

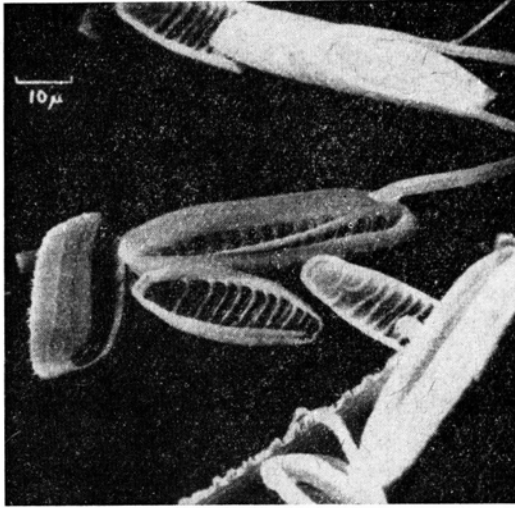
LEON STUHLIK

## ZASTOSOWANIE NOWYCH TECHNIK MIKROSKOPOWYCH W PALINOLOGII

W historii badań morfologii ziarn pyłku i spor można wyróżnić trzy okresy. Okres pierwszy — najdłuższy — trwał ponad sto lat. Pierwsze bowiem dokładniejsze opisy morfologiczne ziarn pyłku pojawiły się w latach trzydziestych ubiegłego wieku, głównie w pracach von Mohla (1834) i Fritschego (1832, 1837). Dalszym ważnym etapem w poznaniu budowy morfologicznej sporomorf była praca Fischera (1890), która dała podstawy nowoczesnej palinologii. W całym tym okresie, trwającym aż po lata czterdzieste obecnego stulecia, posługiwano się w badaniach morfologii ziarn pyłku i spor wyłącznie mikroskopem optycznym. Poznano w tym czasie zasadnicze elementy budowy morfologicznej sporomorf. Powstały również bardziej szczegółowe opisy ziarn pyłku gatunków należących do różnych rodzin. Nie poznano jednak szeregu drobniejszych elementów budowy błony komórkowej ziarna oraz nie zdołano wnikać w jej submikroskopową budowę. Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest bowiem ograniczona, więc starano się ją zwiększyć przez konstruowanie coraz to doskonalszych obiektywów o wyższych numerach aperturycznych, i wreszcie stosując światło ultrafioletowe do oświetlania badanych obiektów. Wiadomo bowiem, że zdolność rozdzielcza mikroskopu jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali światła użytego do oświetlenia ( $P = A_{obj} \cdot d \cdot \alpha / \lambda$ ). Zdolność rozdzielcza mikroskopu do światła ultrafioletowego (UV) jest zaledwie dwukrotnie większa od zwykłego, niemniej można przy jego pomocy uzyskać poprawne powiększenia rzędu 4 tysiące razy, co przyczyniło się do lepszego poznania stratyfikacji błony komórkowej ziarna pyłku. Nie wystarczyło to jednak do poznania jej submikroskopowej budowy. Dopiero wprowadzenie do badań ultracienkich skrawków i użycie mikroskopu elektronowego przyczyniło się do poznania submikroskopowej budowy błony komórkowej sporomorf.

Na przełomie lat czterdziestych i pięćdziesiątych obecnego stulecia rozpoczął się drugi okres w historii badań morfologii ziarn pyłku i spor. Badania przeprowadza się na ultracienkich skrawkach przy użyciu mikroskopu elektronowego. Grubość

