

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. А. М. ГОРЬКОГО

БОТАНИЧЕСКАЯ МИКРОТЕХНИКА

Руководство к практическим занятиям

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2001

Составители: *И. А. Уткина, А. В. Мальцев,
С. А. Зимницкая, Н. А. Кутлунина*

Ответственный редактор *И. А. Уткина*

К настоящему времени в литературе по ботанической микротехнике накопились значительные сведения (Навашин, 1934; Наумов, Козлов, 1954; Прозина, 1960; Львова, 1964; Паламарчук, 1964; Абрамова, Карлинский, 1968; Фурст, 1979; Пермьяков, 1988; Барыкина, Веселова и др., 2000; и др.). В этих пособиях авторами излагаются общие приемы, касающиеся методов обработки материала для изготовления из него постоянных и временных препаратов. Однако изучение отдельных растительных тканей в связи с их специфическим строением и функцией требует некоторых изменений методики и уточнения основных приемов работы с микроскопической техникой. К тому же многие из перечисленных литературных источников стали библиографической редкостью.

В основу содержания настоящего руководства положены данные методики и техники микроскопических исследований, экспериментально проверенные в течение многих лет применительно к образовательным тканям вегетативных и генеративных побегов и корней многолетних злаков, с использованием имеющихся литературных сведений.

Методическое руководство написано в целях облегчения и лучшей организации самостоятельной работы студентов дневного и заочного обучения во время практических занятий по разделу большого спецпрактикума «Ботаническая микротехника», а также для выполнения курсовых и дипломных работ. Оно составлено в соответствии с программой, утвержденной на кафедре ботаники Уральского университета.

Основное внимание уделено методике получения микротомных препаратов, наиболее трудоемкой и широко распространенной в анатомических и цитозембриологических исследованиях. Приводятся сведения о приготовлении временных препаратов, микроскопе и основных вспомогательных приборах, используемых наиболее часто (осветитель, винтовой окулярный микроскоп, рисовальный аппарат).

Раздел «Микроскоп» составлен А. В. Мальцевым. Разделы «Основные вспомогательные приборы», «Методика получения постоянных препаратов», «Методика получения временных препаратов», составлены И. А. Уткиной. Раздел «Микрофотография» составлен И. А. Уткиной, А. В. Мальцевым и Н. А. Кутлуниной. Раздел «Методика приготовления препаратов для цитозембриологических исследований» составлен С. А. Зимницкой и Н. А. Кутлуниной.

МИКРОСКОП

Общие сведения

Микроскоп представляет собой сложный оптико-механический прибор, который служит для рассмотрения объектов, недоступных невооруженному глазу (клетка и ее органеллы). Микроскоп дает увеличенное, обратное и мнимое изображение. Существует два основных вида микроскопии: световая и электронная и соответственно два метода. Они различаются по принципу рассмотрения объекта: в одном случае в потоке видимой части электромагнитного излучения (длина волны 400–550 нм), в другом случае в потоке электронов с длиной волны в зависимости от напряженности электромагнитного поля до 2 нм. В соответствии с двумя основными методами проводят микроскопическое и ультрамикроскопическое изучение объектов, что связано с различной разрешающей способностью микроскопов.

Разрешающая способность (предел разрешения) – это минимальное расстояние между двумя точками объекта, при котором они видны раздельно. Разрешающая способность человеческого глаза составляет около 100 мкм. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа в зависимости от используемого источника света – 0,13–0,20 мкм. Наибольшее полезное увеличение его около 1000 раз. Разрешающая способность электронного микроскопа – 0,1–0,2 нм. Он дает увеличение в 10 и 100 тыс. раз. Разрешающая способность светового микроскопа (d) зависит не только от длины волны источника освещения (λ), но и от коэффициента преломления среды (n), через которую происходит наблюдение объекта, а также от угла наклона, под которым лучи освещения входят в объектив. Она определяется по формуле:

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha},$$

где α – половинный угол входного отверстия объектива.

Показатели знаменателя этой формулы ($n \cdot \sin \alpha$) составляют числовую апертуру (A), являющуюся главной характеристикой объективов наряду с их увеличением.

