



透射电子显微镜(TEM)技术在大孢子化石 超微结构研究中的应用*

彭辉平¹ 刘 锋^{1,2,3**} 朱怀诚¹

¹ 中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008;

² 现代古生物学和地层学国家重点实验室, 南京 210008, liufeng@nigpas.ac.cn;

³ 中国科学院生物演化与环境卓越创新中心, 南京 210008

摘要 透射电子显微镜(TEM)具有优异的纳米尺度显微成像性能, 因此被广泛应用于材料科学、物理学和生物学等学科的超微结构研究领域。文中根据应用 TEM 技术研究大孢子化石壁超微结构的实践体会, 系统归纳和总结了大孢子化石 TEM 样品制备的前处理过程, 主要步骤包括: 材料选取、梯度脱水、包埋剂配比、梯度渗透、包埋、聚合、超薄切片和染色。运用上述 TEM 实验技术, 文中以云南省曲靖市沾益区龙华山剖面中泥盆统吉维特阶上双河组分散拟网龙华山大孢(*Longhuashanispora reticuloides* Lu and Ouyang, 1978)的壁层超微结构为研究案例, 揭示了这类孢子壁主要由三层薄壁组成, 包括内部基层、中部疏松层和外部致密层, 其射线层基层下部具有近平行排列的多细纹带结构。此类大孢子的多细纹带结构与从加拿大新不伦瑞克省下泥盆统埃姆斯阶 Campbellton 组同孢植物化石 *Leclercqia complexa* Banks et al., 1972 中发现的原位小孢子射线层基层下部的多细纹带结构特征非常相似。此外, 两者都具有相似的完全弓形脊和远极表面刺瘤状二型纹饰。因此综合外壁超微结构和纹饰形态特征, 文中认为 *Longhuashanispora reticuloides* 的母体植物可能属于同孢植物向异孢植物演化过程中的过渡类型植物, 并与 *Leclercqia complexa* 具有较近的亲缘关系。当前研究表明 TEM 技术在孢粉化石壁超微结构研究领域中具有独特优势, 可为深入研究大孢子形态分类和揭示其与母体植物的亲缘关系提供新的线索, 也可以被推广和应用到其他微体有机壁类化石的超微结构研究。

关键词 透射电子显微镜 超薄切片 超微结构 大孢子化石 孢粉学

中文引用 彭辉平, 刘 锋, 朱怀诚, 2020. 透射电子显微镜(TEM)技术在大孢子化石超微结构研究中的应用. 古生物学报, 59(2): 238–249. DOI: 10.19800/j.cnki.aps.2020.02.10

英文引用 Peng Hui-ping, Liu Feng, Zhu Huai-cheng, 2020. Transmission electron microscope (TEM) — a useful tool for the study of exine ultrastructure of the fossil megaspore. Acta Palaeontologica Sinica, 59(2): 238–249. DOI: 10.19800/j.cnki.aps.2020.02.10

投稿日期: 2019-08-21; 改回日期: 2019-11-05; 录用日期: 2020-02-28

* 现代古生物学和地层学国家重点实验室自主选题项目(Y826010111)资助。

** 通讯作者: 刘锋, 研究员, 主要从事晚古生代孢粉学研究。

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (TEM) — A USEFUL TOOL FOR THE STUDY OF EXINE ULTRASTRUCTURE OF THE FOSSIL MEGASPORE

PENG Hui-ping¹, LIU Feng^{1, 2, 3} and ZHU Huai-cheng¹

¹ Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

² State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy, Nanjing 210008, China, liufeng@nigpas.ac.cn;

³ Center for Excellence in Life and Palaeoenvironment, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract The transmission electron microscope (TEM) has an excellent performance on revealing the nanoscale structure of the most solid body. It thus has been widely used in various studies of Materials Science, Physics, Biology as well as some associated areas. Here we summarize the detailed laboratory procedures of the sample preparation for TEM, including the pre-treatment process, material selection, gradient dehydration, resin preparation, embedding, polymerization, ultrathin section preparation, and staining based on our recent study of the fossil megaspore ultrastructure. By using the TEM techniques described here, the exine ultrastructure of *Longhuashanispora reticuloides* Lu and Ouyang, 1978, which was recovered from the Middle Devonian Givetian Shangshuanghe Formation of the Longhuashan section in Zhanyi County, Yunnan Province was investigated in detail. Its exine is composed outwardly by the innermost multilamellate zones, the basal lamina, the spongy region, and the solid region. *Longhuashanispora reticuloides* from the Longhuashan section shows the closest affinity with the fossil plant *Leclercqia complexa* by the similar spinous-verrucate bifurcated processes and the multilamellate zones at the base of the labrum of *in situ* microspores of *L. complexa*. *Longhuashanispora reticuloides* shares ultrastructural and morphological characteristics of *in situ* spores yielded by both the heterosporous and homosporous ligulate lycopods. Its parent plant probably represents a transitional form from the homosporous ligulate lycopods to the heterosporous ligulate lycopods. The present study demonstrates that scientists can obtain a clear and intact TEM image of fossil megaspore through experimental procedures described here. Thus, TEM deserves to be applied in the studies of other fossils with an organic wall.

Key words Transmission electron microscope, ultrathin section, ultrastructure, fossil megaspore, Palynology

1 透射电子显微镜技术

透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM), 简称透射电镜, 它的工作原理是把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上(厚度一般小于 100 nm), 由于电子与样品中的原子碰撞而改变方向, 从而产生电子的立体角散射。电子的散射角的大小与样品的密度和厚度相关, 因此穿过样品的电子可以形成明暗不同的影像, 影像被放大、聚焦后在成像器件上显示出来, 就形成了人们肉眼可见的 TEM 影像(<https://baike.baidu.com/item/透射电子显微镜>)。根据粒子波长方程, 电子的德布罗意波长(De Broglie wavelength)比可见光波长至少低一个数量级, 因此以电子为光源的透射电镜在理论上能够实现对原子级尺度物质的观察。依照这个设想, 德国工业大学(Technical University of Berlin)

Max Knoll 和 Ernst Ruska 博士于 1931 年共同设计并制造了世界首台透射电镜。此后, 透射电镜得到了不断的改进, 克服了多重技术困难(消除球面相差、相差对比、环形暗场成像技术和 3D 成像技术等), 并配备了不同功能的组件(扫描电子显微设备、场发射电子枪、能谱仪等)(李斗星, 2004)。当今高分辨率透射电镜的分辨率可以达到 50 pm (= 0.5 Å / 5×10^{-11} m), 放大倍数可达 5×10^7 倍(Kisielowski *et al.*, 2008)。这一系列的改进与进步使得 TEM 技术成为纳米尺度研究领域不可或缺的手段, 并成为在材料科学、物理学和生物学等学科中非常成熟的关键技术, 尤其是关于癌症、病毒、纳米技术和半导体等研究(Gao *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019 等)。如此重要的技术在化石材料的研究中也有广阔的应用前景(Zhou, 1983, 1993; Yin *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2016, 2019;

Peng *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018 等)。但到目前为止, 国内运用 TEM 技术对化石材料进行的相关研究还很少, 很可能是由于这一技术的实验过程较为复杂和精细。因此, 本文根据作者近期在大孢子化石研究中应用透射电镜的科学实践, 着重介绍化石样品的透射电镜前处理过程, 并以大孢子为例介绍超微结构在大孢子与其母体植物亲缘关系研究中的应用。