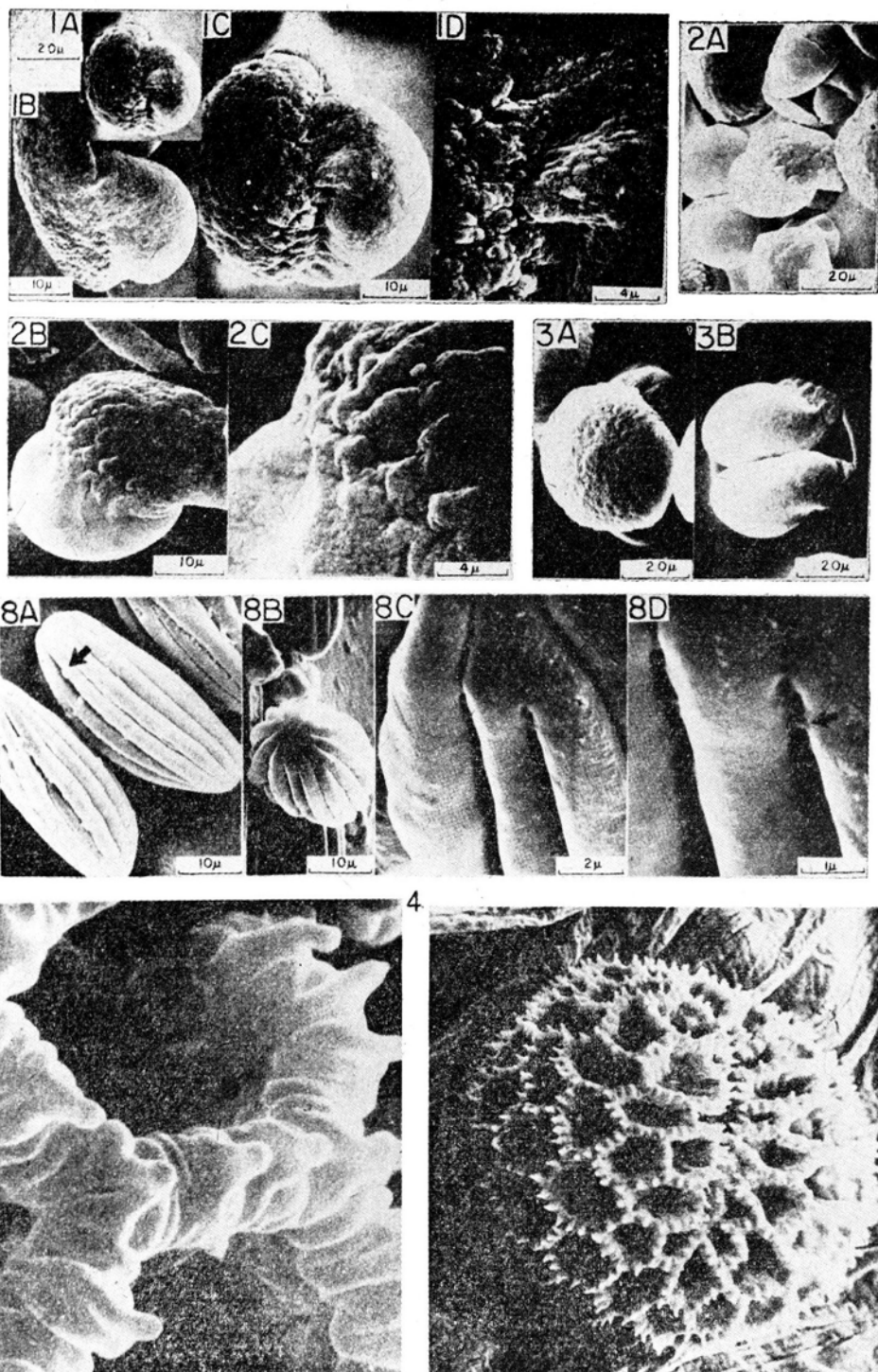
skrawków waha się w granicach od 100 do 700 Å ( $1 \text{ mm} = 1000 \mu$ ;  $1 \mu = 10\,000 \text{ Å}$ ). W celu zwiększenia kontrastu skrawki poddawane są działaniu jednego z szeregu środków kontrastujących (czterotlenek ołowiu, wodorotlenek ołowiu, octan uranylu i in.). Podwyższenie kontrastu w badanym obiekcie polega na odłożeniu na nim atomów o wysokiej liczbie atomowej. Mają one dzięki temu większą zdolność uginania elektronów niż atomy węgla, tlenu, azotu czy wodoru, wchodzące w skład organizmów żywych.