Стандартный набор объективов микроскопа составляют объективы малого увеличения $\times 9$ с апертурой 0,2 и объективы большого увеличения $\times 20$ с апертурой 0,4 и $\times 40$ с апертурой 0,65. Эти объективы

называют «сухими», так как рассмотрение объекта с их помощью происходит через воздушную среду ($n = 1$). Большинство микроскопов оснащены специальными иммерсионными объективами, для которых необходима специальная иммерсионная среда ($n = 1,33$). Такой средой может быть вода, и тогда иммерсия является водной. Объективы водной иммерсии имеют белую полосу на корпусе и обозначение «ВИ». Объектив $\times 40$ «ВИ» имеет апертуру 0,75. Наиболее распространена в микроскопии масляная иммерсия ($n = 1,51$). Иногда для масляной иммерсии используют глицерин-водную смесь ($n = 1,41$). Объективы масляной иммерсии имеют черную полосу на корпусе объектива и обозначение «МИ». Объектив $\times 90$ «МИ» имеет апертуру 1,25. В случае использования иммерсии увеличивается показатель апертуры, что улучшает разрешающую способность светового микроскопа. Увеличение числовой апертуры можно достичь и с помощью увеличения угла пучка света, входящего в объектив. Причем максимальное значение апертуры, достигаемое при этом, наблюдается тогда, когда этот угол прямой. В этом случае свет подается на рассматриваемый объект сбоку и только благодаря отражающей способности объекта видно его изображение в окуляре. Этот принцип реализуется в темнопольном конденсоре и представляет собой метод *темного поля*. Темнопольный конденсор может быть установлен в обычный световой микроскоп. С помощью темнопольного конденсора можно изучать живые объекты, так как при микроскопировании не требуется их специальная обработка.

Устройство светового микроскопа

Световой микроскоп состоит из оптической и механической систем. Оптическая система микроскопа включает следующие части: объектив, окуляр, конденсор, зеркало. Объектив строит увеличенное, обратное и действительное изображение. Он представляет наиболее важную часть микроскопа: именно от него зависит увеличение и четкость изображения. К микроскопу прилагается несколько объективов, дающих разное увеличение: 8-, 20-, 40-, 90-кратное.

Объективы микроскопа, кроме характеристик увеличения и апертуры, имеют показатели качества, связанные с недостатками (абберациями) линз. Различают несколько типов аббераций оптической системы микроскопа. *Сферическая абберация* – изображение точки передается в виде кружка рассеяния. *Астигматизм* – изображение

точки передается в виде кружка рассеяния, имеющего не круглую, а эллипсоидную форму. *Кома* – резкость изображения снижается от центра к границе поля зрения. *Кривизна поля зрения* не позволяет одновременно резко видеть центр и края поля зрения. *Дисторсия* определяет резкое линейное увеличение в центре и на краях поля зрения. В зависимости от устранения вышеуказанных aberrаций различают объективы анастигматические (свободные от астигматизма), апланатические (без комы и сферической aberrации) и ортоскопические (без дисторсии).

Существуют еще *хроматические aberrации*, связанные с передачей цвета изображения. При этом различают хроматизм положения, когда изображения различных цветов располагаются на неодинаковом расстоянии от оптической системы, и хроматизм увеличения, когда изображения различных цветов имеют неодинаковые размеры. В соответствии с тем, насколько объективы исправляют aberrации, их делят на *ахроматы*, *апохроматы*, *планахроматы* и *планапохроматы*. У объективов ахроматов исправлены сферическая aberrация, кома и хроматизм положения для двух длин волн. Они дают плоское изображение, но, как правило, не передают цветовую гамму и слабо передают мелкую структуру объекта. Апохроматы имеют маркировку АПО и исправляют сферическую aberrацию, кому, астигматизм и хроматизм положения для трех длин волн. Они дают искривленное поле зрения. Удобны при изучении деталей объекта. Планахроматы (полуахроматы) дают чрезвычайно плоское поле зрения. Используются в микрофотографировании. Объективы часто бывают рассчитаны и на толщину покровного стекла (0,16–0,17 мм).

Окуляр дает прямое, мнимое и увеличенное изображение. При этом он только увеличивает построенное объективом изображение, но не выявляет в нем новых деталей. На практических занятиях будут использоваться окуляры с 7-, 10-, 15-кратным увеличением. Для более качественного изображения применяют специальные компенсационные окуляры с маркировкой «К» и «Ф». Последний используется в микрофотографии.