2 大孢子化石壁结构的研究历史

大孢子(megaspore)是孢粉学研究的对象之一, 通常是指性成熟的异孢植物经过减数分裂过程后形成的雌性配子体。由于 Guennel (1952)人为的将 200 μm 粒径作为区分大小孢子的标准在现代孢子生物功能分类研究中得到了普遍认可(Traverse, 2007), 于是粒径超过 200 μm 的孢子作为功能性大孢子的概念被广泛推广和应用(Chaloner, 1967, 1970; Turnau and Karczewska, 1987; Scott and Hemsley, 1996; Traverse, 2007 等)。根据 Chaloner (1967)对地质历史时期大孢子属种多样性的统计, 目前已知最早的大孢子化石出现于早泥盆世埃姆斯期(Emsian), 并一直持续至今。大孢子外壁主要由物理化学性质较稳定的孢粉素[总体化学分子式为 $(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3)_x$]构成(Zetzsche and Vicari, 1931), 而孢粉素则是由复杂的长链脂肪酸和苯酚化合物聚合而成, 且不同类型的植物合成的孢粉素在化学组分上具有一定差异(Ariizumi and Toriyama, 2011)。

20 世纪初期, Scott (1906)从英国兰开夏郡 Dulesgate 剖面 and 约克郡 Halifax 剖面中的煤系地层中发现了具颈锥体(gula)结构的大孢子化石 *Triletes diabolicus* Scott, 1906 (粒径可达 1.5 mm), 并认为分散大孢子 *T. diabolicus* 与 Williamson 采集到的鳞木类化石球果 *Lepidostrobus foliaceus* Maslen, 1899 产生的原位小孢子的形态结构相同, 两者颈锥体切面均由辐射状排列的扇形细纹理组成。因此, Scott (1906)根据结构相同的大小孢子证据认为 *T. diabolicus* 的母体植物是产生化石球果 *L. foliaceus* 的异孢植物, 并将 Williamson 获得的同孢鳞木类化石球果 *L. foliaceus* 划归为异孢鳞木类球果。由此可见, 大孢子化石切片对孢粉形态

分类学、植物分类学和植物异孢演化过程的研究都非常重要。此后, 随着透射电镜的开发和推广, Ehrlich 和 Hall (1959)运用 TEM 技术研究了部分始新世(Eocene)孢粉化石的壁层结构, 如 *Clivia*, *Commenlinaceae*, *Corylus*, *Lycopodium* 和 *Saintpaulia* 等。Leffingwell 等(1970)在美国怀俄明州东部和中部上白垩统 Lance 组地层中分离获得 *Wodehouseia spinata* Stanley, 1961 具有萌发孔, 其孢壁由柱状层和覆盖层组成, 但缺失基底层。通过对 *W. spinata* 萌发孔和孢粉壁的超微结构的分析研究, Leffingwell 等(1970)推断 *W. spinata* 属于被子植物花粉。之后, TEM 技术才被运用于晚古生代大孢子化石的壁层超微结构研究中(Zimmerman and Taylor, 1970)。后来, 国外孢粉学者开始将 TEM 技术应用于海相藻类和疑源类等化石的壁层结构研究中 (<https://paleobotany.ru/palynodata/publications?q=ultra&dir=asc&order=PALYDATE&page=1-3>)。相较而言, 我国孢粉学者对 TEM 技术的应用较晚。周志炎院士(Zhou, 1983)研究了产自浙江省宁波市杭州湾新区至奉化区第四系沉积地层的大孢子化石 *Azolla pinnata* Brown, 1810 的壁层超微结构。此后, 周志炎院士(Zhou, 1993)又将 TEM 技术应用于现生银杏 *Ginkgo biloba* 的大孢子和中侏罗世银杏化石 *Yimaia recurva* Zhou and Zhang, 1988 和 *Ginkgo yimaensis* Zhou and Zhang, 1989 的原位大孢子的超微结构对比研究中, 并认为现生和化石银杏的大孢子膜结构几乎一致, 尤其是大孢子膜中均可沉积形态相似的小柱状孢粉素。近来, 我国孢粉学者成功地将 TEM 技术运用于晚古生代大孢子化石的研究中, 分别研究了云南省曲靖市沾益区龙华山剖面中泥盆世分散大孢子化石的壁层超微结构和山西省忻州市保德县扒楼沟剖面下石盒子组下部产出的 *Sublagenicula nuda* (Nowak and Zerdnt) Dybová-Jachowicz *et al.*, 1979 大孢子化石表面的淀粉粒结构(Peng *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018)。

除了大孢子化石外, TEM 技术在古生物学其他化石门类研究中也同样得到了推广应用, 例如: 运用 TEM 技术, Yin 等(2005)在我国山西省中元古界北大尖组网纹藻 *Dictyosphaera delicata* Hu and Fu, 1982 的壳壁中观察到具有链锁状节间隔板的结构

(interlocked plates)。王春朝和茅永强(2006)对 TEM 技术在化石材料研究中常见的透射电镜前处理问题进行了归纳总结,并提出了合理的 TEM 技术改善建议,表明 TEM 技术在中国古生物学研究领域中的应用已初步实现。近期, Pan 等(2016, 2019)也将 TEM 技术创新性地运用于化石羽毛蛋白组构的超微结构研究中。综上所述, TEM 技术在不同门类古生物研究方向上具备应用潜力。因此,本文根据对大孢子化石的超微结构研究实践的系统总结,希望将 TEM 技术进一步推广应用到大孢子化石或其他化石超微结构研究领域中。

3 大孢子化石的透射电镜前处理方法

3.1 大孢子化石的获取

野外采集的孢粉岩石样品经过实验室酸泡浸解处理后(Wood *et al.*, 1996),可使用 180 μm 的样筛筛选出粒径较粗的碎屑物质。然后,将样筛中的所有碎屑冲洗并转移到玻璃皿中,并在体式显微镜下镜检观察是否含有大孢子化石。如果含有大孢子化石,则可使用细尖的胶头滴管将大孢子化石从碎屑中吸取出来,并转移到盛有蒸馏水的凹面载玻片中。当挑选出所有的大孢子化石后,再进行大孢子化石的编号记录、显微成像和分类鉴定等工作。

3.2 大孢子化石超薄切片的制备

3.2.1 材料选取

根据大孢子化石的保存情况,尽可能地选取形态结构完整的同种大孢子化石 3–5 枚,将其放置于 2 mL 微量离心管中(样品转移工具可使用细毛笔或移液枪)。由于大孢子化石壁物理化学性质较稳定,早已经失去生物活性,所以可省去使用锇酸固定样品的步骤,可以直接进入样品梯度脱水过程。

3.2.2 梯度脱水

首先配制不同浓度的酒精溶液(80%, 85%, 90%, 95%和 100%)。再按照酒精浓度由低到高的顺序依次对大孢子化石进行脱水处理。其中,非纯酒精溶液脱水 1 次,每次脱水间隔时间为