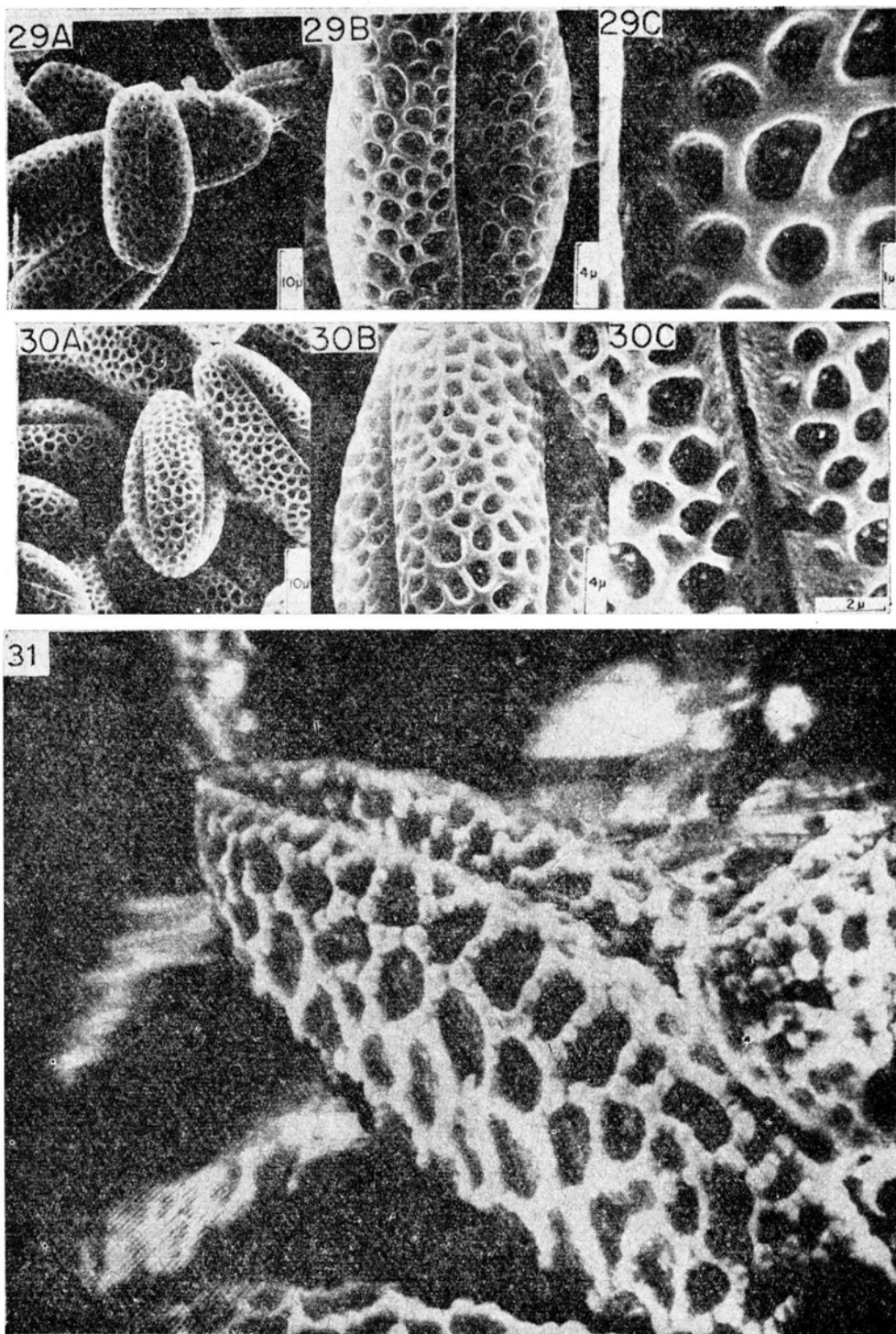
Ryc. 1. Okrzeski (fotografia spod mikroskopu elektronowego skanningowego)