Таким образом, к подбору объективов и окуляров надо подходить сознательно. Одно и то же увеличение объекта можно получить при разных наборах окуляров и объективов. Например, 100-кратное увеличение можно получить при таком наборе:

Объектив с увеличением	Окуляр с увеличением
25	4
20	5
10	10
5	20

Учитывая, что с разрешающей способностью микроскопа связан объектив, а окуляр лишь увеличивает объект, целесообразнее выбрать первую пару (25×4). Необходимо также помнить, что с ростом апертуры объектива увеличивается разрешающая способность микроскопа, но при этом уменьшается глубина резкости.

Конденсор с апертурной диафрагмой служит для наилучшего освещения изучаемого объекта. Изменением положения конденсора и размера апертурной (ирисовой) диафрагмы регулируют количество и угол наклона световых лучей, падающих на объект. Увеличение диаметра отверстия диафрагмы уменьшает освещение объекта, но увеличивает глубину резкости. Конденсор позволяет осветить объект широко расходящимся пучком лучей, что особенно необходимо при работе с большим увеличением.

Зеркало служит для направления лучей от источника света в конденсор. Зеркало имеет плоскую и вогнутую поверхность. Плоская сторона используется при работе с искусственным источником света, расположенным близко от микроскопа. Вогнутая – при использовании естественного освещения и при работе с большим увеличением.

Механическая часть микроскопа состоит из основания (подставки), механизма микроскопической фокусировки, предметного столика, кронштейна конденсора, тубусодержателя с механизмом макрометрической фокусировки, тубуса и револьвера.

Предметный столик служит для установки исследуемого препарата. В центре столика имеется отверстие, в которое направлена верхняя часть конденсора. У микроскопа МБР-1 верхнюю часть предметного столика можно вращать вокруг оптической оси. С помощью винтов, расположенных сбоку, производят центровку предметного столика. Отверстия на поверхности столика служат для установления зажимов и препаратоводителя.

Механизм макрометрической настройки служит для грубой настройки микроскопа. Он имеет два винта и может перемещаться в вертикальном направлении в пределах 50 мм.

Механизм микрометрической настройки предназначен для тонкой фокусировки. Величина перемещения тубусодержателя с помощью микрометрического механизма равна 2,2–2,4 мм. Крайние положения тубусодержателя отмечены рисками на коробке механизма. При работе с этим механизмом нужно быть особенно аккуратным, так как ограничители его работы легко выходят из строя.

Микроскопы для изучения биологических объектов

В настоящее время выпускается много моделей световых и электронных микроскопов, предназначенных для изучения биологических объектов. Все микроскопы делятся на несколько типов: школьный, биологический (МБ), стереоскопический (МБС), поляризационный (МП), люминесцентный (МЛ), ультрафиолетовый (МУФ), инфракрасный (МИК), сравнения (МС), электронный (ЭМ) и др.

Наиболее распространены микроскопы фирмы «ЛОМО» марки Биолам, которые выпускаются тремя сериями. Микроскопы серии «Дорожные» с маркировкой МБД-1, МБД-2 и МБД-3 удобны возможностью транспортировки в специальном чемоданчике. Серия «Студенческие» применяется в основном в учебных целях. Самая разнообразная серия «Рабочие»: микроскопы с маркировкой МБР-1, МБР-2, МБР-3 и МБР-5 и специальные микроскопы с маркировкой МБР-4 и МБР-6. Различия между микроскопами одной серии состоят в комплектации микроскопа вспомогательными устройствами: осветителями, бинокулярной насадкой, типом предметного столика и наличием препаратодителя. Все эти микроскопы снабжены объективами малого ($\times 8$) и большого увеличения ($\times 20$, $\times 40$) и имеют иммерсионные объективы ($\times 90$), в наличии набор окуляров $\times 7$, 10, 15.

В биологических исследованиях часто используются стереоскопические микроскопы. Эти микроскопы в отличие от микроскопов Биолам предназначены для работы с объектами в отраженном свете, поэтому они не дают большого увеличения: объективы $\times 0,6$, 1, 2, 4, 7; окуляры $\times 6$, 8, 12,5. Маркировки наиболее употребляемых микроскопов: МБС-1, МБС-2, МБС-9, МБС-10. Все микроскопы имеют бинокулярную насадку, а микроскопы МБС-9 и МБС-10 имеют встроенные осветители.