20 min; 纯酒精溶液需脱水 2 次,每次脱水间隔时间为 45 min (图 1)。

3.2.3 包埋剂配比

目前透射电镜常用的包埋剂包括: Spurr 低黏度包埋剂、LR White 包埋剂、LR Gold 包埋剂、Araldite 502 包埋剂、Lowicryl K 型极性包埋剂、Lowicryl HM 型非极性包埋剂、GMA 水溶性包埋剂,以及不同型号的 812 环氧树脂包埋剂(ZJKY, Quetol, Eponate, Pon 和 EMbel)等(www.emcn.com.cn)。其中适用于大孢子化石的包埋剂主要包括 812 环氧树脂包埋剂(Peng *et al.*, 2016)和 Spurr 环氧树脂包埋剂(Liu *et al.*, 2018) (图 2)。然而, 812 环氧树脂包埋剂与 Spurr 环氧树脂包埋剂相比,前者渗透性低、样品聚合时间长、较难对包埋样品进行定向和悬浮包埋。因此本文推荐使用 Spurr 环氧树脂作为大孢子化石的包埋剂,最主要的原因是 Spurr 环氧树脂聚合迅速,能及时调整包埋样品的位置,避免出现样品漂浮或沉底的现象,并可按指定方向实现定向包埋。因此,使用 Spurr 环氧树脂包埋剂可更方便地准确获取大孢子化石特殊部位的超微结构,从而避免因无法预知包埋大孢子化石的切片位置而导致切片失败。

Spurr 环氧树脂的配比方案需要根据具体的实验材料进行调整(表 1)。812 或 Spurr 环氧树脂的聚合易受环境温度和湿度等条件的影响,我们根据 Spurr 环氧树脂在大孢子化石研究过程中的配制实践,认为较理想的大孢子包埋剂配方如表 1 所示。

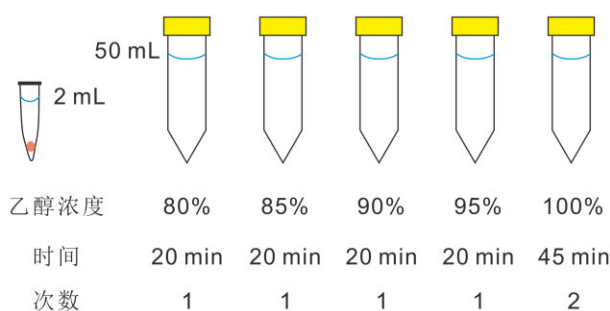


图 1 大孢子化石的梯度脱水过程

Fig. 1 Gradient dehydration procedures of the fossil megaspore



图 2 812 和 Spurr 环氧树脂包埋剂
Fig. 2 Embedding agents of 812 and Spurr resins

表 1 Spurr 环氧树脂包埋剂配方 (单位: 克)
Table 1 The formulas of the Spurr resin (Unit: gram)

ERL	DER	NSA	DMAE	备注
10	6	26	0.4	偏硬(王萍、笪冀平, 2002)
10	7	26	0.4	最理想(姜秀英、刘旭明, 1997)
4.1	1.43	5.9	0.1	标准配比(Ellis, 2006a, 2006b)
4.1	0.95	5.9	0.1	偏硬(Ellis, 2006a, 2006b)
4.1	1.9	5.9	0.1	偏软(Ellis, 2006a, 2006b)
3	2.1	7.6	0.1	适中(本文)

Spurr 环氧树脂包埋剂的配制需要分步进行。首先使用磁浮搅拌器将已称量完成的 ERL 树脂和 NSA 硬化剂进行混合并搅拌均匀。再加入已称量完成的 DER 增塑剂并搅拌均匀, 然后加入称量完成的 DMAE 催化剂并搅拌至呈琥珀色且树脂中不含气泡。此外, 812 环氧树脂包埋剂与 Spurr 环氧树脂包埋剂的配制方法相同, 但也需分步进行。Spurr 环氧树脂包埋剂应存放在阴凉干燥处。

3.2.4 梯度渗透

将完全脱水后的大孢子样品用移液枪转移至干净的 2 ml 微型离心管中, 再使用不同浓度的 Spurr 环氧树脂包埋剂对大孢子化石进行梯度渗透。依次使用树脂: 乙醇 = 1: 3; 树脂: 乙醇 = 1: 1; 树脂: 乙醇 = 3: 1 的均匀混合溶液各渗透 1 次, 每次渗透时间为 1 h。最后再用纯 Spurr 环氧树脂包埋剂进行 2 次渗透, 每次渗透时间为 12 h (图 3)。

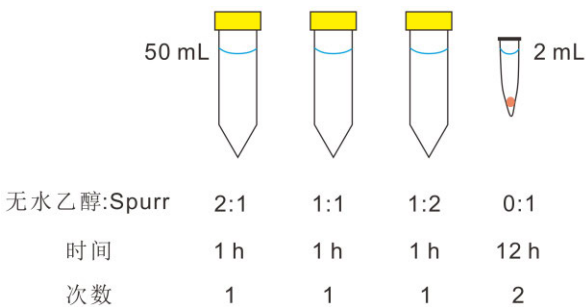


图 3 大孢子化石的梯度渗透
Fig. 3 Gradient penetrations for the fossil megaspore

3.2.5 包埋

将完成梯度渗透的大孢子化石转移到盛有纯 Spurr 环氧树脂的包埋模板中并进行包埋。从下至上的包埋材料添加顺序为: 注入最底层的树脂、放入样品编号、再注入槽模一半位置的树脂、放置完成树脂渗透后的大孢子、在槽模中注满树脂(图 4)。

3.2.6 聚合

将包埋好的大孢子样品放入变温聚合仪中聚

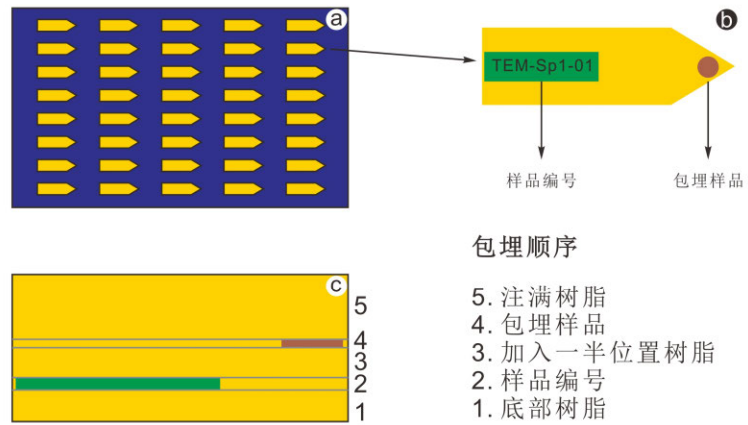


图 4 大孢子化石的包埋顺序: a. 包埋模板; b. 包埋设计图; c. 包埋顺序
Fig. 4 The procedure of the fossil megaspore embedding: a. Embedding form; b. Design sketch of embedding; c. Embedding order

合。其中, Spurr 环氧树脂包埋剂的聚合参数设置是: 25℃ “聚合 8 h”、36℃ “聚合 8 h”、70℃ “聚合 12 h”; Epon-812 环氧树脂包埋剂的聚合参数设置是: 36℃ “聚合 12 h”、48℃ “聚合 12 h”、60℃ “聚合 24 h”。此外, 包埋剂聚合不久后且处于半凝固状态时, 在包埋模槽中可能会出现气泡, 需要将这些气泡及时挑出或挑破, 尤其是在包埋模槽尖端且靠近包埋样品部位的气泡。如果不对这些气泡进行处理, 在后续修整样品时会很容易导致崩裂而形成断口, 并可能破坏被包埋的大孢子化石。

3.2.7 超薄切片

(1) 玻璃刀的制备和水槽玻璃刀的制备

使用玻璃切割机对玻璃条进行切割, 尽量切割出等腰直角三角形玻璃刀。然后, 选取具有明显应力线、平直锋利的刀口和具有矩形钝头刀根的玻璃刀以用于精修样品或制作水槽玻璃刀(图 5)。此外, 水槽玻璃刀的制备方法是: 使用液体石蜡将专用塑料水槽固定在玻璃刀刀口前端, 尽量使水槽尖端与刀口组成的平面与玻璃刀底面平行(图 5)。