Badania stratyfikacji błony komórkowej ziarna pyłku przy pomocy mikroskopu elektronowego wyjaśniły budowę wielu skomplikowanych elementów struktury, a ich wyniki są często wykorzystywane w taksonomii i filogenii. Nie sposób tu omówić wszystkich przykładów wykorzystania tych badań w taksonomii. Wspomnę tylko o jednym, jak mi się wydaje bardzo znamionym przykładzie. Gullvåg (1966) badając pokrewieństwo pomiędzy *Ephedra*, *Welwitschia*, *Gnetum* i innymi *Gymnospermae* stwierdziła duże podobieństwo w submikroskopowej budowie błony komórkowej ziarna pyłku tych rodzajów z wyjątkiem *Gnetum*. Wszystkie okrytonasienne mają całą błonę komórkową ziarna pyłku lamellowaną. Zarówno część zewnętrzna egzyny — seksyna — jak też jej część wewnętrzna, neksyna, zbudowane są z licznych równoległe ułożonych lamelli. Utworzone one są z regularnie obok siebie ułożonych drobin sporopollenin. U *Gymnospermae* lamellowana jest tylko neksyna a seksyna ma budowę ziarenkowatą. Drobiny sporopollenin w seksynie nie są ułożone regularnie lecz chaotycznie. Ziarna pyłku *Gnetum* mają na powierzchni zredukowane kolce, takie same, jakie spotykamy u roślin owadopylnych. Kolce te utworzone są z najbardziej zewnętrznej lamelli podobnie jak u *Polygala*. U *Gnetum* cała eksyna jest lamellowana jak u *Angiospermae*, co nasunęło autorce przypuszcze-

