

<https://doi.org/10.3176/biol.1968.1.02>

X. КАЛЬЮСТЕ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ДВУХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗНЫХ ФИКСАТОРОВ

В последние годы в литературе по вопросам радиочувствительности растений все большее внимание уделяется зависимости степени повреждений от количественных показателей клеточного ядра. На основании проведенных до настоящего времени исследований наиболее характерным из этих показателей можно считать средний условный объем хромосомы, который определяется делением объема интерфазного ядра на диплоидное число хромосом ($2n$) (Sparrow, Christiansen, 1953; Ньюбом, 1957; Sparrow, Miksche, 1961; Sparrow и др., 1963; Lunden, 1964; Osborne, Lunden, 1964, Van't Hof, Sparrow, 1965; Орав и др., 1967).

Для получения данных о величине ядер и хромосом опытный материал предварительно фиксируют и окрашивают. В связи с этим возникает вопрос о влиянии различных фиксаторов на размеры клеточных ядер.

Процесс фиксации, который заключается в задержке посмертных процессов и сохранении картины тканевой структуры, как можно более точно соответствующей исходному состоянию, кажется простым. В действительности же он весьма сложен, и сущность его до настоящего времени еще окончательно не выяснена.

При рассмотрении фиксированного препарата нужно учитывать, что живое вещество состоит из 80% воды, 12% белков, 7% жиров и жироподобных веществ и что большая часть сухих веществ при жизни находится в растворенном состоянии. Следовательно, процесс фиксации, даже при использовании наилучшей техники, связан с более или менее глубокими изменениями. Не существует такой фиксирующей жидкости, которая одинаково хорошо сохранила бы все составные части клеток и тканей (Ромейс, 1954).

Среди многих изменений, связанных с фиксацией, наиболее обычны изменения объема. Это можно проследить как на отдельных структурных элементах, так и по общей величине и виду препарата. Б. Ромейс (1954) считает, что чаще всего имеет место сжатие, но не исключено и набухание. Степень изменений различна и зависит как от органа, так и от его физико-химического состояния и фиксирующей жидкости.

Задача настоящего исследования состояла в сравнении влияния шести наиболее распространенных фиксаторов на размеры клеточных ядер и хромосом для того, чтобы определить фиксатор, дающий самые стабильные результаты.

Материал и методика

В работе были использованы корешки проростков озимой пшеницы (*Triticum vulgare* Host) двух сортов: 'Каука' и 'Универсал'. Применяли шесть фиксаторов следующего состава:

ацеталкоголь: ледяная уксусная кислота — 1 мл, абсолютный спирт — 3 мл;

жидкость Ньюкомера (Newcomer, 1953): изопропиловый спирт — 6 мл, пропионо-вая кислота — 3 мл, диоксан — 1 мл, ацетон — 1 мл, петролейный эфир — 1 мл;

жидкость Карпеченко: 1%-ная хромовая кислота — 15 мл, 16%-ный формалин — 3 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл, вода дистиллированная — 17 мл;

жидкость Навашина (состав этого и следующих фиксаторов — Прозина, 1960): 1%-ная хромовая кислота — 12 мл, 16%-ный формалин — 4 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл;

жидкость Буэна: формалин — 5 мл, насыщенный водный раствор пикриновой кислоты — 15 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл;

жидкость Карнуа: абсолютный спирт — 6 мл, хлороформ — 3 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл.

В смеси ледяной уксусной кислоты и абсолютного спирта корешки фиксировали в течение двух недель, в остальных фиксаторах — в течение 24 часов. После промывки фиксированный материал хранили в спирте (70 или 90°). Корешки окрашивали ацеторсеином (при нагревании в уксусно-кислом растворе красителя в течение 3 мин). Для приготовления временных давленных препаратов использовали кончики окрашенных корешков длиной в 2 мм (La Cour, 1941). У полученных препаратов в световом микроскопе МБИ-6 при помощи окулярного микрометра измеряли диаметры интерфазных ядер (увел. 700×).

Было исследовано 480 корешков пшеницы, каждым фиксатором обрабатывалось 80 корешков (40 корешков одного сорта и 40 — другого). Объемы клеточных ядер определяли по формуле эллипсоида $\frac{4}{3}abc$, где a — длинная полуось, b — перпендикулярная к ней короткая полуось. Для упрощения измерений (проведения их в одной плоскости) принимали $c=b$, так как обе короткие полуоси явно короче полуоси a и близки по длине друг другу.