(2) 样品粗修

使用小钢刀对聚合完成的大孢子样品进行修整。先将聚合完成的样品尖端修整成为金字塔型

(或四角锥型), 然后在大孢子化石的前缘位置尽可能地截取一个垂直于大孢子所在平面的小平面(图 5)。粗修样品的目的是使大孢子化石能够尽可能地处于聚合样品的尖端, 便于在超薄切片机上精修大孢子样品。

(3) 样品精修

将粗修后的聚合样品固定在超薄切片机的摇臂上, 旋转摇臂上的旋钮使得旋圈上的一条刻度线与摇臂上的固定刻度线对齐。将玻璃刀固定在超薄切片机的切割台上后开始精修样品。在样品精修期间, 需要注意控制外围进刀深度, 以避免因进刀过度而造成后续超薄切片制备时出现样品颤动的情况。此外, 精修出的切面应尽可能地靠近大孢子化石边缘。然后, 旋转摇臂上的旋圈 90°, 重复精修过程直至形成规则的直方柱型或梯形柱型前端。因此, 本文推荐使用“回”字形样品精修方式, 从外向内多层次地进行修整, 尽可能地避免因样品崩裂而破坏大孢子化石的现象(图 5)。最后, 再修整直方柱前端, 使大孢子所处位置尽可能地靠近直方柱顶面(图 6)。

(4) 半薄片制备

将水槽玻璃刀固定在超薄切片机的固定台上, 向水槽中注满水。此后, 在超薄切片机的控制面板上设置自动切割参数并开始试验薄片的制备。

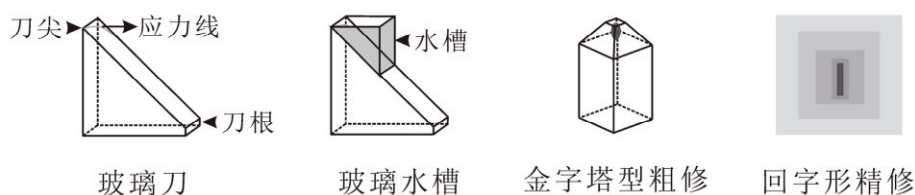


图 5 玻璃刀和样品修整模型

Fig. 5 Preparation for the glass knife and the recommended method for cutting sample

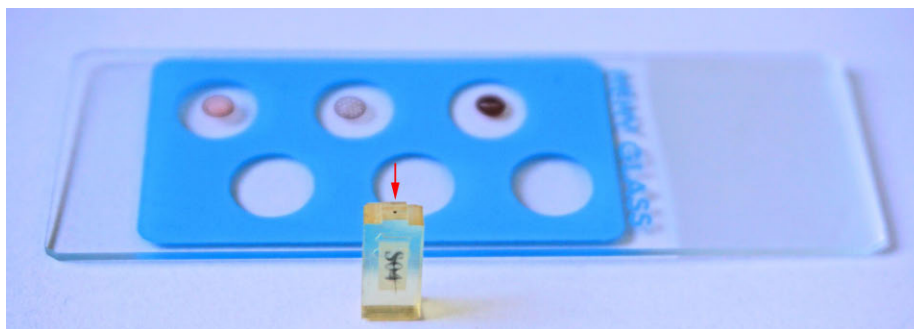


图 6 完成精修的样品

Fig. 6 A prepared sample after cutting by glass knife

使用捞样器捞取试验薄片至载玻片上,并在显微镜下镜检,以方便判断当前切片位置是否到达了实验预期所需要进行超薄切片的位置(图 7)。

(5) 超薄切片制备

在镜检半薄片时,如果能观察到大孢子化石切面上的所有形态结构(或到达预期的大孢子化石切片位置),就可以开始制备大孢子化石的超薄切片。首先,将金刚刀固定在超薄切片机的固定台上(图 8-a)。然后,向金刚刀槽内注满水,

设置超薄切片机的自动切割参数并制备超薄切片。成功的超薄切片应是无明显刀痕、无褶皱、灰白色、长条状、连续的超薄切片(图 8-a)。用捞样器将水槽中的超薄切片捞取至事先准备的铜网上,并妥善保存于载网盒中(图 8-b)。此后,需详细记录不同大孢子化石超薄切片的铜网在载网盒中的坐标位置 and 对应的大孢子化石样品编号,以便于后期大孢子化石超微结构照片的整理和对比。

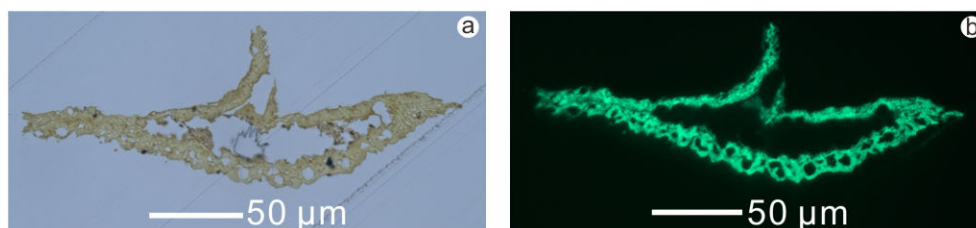


图 7 试验薄片的透射显微镜(a)和荧光显微镜(b)照片(*Longhuashanispora reticuloides*)
Fig. 7 Transmitted (a) and fluorescent (b) microscopic images of the ultrathin section (*L. reticuloides*)

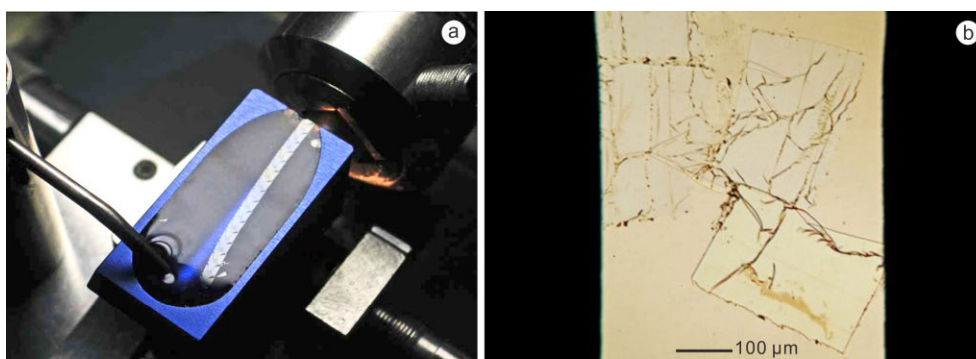


图 8 大孢子化石的超薄切片(*Longhuashanispora reticuloides*)

Fig. 8 Ultrathin sections of the megaspore (*L. reticuloides*)

a. 金刚刀和连续的灰白色超薄切片。b. 狭缝单槽支持膜载网,无铜网栅格遮挡的完整超薄切片。

a. The diamond knife and the continuous and grayish ultrathin sections. b. The single slot grid; showing the intact ultrathin sections of the fossil megaspore on the single slot grid.