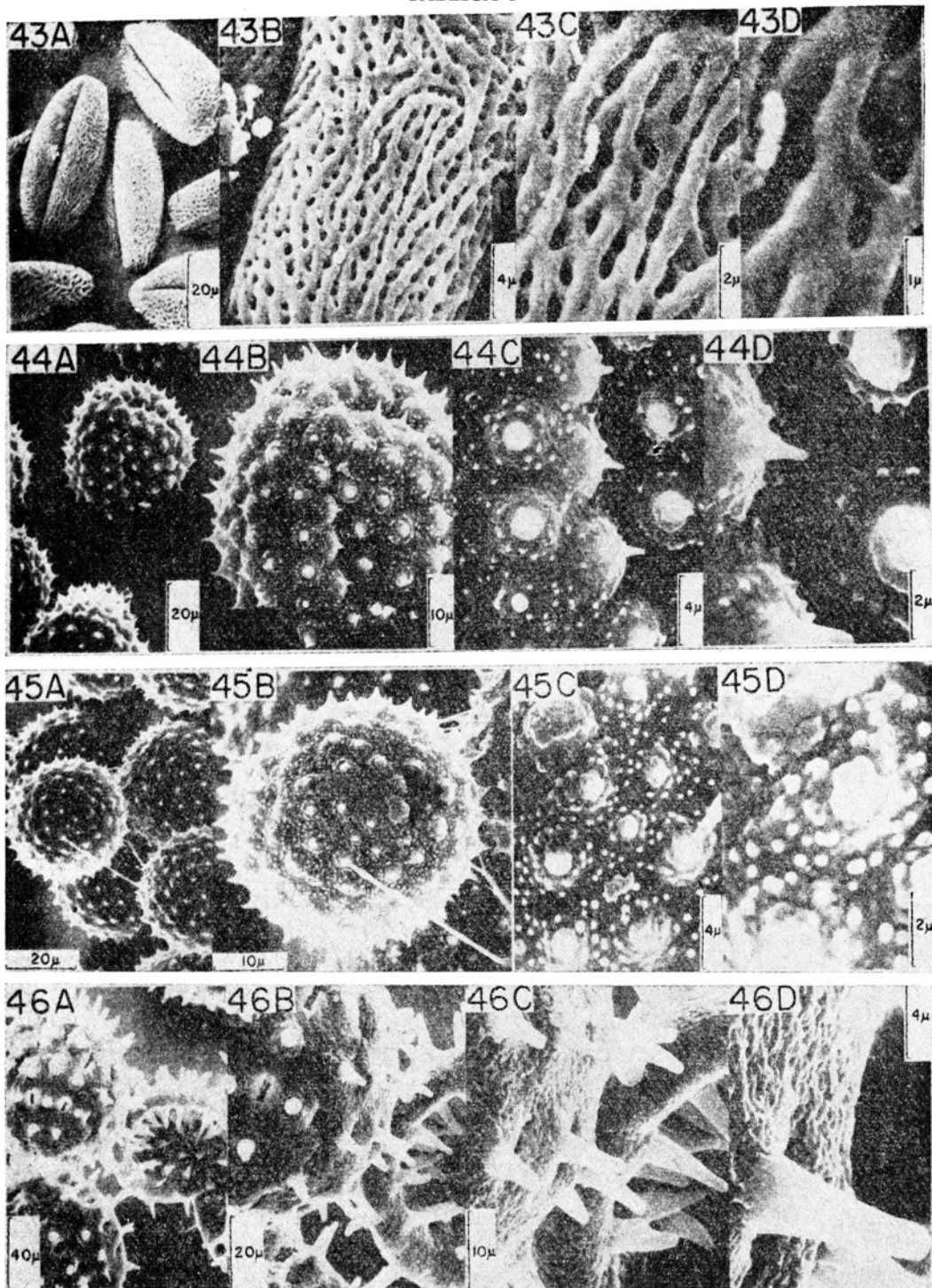
TABLICA 1



1 — *Pinus cembroides*; 2 — *Pinus edulis*; 3 — *Pinus ponderosa*; 4 — *Armeria maritima*; 8 — *Ephedra trifurca*



29 — *Cercidium microphyllum*; 30 — *Cercidium floridum*; 31 — *Lilium*



43 — *Acer grandidentatum*; 44 — *Sphaeralcea* sp.; 45 — *Sphaeralcea* sp.; 46 — *Hibiscus coulteri*  
 Zdjęcia wykonane na mikroskopie stereoskan (fot. 4 za G. Erdtman i A. Dunbar; fot. 31 za G. Erdtman;  
 pozostałe za P. S. Martin i C. M. Drew)

nie, że *Gnetum* należałoby raczej uważać za zredukowaną roślinę okrytozalążkową aniżeli doszukiwać się pochodzenia tego rodzaju od jakiegoś wspólnego przodka z *Gymnospermae*. Podobne przypuszczenie wysuwano już wcześniej na podstawie badań anatomicznych i morfologicznych tego rodzaju.