Экспериментальная часть и обсуждение

В табл. 1 и 2 приведены результаты измерений — средние условные объемы клеточных ядер и хромосом в корешках двух сортов пшеницы — 'Универсал' и 'Каука' — при разных фиксаторах. Данные таблиц представляют собой средние арифметические 4000 измерений (измеряли по 100 ядер в каждом корешке).

Таблица 1

Средние объемы клеточных ядер и хромосом в корешках пшеницы сорта 'Универсал'

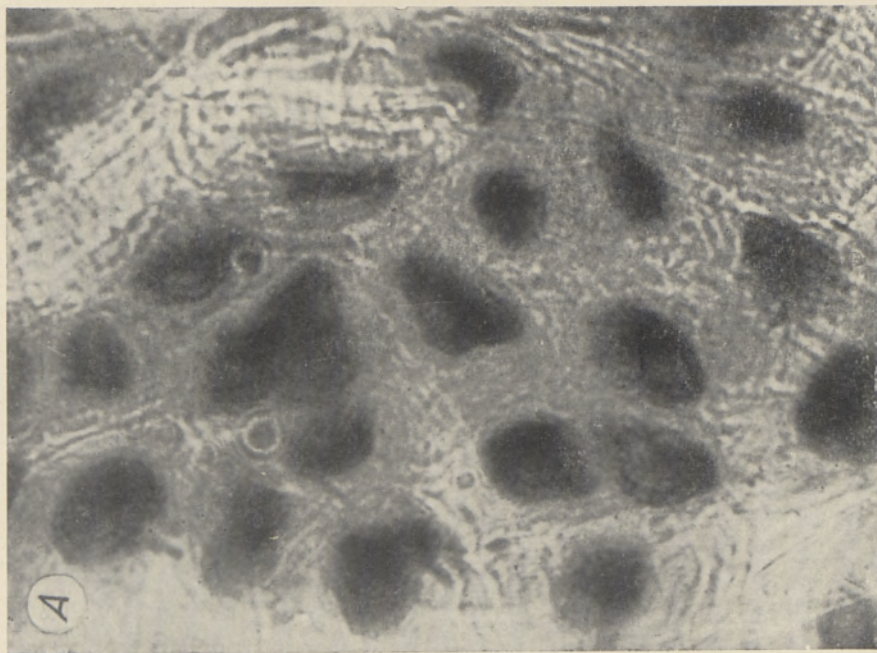
Фиксатор	Средний объем ядра	Средний условный объем хромосомы
Карпеченко	1621,1	38,60 ± 0,95
Навашина	1622,9	38,64 ± 1,07
Ацеталкоголь	1799,6	42,85 ± 1,18
Ньюкомера	1791,3	42,65 ± 0,97
Буэна	1844,0	43,91 ± 1,17
Карнуа	1947,4	46,37 ± 0,76

Таблица 2

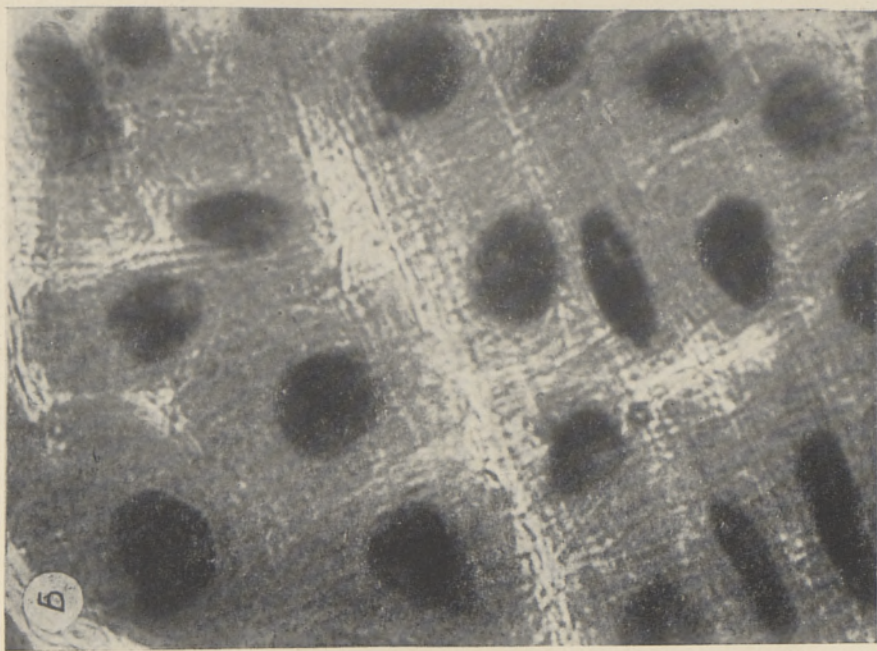
Средние объемы клеточных ядер и хромосом в корешках пшеницы сорта 'Каука'