3.2.8 染色

是否需要大孢子化石超薄切片进行染色,需要根据大孢子化石超薄切片在透射电镜下的衬度而定。根据作者对未染色的大孢子化石超薄切片在透射电镜下的观察经验,超薄切片上的大孢子壁的衬度普遍低于包埋树脂的衬度,主要表现为观察不到大孢子化石和包埋树脂之间的界线,或能观察到大孢子化石和包埋树脂之间的界线,但观察不到大孢子壁内部的超微结构,类似大孢子整体脱落的现象。也有少量大孢子壁的衬度高于包埋树脂的衬度,但由于二者衬度差异不大,从而导致难以获得清晰

的大孢子壁超微结构(图 9)。

因此,为了获得具有良好衬度的大孢子超微结构影像,通常需要对大孢子超薄切片进行染色处理。本文主要介绍醋酸双氧铀和柠檬酸铅负染色方法(图 10)。

首先,选取一个不具有亲水性材质的密闭容器(可使用白蜡自制),不但能使染液滴或蒸馏水滴保持一定的表面张力,能够支撑铜网,同时也便于染色结束后容器的清洁。然后,用胶头滴管在一个容器中滴 1 滴醋酸双氧铀染液,并且在染液旁边滴相应的 3 滴蒸馏水。此后,将具有超薄

切片的铜网轻放在醋酸双氧铀液面上, 染色 30 min。再将醋酸双氧铀染色后的铜网转移到蒸馏水滴上进行 3 次清洗, 每次清洗时间为 2 min, 每次转移铜网都需要用滤纸将多余的醋酸双氧铀染液或蒸馏水吸收干净。

由于柠檬酸铅容易和空气中的二氧化碳产生化学反应并生成碳酸铅沉淀, 导致在透射电镜下会观察到细小密集的圆形黑色颗粒, 并干扰透射电镜成像观察和遮挡大孢子化石的部分超微结构, 因此柠檬酸铅染色需要在密闭容器中进行。为了尽可能地减少碳酸铅黑色沉淀的形成, 通常需要在密闭容器内壁周围放置过量的二氧化碳固体吸收剂, 包括固体氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氧化钠等。然后, 用相同的染色方法再对大孢子化石超薄切片进行柠檬酸铅染色。最后, 将染色完成后的铜网妥善保存在载网盒中, 注意铜网的正反面放置规律, 再编号

和记录染色后的超薄切片, 以便于后期大孢子化石的透射电镜成像和超微结构图像的整理和对比。

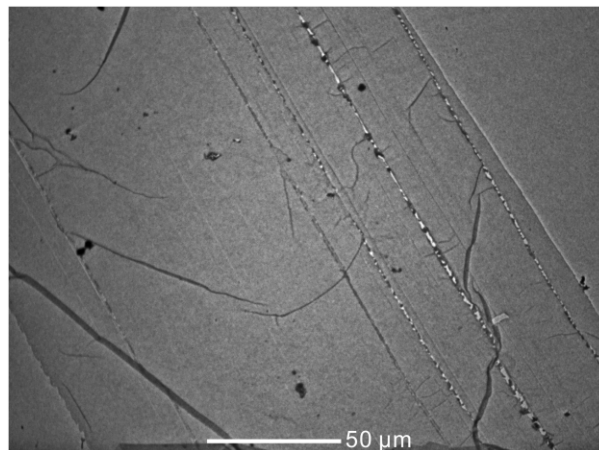


图 9 未染色的大孢子化石透射电镜照片(*Longhuashanispora reticuloides*)

Fig. 9 Transmission electron microscopic image of the unstained ultrathin section (*L. reticuloides*)

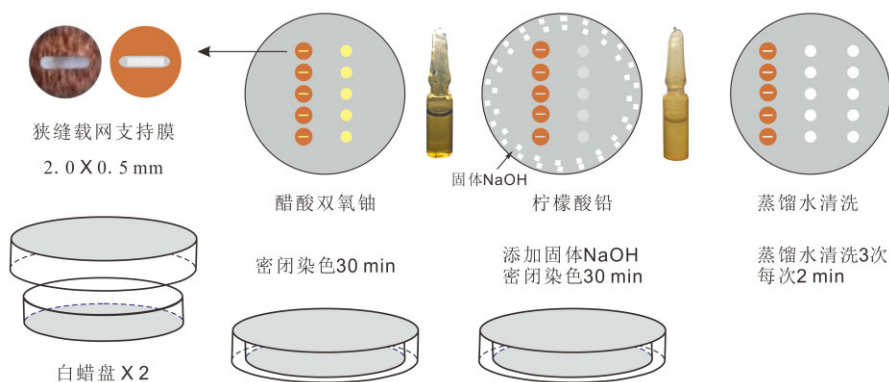


图 10 大孢子超薄切片的染色处理过程

Fig. 10 Staining process of the ultrathin section of the fossil megaspore

3.3 透射电镜成像

将染色后的大孢子化石超薄切片置于透射电镜下观察并拍照。本文使用的透射电镜是中国科学院南京地理与湖泊研究所的 JRMpro-1400 型。透射电镜系统参数设置为真空度 90 MPa, 加速电压 80 kV。图 11 是本文获得的 3 种大孢子化石超薄切片的整体图像。此外, 为了满足大孢子化石壁层超微结构的研究需要, 通常需在透射电镜下对大孢子化石的壁结构进行局部放大并成像, 才能获得大孢子化石超薄切片的所有细节特征。最后, 推荐使用图像处理软件(CorelDRAW X7 和

Photoshop CS6 等)对局部放大的照片进行整合拼接处理, 才能获得壁层清晰、结构完整和高分辨率的超微结构图像。

4 大孢子化石超微结构的研究应用

目前, 大孢子化石属种划分是以 Potonié 和 Kremp (1954)建立的孢粉形态分类方案为依据。由于 Potonié 和 Kremp (1954)的形态划分方案主要是根据孢粉化石的外部形态特征, 因此这可能导致不同孢粉学者在孢粉化石鉴定时出现主

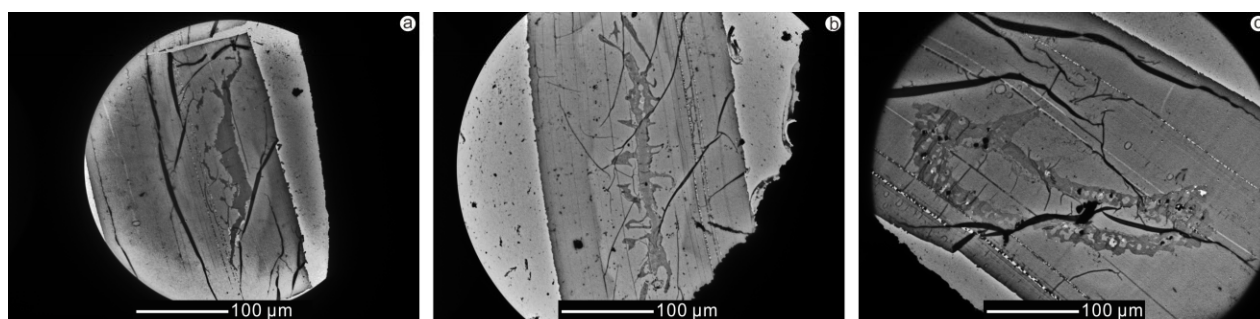


图 11 不同大孢子化石的完整超薄切片

Fig. 11 Morphology of the complete ultrathin sections of various fossil megaspores