Przy pomocy mikroskopu elektronowego zwykłego tj. o elektronach przechodzących (tzw. Transmission Electron Microscop) nie można zbadać mikroreliefu powierzchni ziarna pyłku. Jeśli elementy skulptury na powierzchni ziarna rozmieszczone są bardzo luźno, poszczególne cięcia na ultramikrotomie mogą nie natrafić na nie. Nie możemy wtedy stwierdzić ani ich obecności, ani też poznać bliżej budowy. Do badania mikroreliefu powierzchni ziarna pyłku zaczęto więc stosować tzw. metodę replik powierzchniowych (Bradley 1954, 1958). Jest to metoda bardzo żmudna i polega na powlekanii powierzchni sporomorfy cienką błonką węgla grubości 100—200 Å. Sporomorfy należy przedtem odvodnić w alkoholach i powlec cienką warstwą gliceryny. Nakrapianie węglem odbywa się w komorze próżniowej, gdzie ziarna pyłku znajdują się na obrotowym stoliku pod elektrodą węglową. Po wyjęciu preparatu z próżni umieszcza się go na okres 3 godzin w kwasie chromowym, w celu rozpuszczenia ziarna pyłku. Błonki węglowe z dokładnym odbiciem powierzchni ziarna wypływają na powierzchnię, skąd są zbierane bezpośrednio na siatki mikroskopowe i badane przy pomocy mikroskopu elektronowego. W niektórych przypadkach dla uzyskania lepszego obrazu przeprowadza się jeszcze dodatkowe ukośne cieniowanie gęstszym materiałem dla podkreślenia powierzchniowych detali. Węgiel jest dla elektronów przepuszczalny więc błonki te bada się podobnie jak cienkie skrawki. Na kliszy fotograficznej uzyskuje się dokładny obraz mikroreliefu powierzchni ziarna pyłku. Poza węglem do metody replik powierzchniowych używa się również aluminium. Przy pomocy replik powierzchniowych zbadano szereg sporomorf, jednak metoda ta nie zadowalała badaczy, gdyż była bardzo uciążliwa, i nie zawsze można było wykonać odpowiednio dobre repliki powierzchniowe, zwłaszcza z materiału uboższego w pyłek.

W ostatnich latach zastosowano wreszcie do badań morfologii ziarna pyłku i spor mikroskop elektronowy skanningowy (nazywany również mikroskopem rastrowym), którego najnowszym modelem jest Stereoscan MK II, produkowany przez angielską firmę Cambridge Lmdt. W tym najmłodszym okresie badań morfologicznych otwarły się przed badaczami kolosalne możliwości zbadania najdrobniejszych elementów skulptury i lepszego poznania przestrzennej budowy ziarna pyłku. Zasada działania mikroskopu elektronowego skanningowego jest odmienna od normalnego, elektrony nie przechodzą przez badany obiekt lecz są od jego powierzchni niejako odbijane. Schemat działania mikroskopu elektronowego skanningowego przedstawiony jest szczegółowo w prospekcie Stereoscan Electron Microscope Cambridge Instrument Comp., Ltd. List 178, Sheet A.

Emitowane przez elektrody elektrony (wiązka pierwotna) przechodzą przez trzy zestawy soczewek magnetycznych, których zadaniem jest skupianie strumienia elektronów. Pomiedzy drugą a trzecią soczewką końcową znajdują się ponadto

cewki odchylające elektrony. Wreszcie za ostatnim zestawem soczewek znajduje się końcowa apertura i elektrony po przejściu przez nią padają na badany obiekt. Po zetknięciu się z jego powierzchnią część z nich odbija się, a część wywołuje wtórną emisję elektronów. Następnie wszystkie elektrony gromadzą się w specjalnym kolektorze, który jest połączony z obwodem skanningowym i wizualnym. (Elektrony są niejako wymiatane do kolektora). Obraz na ekranie powstaje na zasadzie obrazu telewizyjnego na lampie oscylografowej.

Obraz, jaki uzyskujemy z mikroskopu skanningowego, jest podobny do obrazu z mikroskopu do światła odbitego, jednakże o znacznie większej zdolności rozdzielczej i większej głębi ostrości. Zdolność rozdzielcza jest to najmniejsza odległość pomiędzy dwoma punktami które można jeszcze rozróżnić. Zdolność rozdzielcza mikroskopu optycznego o najlepszych obiektywach wynosi 2000 Å, mikroskopu elektronowego zwykłego 3—10 Å, a stereoskanu 150 Å. W mikroskopie elektronowym skanningowym uzyskujemy głębię ostrości 300 razy większą aniżeli w mikroskopie optycznym. Przy największych powiększeniach mikroskopu optycznego głębia ostrości wynosi około 1000 Å, stereoskanu zaś odpowiednio 300 000 Å (= 30 μ) przy powiększeniach rzędu 150 000 razy. Przy powiększeniach mniejszych głębia ostrości stereoskanu praktycznie jest większa aniżeli cały badany obiekt np. glon czy ziarno pyłku. Ziarna pyłku mogą być oglądane w swych naturalnych kształtach na obrazach trójwymiarowych.