Самыми совершенными из отечественных микроскопов являются микроскопы МБИ. Эти универсальные микроскопы предназначены

для исследовательских целей. Они имеют многочисленные дополнительные устройства: осветитель, фотонасадку, люминесцентное освещение и др. Эти микроскопы содержат большой набор объективов малого и большого увеличения, разнообразные окуляры. Маркировки этих микроскопов: МБИ-1, МБИ-6, МБИ-15. Последние два микроскопа стационарные, имеют собственный стол с двумя тумбами для содержания ЗИП.

ОСНОВНЫЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРИБОРЫ

Осветитель

Получение точного изображения изучаемого объекта во многом зависит от условий освещения. Наилучшие условия освещения позволяют максимально использовать оптические возможности микроскопа. В микроскопической технике чаще всего используются осветители типа ОИ-9 и ОИ-19. Настройка рационального освещения по Келлеру осуществляется в следующем порядке:

1. Штатив микроскопа и осветитель поставить на соединительную планку, обеспечивающую нужное фиксированное расстояние между ними, около 25 см.

2. Включить осветитель и, перемещая патрон с лампой в корпусе осветителя вокруг вертикальной и горизонтальной осей, направить пучок света на плоское зеркало микроскопа, установленное примерно под углом 45° .

3. Положив препарат на предметный столик микроскопа, навести на фокус при малом объективе.

4. Закрывать полевую диафрагму осветителя и апертурную диафрагму микроскопа, поднять конденсор впритык к предметному столику и вынуть матовое стекло.

5. Перемещая лампу вращательными движениями по горизонтальной прямой, получить четкое изображение нитей лампы на лепесток апертурной диафрагмы конденсора (для удобства на поверхность зеркала положить лист белой бумаги). Осторожно меняя положение зеркала и слегка смещая лампу, добиться расположения нитей в центре диафрагмы.

6. Вынуть окуляр и поворотом зеркала совместить изображение полевой диафрагмы (светящуюся точку) с центром поля зрения.

7. Открыть полевую диафрагму осветителя и открывать апертурную диафрагму до тех пор, пока ее изображение не займет 2/3 поля зрения.

8. Вставив окуляр и матовое стекло, с помощью реостата осветителя установить нужную яркость освещения.

При переходе к работе с другим объективом следует закрыть полевую диафрагму и проверить (а если нужно, то исправить) установку света.

Рисовальный аппарат РА-4

Для зарисовки изображений, получаемых в микроскопе, используют рисовальный аппарат типа РА-4, который одевается на тубус микроскопа. Рисовальный аппарат состоит из *призмы-кубика* с набором светофильтров и *плоского зеркала*, которые плотно соединены друг с другом при помощи штанги длиной около 13 см.

Принцип работы с рисовальным аппаратом заключается в совмещении лучей, идущих от объекта под микроскопом и от плоскости бумаги, в результате чего глаз получает возможность одновременно воспринимать увеличенное изображение и плоскость бумаги. Это обеспечивается призмой-кубиком и расположением зеркала под углом к штанге 45° . Лучи от препарата, проходя через микроскоп и призму-кубик, воспринимаются глазом. Лучи идущие от бумаги сначала попадают на зеркало, затем, отражаясь от него под углом 45° , попадают в призму-кубик, где еще раз отражаются и воспринимаются глазом одновременно с лучами от объекта.

Обязательным условием четкой видимости изображения и поверхности бумаги является равенство яркости их освещения. Если поле зрения освещено ярче бумаги, то изображение видно хорошо, а кончик карандаша на поверхности бумаги будет едва заметен или совсем не виден. При обратном соотношении видны карандаш и бумага, а изображение отсутствует или становится едва заметным.

Работа с рисовальным аппаратом осуществляется следующим образом:

1. Ослабить винт кольца рисовального аппарата и надеть его на тубус микроскопа, из которого предварительно вынуть окуляр.

2. Вставить окуляр на прежнее место и с помощью винта закрепить аппарат на микроскопе так, чтобы его откидная часть была

расположена параллельно глазной линзе окуляра и почти соприкасалась с нею.