观分歧, 通常表现为同物异名的现象, 例如: 形态相近的 *Mammilaespora* Pant and Srivastava, 1961 和 *Singraulispore* Pant and Mishra, 1986 都是由于不同学者对于形态分类主观认识的差异而造成的同物异名(Glasspool, 2000)。赵理悻和毛礼米(2015)对现生四种稻属花粉壁的透射电镜研究表明可以根据花粉壁和萌发孔的超微结构差异而区分外部形态特征相似的禾本科花粉。因此, 现生孢粉超微结构的研究有助于实现种一级水平的植物分类鉴定, 尤其是区分属征相同、形态相似的不同种类的孢粉。大孢子化石透射电镜的研究不仅可以为大孢子化石的系统分类提供较稳定的大孢子壁内部超微结构资料, 而且可以根据分散大孢子化石与原位大孢子化石相同或相似的内部超微结构特征来研究大孢子化石和母体植物之间的亲缘关系。

Peng 等(2016)运用 TEM 技术对我国云南省曲靖市沾益区龙华山剖面中泥盆统吉维特阶上双河组中保存的大孢子化石进行了超微结构研究。其中, 拟网龙华山大孢(*Longhuashanispora reticuloides* Lu and Ouyang, 1978)具有粗直的三射线、光滑的近极面、完全弓形脊、刺瘤状二型纹饰和远极面上纹饰基部相互融合形成的类网状结构(图 12-a-12-d), 与勒氏蕨的原位小孢子化石的外部形态特征几乎完全一致(图 12-e, 12-f)。其大孢子壁可分为三层; 内部是基底层, 它的下部具有呈平行排列的多细纹带结构(multilamellate zones); 中部是疏松层, 由分布不均匀的海绵状孢粉素和孔穴构成; 外部是致密层, 具有致密的外壁纹饰(图 12-k); 外壁刺瘤状二型纹饰普遍对应孢子壁疏松层中的一个较大孔穴(图 12-g); 疏松层内的

大孔穴的形成可能是原始孔穴被后期生长的黄铁矿充填的结果。

Wellman 等(2009)从加拿大新不伦瑞克省 Dalhousie 市和 Campbellton 市间 Restigouche 河南岸的下泥盆统埃姆斯阶 Campbellton 组报道了同孢植物化石 *Leclercqia complexa* Banks et al., 1972。通过形态特征和超微结构的对比研究, Peng 等(2016)认为中泥盆世分散大孢子 *Longhuashanispora reticuloides* 与 *Leclercqia complexa* 的原位小孢子具有相似的外部形态特征和内部超微结构, 主要包括: 远极壁上相似的刺瘤状二型纹饰(图 12-a-12-f, 12-h), 近极壁基底层下的平行排列的多细纹带结构(图 12-i, 12-j)。虽然水韭类和卷柏类植物产生的孢子也具有相似的多细纹带结构, 但因其多细纹带结构在两端逐渐收敛而区别于 *Longhuashanispora reticuloides* 和 *Leclercqia complexa* 的原位小孢子具有的平行排列状多细纹带结构(图 12-l, 12-m)。另外水韭类和卷柏类原位孢子的外壁表面纹饰与 *Longhuashanispora reticuloides* 和 *Leclercqia complexa* 的原位小孢子密集的刺瘤状二型纹饰均有较大的差异(Taylor, 1992, 1993; Looy et al., 2005; Moore et al., 2006)。因此, 根据目前有限的文献资料的对比分析, Peng 等(2016)认为中泥盆世 *Longhuashanispora reticuloides* 的母体植物是同孢植物向异孢植物演化过程中出现的过渡类型植物, 并与 *Leclercqia* 有较近的亲缘关系。此外, 前人在与龙华山剖面相邻的沾益区玉光村剖面的同期地层中报道了目前已知的最早异孢植物 *Yuguangia ordinata* Hao et al., 2007, 其部分原位大小孢子化石与 *Longhuashanispora reticuloides* 的外部形态非常相似, 包括: 粗直的三射线、光滑的近极面、完全弓

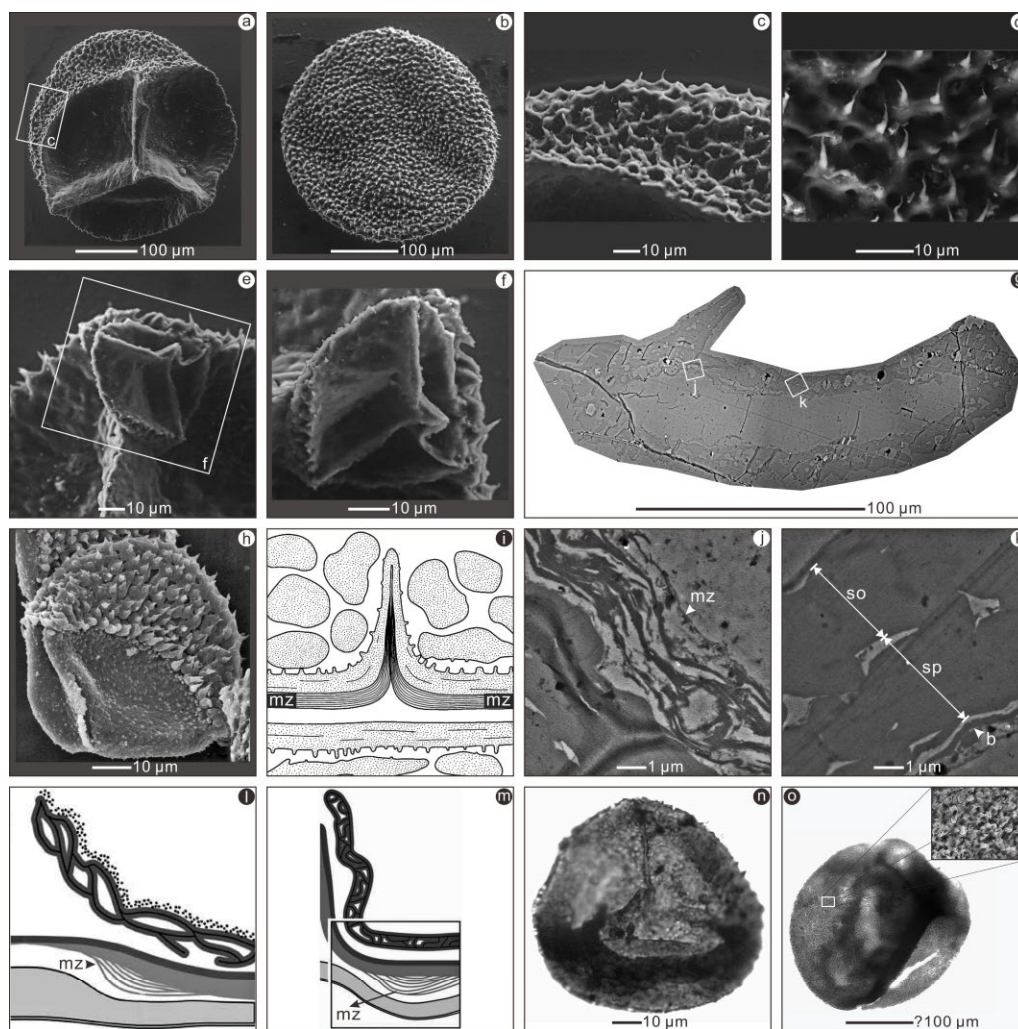


图 12 拟网龙华山大孢与勒氏蕨和玉光蕨的原位孢子化石的形态特征和超微结构对比

Fig. 12 Comparisons of morphology and ultrastructure of *Longhuashanispora reticuloides* with *in situ* spores of *Leclercqia complexa* and *Yuguangia ordinata*