W literaturze palinologicznej coraz częściej pojawiają się opisy morfologiczne ziarn pyłku całych grup roślinnych, opracowane na podstawie stereoskopowych obrazów uzyskanych dzięki zastosowaniu mikroskopu skanningowego stereoskanu. Dzisiaj już niesposób sobie wyobrazić nowoczesnych badań palinologicznych tak dla celów taksonomicznych, jak i paleobotanicznych bez stosowania tego mikroskopu. Jego zastosowanie jest zresztą bardzo szerokie w metalurgii, przemyśle szklanym, włókienniczym, w medycynie, w różnych działach biologii, np. algologii i palinologii.

W polskiej literaturze biologicznej pojawiła się ostatnio polska nazwa mikroskopu elektronowego skanningowego. A. Krzysztofowicz (1970) proponuje nazwanie go „lupą elektronową“. Wprowadzenie tej nazwy do piśmiennictwa polskiego nie wydaje mi się słuszne. Nie powinno się w takich przypadkach wprowadzać jeszcze jednego nowego terminu do i tak już bogatej terminologii naukowej, lecz pozostawić jedynie spolszczoną nazwę angielską mikroskop elektronowy skanningowy. Termin „lupa elektronowa“ jest ponadto nielogiczny. Nazwa lupa nie odnosi się bowiem do rodzaju otrzymanego obrazu lecz do powiększenia jakie uzyskujemy stosując odpowiedni przyrząd. W przypadku stereoskanu nie można więc mówić o lupie, skoro uzyskiwane powiększenia są rzędu do 150 000 razy. Nikt przecież lupą nie nazywa zwykłego mikroskopu optycznego do światła odbitego (np. mikroskopów używanych w metalurgii i mineralogii), w którym można otrzymać powiększenia rzędu 2000 razy. Jedynie tzw. mikroskopy stereoskopowe o największych powiększeniach 4×25 (100×) potocznie są nazywane lupami binokularnymi.

## LITERATURA

- Bradley D. E., 1954. *Evaporated carbon films for use in electron microscopy*. Brit. J. appl. Phys., 5, 65.
- Bradley D. E., 1958. *The study of pollen grain surfaces in the electron microscope*. New Phytol., 57; 226.
- Erdtman G., 1965. *Fine relief of the pollen surface in Eranthemum and Lilium*. Svensk Naturvetenskap 18; 300.
- Erdtman G., Dunbar A., 1966. *Notes on electron micrographs illustrating the pollen morphology in Armeria maritima and Armeria sibirica*. Grana Palynol. 6 (3); 338—354.
- Fischer H., 1890. *Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Pollenkörner*. Breslau.
- Fritzsche J., 1832. *Beiträge zur Kenntniss des Pollen*. 1. Berlin, Stettin, Ebling.
- Fritzsche J., 1837. *Ueber den Pollen*. Mém. Sav. Étrang. Acad. Sci. Pétersb., 3; 122.
- Gullvåg B. M., 1966. *The fine structure of some Gymnosperm pollen walls*. Grana Palynol. 6 (3); 435—475.
- Krzysztofowicz A., 1970. *Lupa elektronowa — Stereoskan MK IIa*. Wszechświat 1970 r. (3): 75—76.
- Martin P. S., Drew C. M., 1969. *Scanning electron photomicrographs of Southwestern pollen grains*. Journ. Arizona Acad. Scien. 5 (3); 147—154.
- Mohl H., 1834. *Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Gewächse. Erstes Heft. Über den Bau und die Formen der Pollenkörner*. Bern.
- Prospekt Stereoscan electron microscope. Cambridge Instrument Company Limited.