Фиксатор	Средний объем ядра	Средний условный объем хромосомы
Карпеченко	1554,5	37,01 ± 0,67
Навашина	1640,1	39,05 ± 0,67
Ацеталкоголь	1785,9	42,52 ± 1,21
Ньюкомера	1769,9	42,14 ± 1,05
Буэна	1671,2	39,79 ± 1,13
Карнуа	1775,9	42,28 ± 0,81

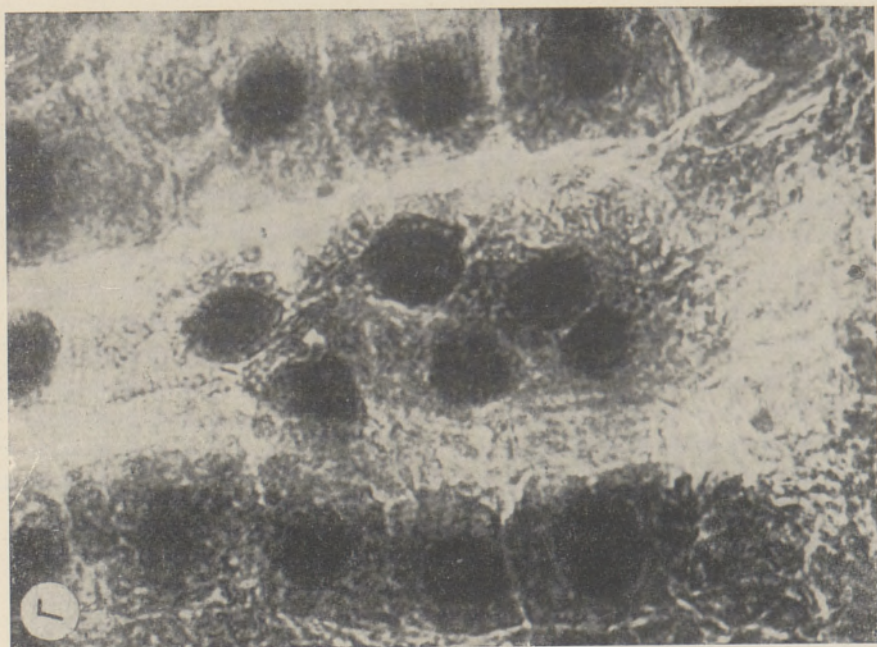
Клеточные ядра в корешках пшеницы сорта 'Универсал', фиксированных в разных фиксаторах



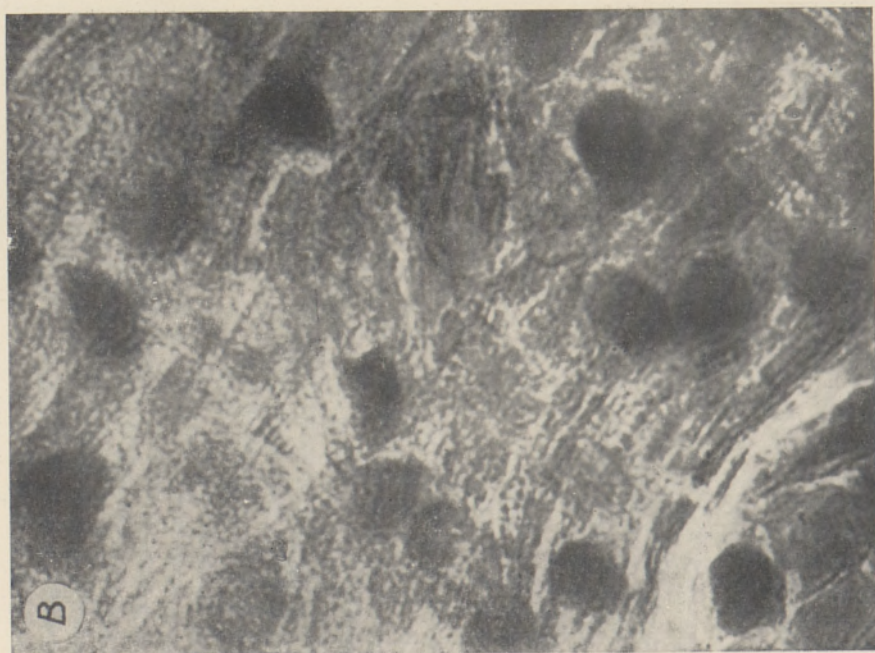
В ацеталкоголе (увел. 700×).



