot. K. J.

w trakcie maceracji, aby skrawki nie uległy całkowitemu zniszczeniu. Mieszaninę używamy w stosunku 1 cz.  $H_2SO_4$  i 9 cz. bezwodnika kwasu octowego. Skrawek zalany tą mieszaniną podgrzewamy powoli na łaźni wodnej, sprawdzając co pewien czas stopień maceracji. Przemywamy w wodzie.

Przygotowanie preparatów. Po przeprowadzeniu maceracji jedną z opisanych metod (ewentualnie inną odpowiadającą nam) przystępujemy do sporządzenia preparatu. Należy przy tym pamiętać, że materiał kopalny jest znacznie delikatniejszy i bardziej kruchy od współczesnego i należy go traktować możliwie najostrożniej. W tym celu dobrze jest stosować do przenoszenia obiektu — zarówno w czasie maceracji, jak i w czasie przygotowywania preparatu — małą pipetkę z gumką, o dość szerokim otworze wlotowym. Przy obiektach większych wygodnie jest stosować szklaną bagietkę.

Najpraktyczniejsze jest przygotowanie trwałych preparatów w glicerożelatynie. Mają one tę zaletę, że technika zatapiania obiektu jest bardzo prosta i nie wymaga odwadniania, a więc unikamy niebezpieczeństwa dalszego niszczenia i kruszenia obiektu.

Barwienie preparatów często jest zbędne wobec naturalnego, żółtawego zabarwienia kopalnego nabłonka lub skórki. Jeśli preparat jest zbyt blade, lepiej go zabarwić jednym z barwników używanych do analogicznych preparatów z roślin współczesnych, a więc np. safranina dla błon celulozowych skutynizowanych, Sudan III lub IV dla kutykuli.

**Badania mikroskopowe i oznaczanie.** Wykonawszy trudną zazwyczaj i czasochłonną pracę przygotowania preparatów nabłonkowych z materiału kopalnego — możemy przystąpić do ich oznaczania. W pierwszym rzędzie należy zanalizować budowę wypreparowanego nabłonka. Do tego celu wystarczy w zasadzie zwykły mikroskop biologiczny. Niekiedy jednak konieczne jest zastosowanie do obserwacji mniej pospolitych urządzeń, wśród których na pierwszym miejscu należy wymienić kontrast fazowy. Wielkim ułatwieniem pracy nad oznaczaniem jest wykonanie rysunków i mikrofotografii obiektu badanego.

Ostatnim etapem jest przeprowadzenie studiów porównawczych i oznaczenie badanego szczątka liściowego (por. rys. 1, 2).

**Uwagi końcowe.** Opisane wyżej metody maceracji zostały podane od najslabiej działających do najsilniejszych, lecz oczywiście zależy to również od stężenia odczynników i czasu przeprowadzania reakcji. Przy wyborze którejkolwiek z podanych metod maceracji trzeba zawsze pamiętać, że przy opracowywaniu każdego nowego materiału musimy dla niego wypróbować najwłaściwszą metodę, najkorzystniejsze stężenie odczynników i ustalić optymalny czas trwania reakcji. Nie ma metod uniwersalnych. Szczegółowa metoda opracowana dla jednej flory kopalnej może okazać się niewłaściwa dla innej. Każdy badany materiał kopalny wymaga indywidualnego traktowania.

Na zakończenie należy stwierdzić, że przy badaniu i oznaczaniu kopalnych szczątków liści ważne jest posiadanie kolekcji preparatów porównawczych z materiałów współczesnych bądź kopalnych. Korzystanie z opisów, rysunków i fotografii w literaturze jest dużą pomocą, ale często jest niewystarczające zarówno ze względów technicznych, jak i braku wyczerpujących publikacji w tym zakresie. W Polsce największą kolekcją nabłonkowych preparatów gatunków współczesnych dostosowanych do badań flor trzeciorzędowych (pochodzenie i dobór gatunków) dysponuje Pracownia Paleobotaniczna Muzeum Ziemi PAN w Warszawie.