a-d. 拟网龙华山大孢 *Longhuashanispora reticuloides*: a. 显示清楚的粗直三射线、光滑接触区、完全弓形脊以及赤道刺瘤状二型纹饰; b, d. 远极壁上明显的刺瘤状二型纹饰; c. 图 a 中外壁二型纹饰的局部放大, 部分纹饰具有膨大的基部和尖端小刺。e, f. 粒径较小的 *L. reticuloides*。g. *L. reticuloides* 的透射电镜整体合成照片。h. *Leclercqia complexa* 的原位小孢子化石, 远极面具有清晰的刺瘤状二型纹饰(据 Wellman *et al.*, 2009)。i. *Leclercqia* 产生的同形孢子的基底层下部的平行排列的多细纹带结构(mz)(据 Wellman *et al.*, 2009)。j. 图 g 的局部放大, 大孢子化石 *Longhuashanispora reticuloides* 的基底层具有的近平行排列的多细纹带结构(mz)。k. 图 g 的局部放大, 大孢子化石 *L. reticuloides* 的壁层超微结构, 其孢子壁由内部基底层(b)、中部疏松层(sp)和外部致密层(so)组成。l. 水韭类孢子具有的两端收敛的近平行排列的多细纹带结构(mz)(据 Looy *et al.*, 2005)。m. 卷柏类孢子具有的两端收敛的近平行排列的多细纹带结构(mz)(据 Looy *et al.*, 2005)。n. *Yuguangia ordinata* 的原位小孢子化石, 具有完全弓形脊和远极面上刺瘤状二型纹饰(据 Hao *et al.*, 2007)。o. *Y. ordinata* 的原位大孢子化石, 远极外壁具有刺瘤状二型纹饰, 缺失比例尺(据 Hao *et al.*, 2007; 远极外壁纹饰图片由薛进庄提供)。

a-d. Fossil megaspores of *Longhuashanispora reticuloides*: a. The distinct straight and robust trilete laesurae, smooth contact area, curvaturae perfectae and the spinous-verrucate biform processes of *L. reticuloides*; b, d. The clear spinous-verrucate biform sculptures on the distal surface; c. The enlargement of the biform processes on the distal surface from image a, consisting of a swallow base with a mucronate apex. e, f. *L. reticuloides* type microspores. g. Composite image of section encompassing the entire megaspore of *L. reticuloides*. h. *In situ* microspore of the fossil plant *Leclercqia complexa* with prominent spinous-verrucate biform processes on the distal surface (after Wellman *et al.*, 2009). i. The parallelly arranged multilamellate zones (mz) under the basal lamina of homospores of *Leclercqia* (after Wellman *et al.*, 2009). j. The enlargement of image g, the parallelly-arranged multilamellate zones (mz) under the basal lamina of megaspore *Longhuashanispora reticuloides*. k. The enlargement of image g, exine ultrastructure of megaspore *L. reticuloides*, containing the inner basal lamina (b), the middle spongy region (sp) and the outer solid region (so). l. Parallelly-arranged multilamellate zones (mz) with two convergent extremities in spores of *Isöetes* (after Looy *et al.*, 2005). m. Parallelly-arranged multilamellate zones (mz) with two convergent extremities in spores of *Selaginella* (after Looy *et al.*, 2005). n. *In situ* microspore of *Yuguangia ordinata* with curvaturae perfectae and spinous-verrucate biform ornamentations on the equator (after Hao *et al.*, 2007). o. Some spinous-verrucate biform processes on the distal surface of *in situ* megaspore of *Y. ordinata* but without scale bar (after Hao *et al.*, 2007; image of processes on the distal exine from Xue Jin-zhuang).

形脊、远极面上刺瘤状二型纹饰和类网状结构(图 12-a–12-f, 12-n, 12-o) (Hao *et al.*, 2007)。然而, 由于当前缺乏对 *Y. ordinata* 的原位大小孢子化石超微结构的对比研究, 因此尚不能充分讨论 *L. reticuloides* 与异孢植物 *Y. ordinata* 之间的亲缘关系。

综上所述, 根据 TEM 在大孢子化石超微结构研究中的应用与分析, 发现 TEM 在大孢子化石外壁超微结构研究中具有独特的优势。希望在大孢子化石超微结构研究中得到成熟应用的 TEM 技术能够推广到其他有机壁类化石, 为有机壁类化石的分类和系统演化研究提供技术保障。

致谢 孢粉岩石样品分析得到了中国科学院南京地质古生物研究所黄凤宝高级工程师的帮助; 大孢子化石实验得到了同单位王春朝高级工程师、泮燕红研究员和丛璐璐工程师(中国科学院南京地理与湖泊研究所)的协助; 北京大学薛进庄副教授为论文提供玉光蕨原位大小孢子的扫描电子显微镜照片, 评审专家和编辑对论文提出宝贵的修改意见, 在此一并表示衷心感谢!

参考文献 (References)

- 姜秀英, 刘旭明, 1997. 低粘度 Spurr 包埋剂用于电镜制样的新技术. 诊断病理学杂志, 4: 169.
- 李斗星, 2004. 透射电子显微镜学的新进展 I 透射电子显微镜及相关部件的发展及应用. 电子显微学报, 23: 269–277.
- 王春朝, 茅永强, 2006. 透射电子显微镜(TEM)在孢粉学研究中的应用. 古生物学报, 45: 425–429.
- 王 萍, 笪冀平, 2002. Spurr 树脂低黏度包埋剂在电镜制样中的应用. 诊断病理学杂志, 9: 56–57.
- 赵理悱, 毛礼米, 2015. 四种稻属植物花粉外壁 TEM 的超微结构比较研究. 古生物学报, 54: 547–555.
- Ariizumi T, Toriyama K, 2011. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. Annual Review of Plant Biology, 62: 437–460.
- Chaloner W G, 1967. Spores and land-plant evolution. Review of Palaeobotany and Palynology, 1: 83–93.
- Chaloner W G, 1970. The rise of the first land plants. Biological Reviews, 45: 353–377.
- Ehrlich H G, Hall J W, 1959. The ultrastructure of Eocene pollen. Grana, 2: 32–35.
- Ellis E A, 2006a. Corrected formulation for Spurr low viscosity embedding medium using the replacement epoxide ERL 4221. Microscopy and Microanalysis, 12: 288–289.
- Ellis E A, 2006b. Solutions to the problem of substitution of ERL 4221 for vinyl cyclohexene dioxide in Spurr low viscosity embedding formulations. Microscopy Today, 14: 32–33.
- Gao Wen-pei, Tieu P, Addiego C, Ma Yan-ling, Wu Jian-bo, Pan Xiao-qing, 2019. Probing the dynamics of nanoparticle formation from a precursor at atomic resolution. Science Advances, 5: eaau9590.
- Glasspool I J, 2000. Megaspores from the Late Permian, Lower Whybrow coal seam, Sydney Basin, Australia. Review of Palaeobotany and Palynology, 110: 209–227.
- Guennel G K, 1952. Fossil spores of the Alleghenian coals in Indiana. Indiana Geological Survey Report of Progress, 4: 1–40.
- Han Fei, Wang Ruo-xu, Feng Yu-hua, Wang Shao-yan, Liu Ling-mei, Li Xing-hua, Han Yu, Chen Hong-yu, 2019. On demand synthesis of hollow fullerene nanostructures. Nature Communications, 10: 1548.
- Hao Shou-gang, Xue Jin-zhuang, Wang Qi, Liu Zhen-feng, 2007. *Yuguangia ordinata* gen. et sp. nov., a new lycopsid from the Middle Devonian (late Givetian) of Yunnan, China, and its phylogenetic implications. International Journal of Plant Sciences, 168: 1161–1175.
- Jiang Xiu-ying, Liu Xu-ming, 1997. Low viscosity Spurr resin as a new technique for the sample preparation of transmission electron microscope. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 4: 169 (in Chinese).
- Kisielowski C, Freitag B, Bischoff M, van Lin H, Lazar S, Knippels G, Tiemeijer P, van der Stam M, von Harrach S, Stekelenburg M, Haider M, Uhlemann S, Müller H, Hartel P, Kabius B, Miller D, Petrov I, Olson E A, Donchev T, Kenik E A, Lupini A R, Bentley J, Pennycook S J, Anderson I M, Minor A M, Schmid A K, Duden T, Radmilovic V, Ramasse Q M, Watanabe M, Erni R, Stach E A, Denes P, Dahmen U, 2008. Detection of single atoms and buried defects in three dimensions by aberration-corrected electron microscope with 0.5-Å information limit. Microscopy and Microanalysis, 14: 469–477.
- Leffingwell H A, Larson D A, Valencia M J, 1970. A study of the fossil pollen *Wodehouseia spinata*. I. Ultrastructure and comparisons to selected modern taxa. II. Optical microscopic recognition of foot layers in differentially stained fossil pollen and their significance. Bulletin of Canadian Petroleum Geology, 18: 238–262.
- Li Dou-xing, 2004. Progress of transmission electron microscopy I Development of transmission electron microscope and related equipment. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 23: 269–277 (in Chinese).
- Li Zhi, Jiang Ke-ren, Khan F, Goswami A, Liu Jun, Passian A, Thundat T, 2019. Anomalous interfacial stress generation during sodium intercalation / extraction in MoS₂ thin-film anodes. Science Advances, 5: eaav2820.
- Liu Feng, Bomfleur B, Peng Hui-ping, Li Quan, Kerp H, Zhu Huai-cheng, 2018. 280-m.y.-old fossil starch reveals early plant-animal mutualism. Geology, 46: 423–426.
- Looy C V, Collinson M E, Cittert J H V K-V, Visscher H, Brain A P R, 2005. The ultrastructure and botanical affinity of end-Permian spore tetrads. International Journal of Plant Sciences, 166: 875–887.