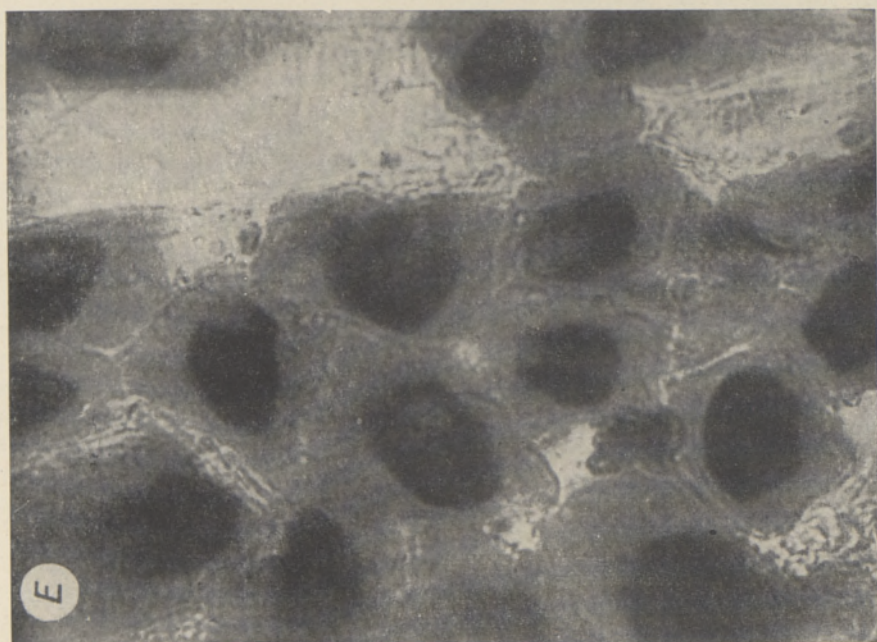
По Ньюкомеру (увел. 700×).



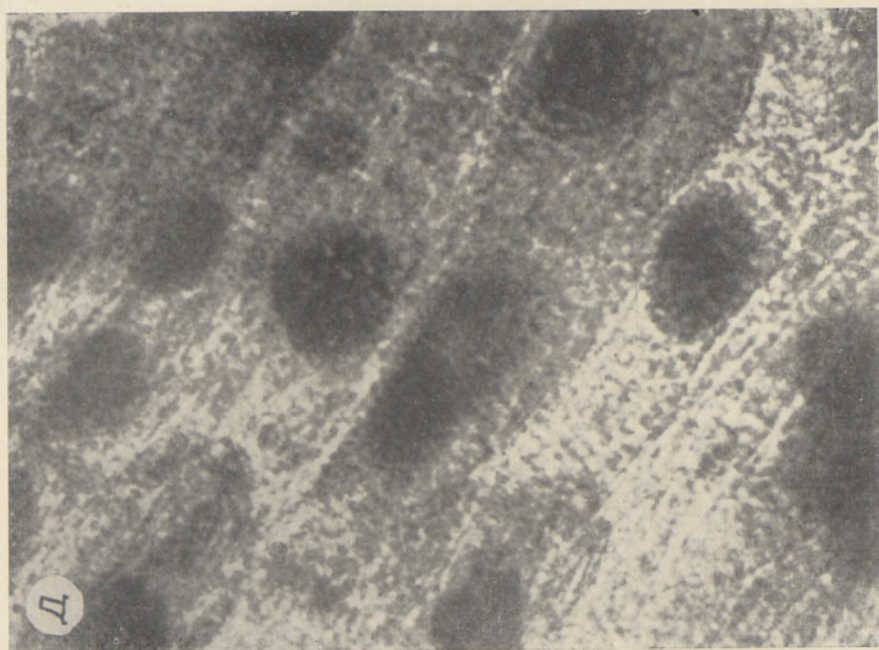
По Навашину (увел. 700X).