#### LITERATURA

- Bandulska H., 1923. A Preliminary Paper on the Cuticular Structure of certain Dicotyledonous and Coniferous Leaves from the Middle Eocene Flora of Bournemouth. *Journ. Linn. Soc. Bot.* vol. XLVI, No 308, s. 241—269.
- Barthel M., 1961. Zur Methode der Bestimmung isolierter Pteridospermen-Fiedern. *Geologie*, Jg. 10, H. 6, Berlin, s. 716—719.
- Barthel M., 1962. Epidermisuntersuchungen an einigen inkohlten Pteridospermenblättern des Oberkarbons und Perms. *Geologie*, Jg. 11, Beih. 33, Berlin.
- Darrah W. C., 1952: The materials and methods in Paleobotany. *The Paleobotanist* 1, s. 145—153, 2 pl.
- Filutowicz A. i Kuźdowicz A., 1951. *Mikrotechnika roślinna*. Warszawa PWRiL.
- Harris T. M., 1956. The fossil plant cuticle. *Endeavour* 15, s. 175—176.
- Hofmann E., 1934. *Paläohistologie der Pflanze*. Wien, Springer.
- Johansen A., 1940. *Plant microtechnique*. New York and London.
- Jurasky K., 1939. Die Macerationsmethoden in d. Paläobotanik. *Handbuch d. biolog. Arbeitsmethoden* Abt. XI, Teil 4, s. 331—352.

- Karczewski St., 1906. O budowie mikroskopowej węgla kamiennego z Dąbrowy Górniczej. Pamiętnik Fizyograficzny T. XIX, Warszawa.
- Kräusel R., 1950. Die paläobotanischen Untersuchungsmethoden. Jena.
- Kräusel R., 1953. Neue Preparationsmethoden. Proc. 7th International Botanical Congress, Stockholm, s. 585.
- Lacey W. S., 1953. Methods in Palaeobotany. Northwest. Naturalist 1 (2), s. 234—249, 3 fig. 1 pl.
- Leclercq S. i Discry M., 1953. Preparation of fossil plants in transparent mounting. Proc. 7th International Botanical Congress, Stockholm, s. 597.
- Lilpop J., 1925. Metoda mikroskopowa w badaniach węgla kopalnych. Kosmos, vol. 50, zeszyt IV, Lwów, s. 1393—1401.
- Linsbauer K., 1930. Die Epidermis. Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. IV, Berlin.
- Nathorst, 1912. Einige paläobotanische Untersuchungsmethoden. Paläobotanische Zeitschrift, H. 1.
- Potonié H. i Gothan W., 1913. Paläobotanisches Praktikum. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Reymanówna M., 1960. Brytyjskie metody badań paleobotanicznych. Przegl. Geol. VIII, No. 1, s. 48—50, Warszawa.
- Sommer F. W., 1950. Métodos de pesquisa paleobotanica. A maceracao base de analise cuticular. An. Acad. Brasil. Cienc. 22 (4), s. 421—439.
- Stach E., 1932. Die Kutikulen der Steinkohle. Glückauf 68, s. 857—863, 15 Textfig., Essen.
- Stälfelt M. G., 1939. Neuere Methoden zur Ermittlung d. Öffnungszustandes d. Stomata. Handbuch d. biologischen Arbeitsmethoden v. Abderhalten. Berlin—Wien.
- Straus A., 1933. Einige Bemerkungen zur Bestimmung und über die Erhaltung fossiler Angiospermblätter. Fedde, Rep. Beih. 71, s. 221—223, 2 Taf., Berlin.
- Swieszniakowa I. N., 1952. Primienienje anatomiczeskowo issledowanja epidermisa i kutikuly pri opredelenji iskopajemoj chwoi. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 34 (1), s. 135—137.
- Weyland H., 1954. L'identification de feuilles d'Angiospermes d'après l'examen de leurs épidermes. Rapp. et Comm. du 8me Congrès International de Botanique, Paris, sect. 5, s. 189—190.