- Moore S E M, Hemsley A R, Borsch T, 2006. Micromorphology of outer exospore coatings in *Selaginella* megaspores. *Grana*, 45: 9–21.
- Pan Yan-hong, Zheng Wen-xia, Moyer A E, O'Connor J K, Wang Min, Zheng Xiao-ting, Wang Xiao-li, Schroeter E R, Zhou Zhong-he, Schweitzer M H, 2016. Molecular evidence of keratin and melanosomes in feathers of the Early Cretaceous bird *Eoconfuciusornis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: E7900–E7907.
- Pan Yan-hong, Zheng Wen-xia, Sawyer R H, Pennington M W, Zheng Xiao-ting, Wang Xiao-li, Wang Min, Hu Liang, O'Connor J K, Zhao T, Li Zhi-heng, Schroeter E R, Wu Fei-xiang, Xu Xing, Zhou Zhong-he, Schweitzer M H, 2019. The molecular evolution of feathers with direct evidence from fossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116: 3018–3023.
- Peng Hui-ping, Liu Feng, Zhu Huai-cheng, 2016. Morphology and ultrastructure of Middle Devonian dispersed megaspores from Qujing, Yunnan, Southwest China. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 234: 110–124.
- Potonié R, Klaus W, 1954. Einige Sporengattungen des alpinen Salzgebirges. *Geologisches Jahrbuch*, 68: 517–546.
- Scott A C, Hemsley A R, 1996. Paleozoic megaspores. In: Jansonius J and McGregor D C (eds.), *Palynology: Principles and Applications*, Volume 2, Principles. Salt Lake City, Utah: American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation. Publishers Press, 629–639.
- Scott R, 1906. On the megaspore of *Lepidostrobus foliaceus*. *New Phytologist*, 5: 116–118.
- Taylor W A, 1992. Megaspore wall development in *Isoetes melanopoda*: morphogenetic post-initiation changes accompanying spore enlargement. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 72: 61–72.
- Taylor W A, 1993. Megaspore wall ultrastructure in *Isoetes*. *American Journal of Botany*, 80: 165–171.
- Traverse A, 2007. *Paleopalynology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 1–813.
- Turnau E, Karczewska J, 1987. Size distribution in some Middle Devonian dispersed spores and its bearing on the problem of the evolution of heterospory. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 52: 403–416.
- Wang Chun-zhao, Mao Yong-qiang, 2006. Application of transmission electron microscope (TEM) in palynological study. *Acta Palaeontologica Sinica*, 45: 425–429 (in Chinese).
- Wang Peng-fei, Chen San-you, Guo Mao-sen, Peng Shi-jie, Wang Meng-qi, Chen Ming, Ma Wen-chao, Zhang Rui, Su Ji-hu, Rong Xing, Shi Fa-zhan, Xu Tao, Du Jiang-feng, 2019. Nanoscale magnetic imaging of ferritins in a single cell. *Science Advances*, 5: eaau8038.
- Wang Ping, Da Ji-ping, 2002. Application of the low viscosity Spurr resin on the sample preparation of transmission electron microscope. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 9: 56–57 (in Chinese).
- Wellman C H, Gensel P G, Taylor W A, 2009. Spore wall ultrastructure in the early lycopsid *Leclercqia* (Protolepidodendrales) from the Lower Devonian of North America: Evidence for a fundamental division in the lycopsids. *American Journal of Botany*, 96: 1849–1860.
- Wood G D, Gabriel A M, Lawson J C, 1996. Palynological techniques-processing and microscopy. In: Jansonius J, McGregor D C (eds.), *Palynology: Principles and Applications*, Volume 1, Principles. Salt Lake City, Utah: American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation. 29–50.
- Xie Yu-jun, Sohn S, Wang Ming-lei, Xin Huo-lin, Jung Y, Shattuck M D, O'Hern C S, Schroers J, Cha J J, 2019. Supercluster-coupled crystal growth in metallic glass forming liquids. *Nature Communications*, 10: 915.
- Yang Hai-yao, Liu Ying-liang, Guo Zhou-yi, Lei Bing-fu, Zhuang Jian-le, Zhang Xue-jie, Liu Zhi-ming, Hu Chao-fan, 2019. Hydrophobic carbon dots with blue dispersed emission and red aggregation-induced emission. *Nature Communications*, 10: 1789.
- Yin Lei-ming, Yuan Xun-lai, Meng Fan-wei, Hu Jie, 2005. Protists of the Upper Mesoproterozoic Ruyang Group in Shanxi Province, China. *Precambrian Research*, 141: 49–66.
- Zetzsche F, Vicari H, 1931. Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen II. *Lycopodium clavatum* L. 2. *Helvetica Chimica Acta*, 14: 58–62.
- Zhao Xing-yi, Mao Li-mi, 2015. Morphological comparison for pollen exine ultrastructure of four species from *Oryza*. *Acta Palaeontologica Sinica*, 54: 547–555 (in Chinese).
- Zhou Zhi-yan, 1983. Quaternary record of *Azolla pinnata* from China and its sporoderm ultrastructure. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 39: 109–129.
- Zhou Zhi-yan, 1993. Comparative ultrastructure of fossil and living ginkgoacean megaspore membranes. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 78: 167–182.
- Zimmerman R, Taylor T, 1970. The ultrastructure of Paleozoic megaspores membranes. *Pollen et Spores*, 12: 450–468.