По Карлеченко (увел. 700X).



По Карпу (увел. 700×).



По Буэну (увел. 700×).

При сравнении данных по разным фиксаторам видны различия между объемами хромосом и клеточных ядер. Используемые фиксаторы можно разделить на 3 группы, по два в каждой. В корешках сорта 'Универсал', фиксированных в жидкостях Карпеченко и Навашина, средний объем хромосомы был наименьшим (около $38\mu^3$), в жидкостях Буэна и Карнуа — наибольшим (около $44\mu^3$ и $46\mu^3$). В материале, фиксированном в ацеталкоголе и жидкости Ньюкомера, средний объем хромосомы занимал промежуточное положение по отношению к среднему объему хромосомы в материале, обработанном двумя приведенными выше парами фиксаторов. У сорта 'Каука' средний объем хромосомы также оказался наименьшим в корешках, фиксированных в жидкостях Карпеченко и Навашина, а именно около $37\mu^3$ и $39\mu^3$ соответственно, и он был близок к сорту 'Универсал' (около $42\mu^3$) при использовании жидкости Ньюкомера и ацеталкоголя. Самые большие различия в объеме хромосом наблюдались у сорта 'Каука' при сравнении с сортом 'Универсал' в корешках, фиксированных по Буэну и Карнуа, эти различия достигали 4—4,5 μ^3 . Вероятно, одной из причин этих различий можно считать более длительное хранение корешков сорта 'Каука' в спирте. Данные литературы также отмечают, что жидкость Буэна очень незначительно сжимает ткани, лишь на 2,5% исходного объема. Однако при последующей обработке спиртом сжатие продолжается и доходит до 10% (Ромейс, 1954; Алексеева и др., 1959).

Различные фиксаторы по-разному влияют и на способность к окраске препаратов. Есть ряд особенно чувствительных окрасок, которые с успехом можно применять лишь в том случае, если препарат предварительно обработан определенным фиксатором. Так, после фиксации в жидкости Флемминга гемалаун окрашивает с трудом, тогда как на этом же материале окраска сафранином или железным гематоксилином хорошо удается (Ромейс, 1954).

Весьма существенные различия можно было заметить и в настоящей работе при окраске ацеторсеином материала, обработанного различными фиксаторами. Лучше всего ядра окрашивались в корешках, фиксированных в жидкости Ньюкомера и ацеталкоголе. Неплохие результаты были получены и после фиксации корешков в жидкостях Буэна и Карнуа. Наихудшие результаты дали жидкости Карпеченко и Навашина. (Микрофото А—Е).

На основании данного исследования можно сделать вывод о том, что наиболее стабильные результаты дает обработка корешков пшеницы фиксатором Ньюкомера и ацеталкоголем. Ввиду того, что фиксатор Ньюкомера имеет значительную токсичность, для цитологических исследований, связанных с измерением ядерных диаметров, следует рекомендовать ацеталкоголь.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Н. М., Ванников Л. Л., Виноградов В. В., Виноградова С. М., Донских Н. В., Жук В. П., Котовский Е. Ф., Лагучев С. С., Оганесян Т. Г., Субботин М. Я., Суханов А. Ф., 1959. Основы общей гистологии и гистологическая техника. М.
- Ньюбом Н., 1957. Дополнительные опыты по изучению действия на растения хронического γ -облучения. В сб.: Радиоактивные излучения и селекция растений: 75—87. М., ИЛ.
- Орав Т., Шнайдер Т., Кальюсте Х., Орав И., 1967. О количественной модели радиочувствительности растений. Изв. АН ЭССР, Биология 16 (2): 149—156.

- Прозина М. Н., 1960. Ботаническая микротехника. М.
 Ромейс Б., 1954. Микроскопическая техника. М., ИЛ.
 La Cour L., 1941. Acetic-orcein: a new stain-fixative for chromosomes. *Stain Technology* **16** (4) : 169—174.
 Lunden A. O., 1964. Seed embryo features and irradiation response. *Radiat. Bot.* **4** (4) : 429—437.
 Newcomer E. H., 1953. A cytological and histological fixing fluid. *Science* **118** : 161.
 Osborne T., Lunden A., 1964. Seed radiosensitivity: a new constant? *Science* **145** (3633) : 710—711.
 Sparrow A. H., Christiansen E., 1953. Tolerance of certain higher plants to chronic exposure to gamma radiation from Cobalt-60. *Science* **118** : 697—698.
 Sparrow A. H., Miksche J. P., 1961. Correlation of nuclear volume and DNA content with higher plant tolerance to chronic radiation. *Science* **134** : 282—283.
 Sparrow A. H., Schairer L. A., Sparrow R., 1963. Relationship between nuclear volumes, chromosome numbers and relative radiosensitivities. *Science* **141** (3576) : 163—166.
 Van't Hof J., Sparrow A. H., 1965. Radiation effects on the growth rate and cell population kinetics of actively growing and dormant roots of *Tradescantia paludosa*. *J. Cell. Biol.* **26** (1) : 187—199.

Институт экспериментальной биологии
 Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
 4/III 1967

H. KALJUSTE

ERINEVATE FIKSAATORITE MOJUST RAKUTUUMADE MÖÖMETELE KAHEL TRITICUM VULGARE HOST SORDIL

Resüme

Kahe talinisusordi — 'Universaal' ja 'Kauka' — juureotsakesi töödeldi kuue fiksaatoriga (atseetalkohol; Newcomeri, Karpetsenko, Navašini, Bouin'i ja Carnoy' iksaatorid). Atseetortseiniiga värvitud juuretippudest valmistati ajutised preparaadid, mille valgusmikroskoobis okulaarmikromeetri abil mõõdeti interfaasete tuumade diameetrid (suurendus 700×). Tuumade maht määrati ellipsoidi valemi ($\frac{4}{3} \pi abc$) põhjal. Kromosoomi keskmine tinglik maht saadi interfaasse tuuma mahu jagamisel diploidse kromosoomide arvuga (2n).

'Universaali' juurtes oli kromosoomi keskmine maht kõige väiksem Karpetsenko ja Navašini fiksaatorite kasutamisel (keskmiselt 38 μ^3), kõige suurem Bouin'i ja Carnoy' fiksaatorite puhul (ca 44 ja 46 μ^3). Keskmised tulemused saadi Newcomeri fiksaatoris ja atseetalkoholis fikseeritud materjalil (ca 42 μ^3).

'Kauka' puhul saadi eelmisele sordile lähedased andmed atseetalkoholi, Newcomeri, Karpetsenko ja Navašini fiksaatorite kasutamisel. Suuremad olid kromosoomide mahu erinevused sortide vahel Bouin'i ja Carnoy' vedelikes fikseeritud juurtel (kuni 4—4,5 μ^3).

Saadud andmete põhjal tehakse järeldus, et kõige stabiilsemad tulemused rakutuumade mõõtmistes annab nisu juurte töötlemine atseetalkoholi ja Newcomeri fiksaatoriga.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
 Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse
 4. III 1967

H. KALJUSTE

ON THE INFLUENCE OF DIFFERENT FIXING FLUIDS ON THE VOLUME OF CELL NUCLEI IN TWO VARIETIES OF TRITICUM VULGARE HOST

Summary

Root-tips of two varieties of winter wheat ('Universal' and 'Kauka') were fixed in six different fixing fluids, involving glacial acetic acid: absolute alcohol (1:3), Newcomer's, Karpechenko's, Navashin's, Bouin's and Carnoy's fluids. Preparations were made from root-tips stained in aceto-orcein, and the diameters of interphase nuclei were

measured in light microscope. The volumes of nuclei were calculated by the formula of ellipsoid — $\frac{4}{3}\pi abc$. The average chromosome size was calculated by dividing the volume of interphase nuclei by diploid chromosome number ($2n$).

The average chromosome size in the root-tips of 'Universal' variety was smallest when Karpechenko's and Navashin's fluids were used (ca $38 \mu^3$ on the average), and it was greatest when Bouin's and Carnoy's fluids were employed (ca 44 and $46 \mu^3$). Intermediate data were obtained in the material fixed in Newcomer's fluid as well as in glacial acetic acid: absolute alcohol (ca $42 \mu^3$).

The results were practically similar in the case of the 'Kauka' variety. However, marked differences (up to $4-4.5 \mu^3$) between the two varieties were observed when Bouin's and Carnoy's fluids were used.

On the grounds of the data obtained it was concluded that the mixture glacial acetic acid: absolute alcohol and Newcomer's fluid are the most suitable fixators for measuring cell nuclei in wheat.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
March 4, 1967