3. Зеркало рисовального аппарата поместить с правой стороны микроскопа, а под ним положить лист бумаги. При вертикальном тубусе плоскость бумаги должна быть параллельной плоскости стола, а при наклонном – располагаться под углом, обеспечивающим ее перпендикулярность к оси тубуса. В последнем случае удобно пользоваться специальным рисовальным столиком с наклонной плоскостью.

4. Отбросив откидную часть аппарата, навести объект на фокус и осветить его источником направленного света, после чего снова опустить откидную часть на тубус.

5. Выравняв интенсивность освещения поля зрения и бумаги, добиться четкой видимости увеличенного изображения объекта и кончика карандаша на бумаге. Уравновешивание степени освещения производится изменением интенсивности источника света и за счет наборов светофильтров, имеющихся в откидной части рисовального аппарата.

6. Смотреть через линзу рисовального аппарата в микроскоп и, видя изображение объекта, совмещенное с бумагой, обвести его карандашом.

7. Дорисовать детали и закончить рисунок следует без рисовального аппарата, для чего нужно отбросить его откидную часть.

Винтовой окулярный микрометр

Линейное измерение микроскопических объектов производится винтовым окулярным микрометром МОВ-1-15х. Он состоит из *корпуса*, *окуляра* и вращающегося *барабана* со 100 делениями при цене одного 0,01 мм. В окуляр вмонтирована неподвижная шкала с 8 делениями по 1 мм каждое и подвижная сетка, представленная перекрестием и двумя штрихами.

Измерение производится так, что перекрестие подводят к одному краю измеряемого объекта, отмечая отсчет по шкале и барабану, затем переводят его к другому краю и вновь производят отсчет. Разность между двумя отсчетами по барабану и дает длину объекта при данном увеличении объектива. Чтобы определить истинные размеры объекта, нужно полученную разность отсчетов разделить на линейное увеличение объектива.

Определение линейного увеличения объектива (β) удобно проводить в следующей последовательности:

1. Установить на предметный столик микроскопа объективный микрометр, поймать изображение его шкалы (длина линейки 1 мм, цена деления 0,01 мм).

2. Вынуть из тубуса микроскопа окуляр и надеть на него винтовой окулярный микрометр, закрепив винтом.

3. Совместить перекрестие винтового окулярного микрометра с одним из длинных делений объективного микрометра в правой части поля зрения микроскопа и записать показания по шкале и барабану винтового окулярного микрометра (A).

4. Вращая барабан винтового окулярного микрометра по часовой стрелке, совместить его перекрестие с одним из длинных делений объективного микрометра в левой части поля зрения микроскопа и снова записать показания по шкале окулярного микрометра (B).

5. Сосчитать число делений по шкале объективного микрометра между первым и вторым замерами (z).

6. Полученные данные подставить в формулу:

$$\beta = \frac{A - B}{z \cdot \alpha},$$

где β – линейное увеличение объектива,

$A - B$ – разность отсчетов по шкале винтового окулярного микрометра,

z – число делений объективного микрометра, полученных при измерении,

α – цена деления шкалы объективного микрометра.

Таким способом определяется линейное увеличение объектива не менее трех раз. Среднее из них будет окончательной цифрой. Линейное увеличение определяется для каждого объектива, входящего в комплект данного микроскопа.

Микрофотографирование – это широко распространенное средство не только для иллюстрирования научных, дипломных и курсовых работ, но и средство для документирования и сохранения во времени изображений микроскопических объектов. Одновременно микрофотографирование является научным методом исследования и анализа изображений.

Для микрофотографирования через микроскоп используют специальные устройства, которые называются микрофотонасадками. Они могут быть пленочными и пластиночными. В комплект фотонасадок МФН-2 и МФН-8 входит фотокамера 9×12, вертикальный тубус, окуляр компенсационный («Ф» или «К»), светофильтры и кассеты 9×12 см.

Микрофотонасадки МФН-3, МФН-9 и МФН-12 имеют пленочную камеру фотоаппарата «Зоркий-4» или «Зенит». Эти фотонасадки являются универсальными, так как приспособлены ко всем штативам биологических рабочих микроскопов, имеющих стандартное гнездо для окулярного тубуса.

К микроскопам стереоскопическим, в которые объект рассматривается чаще всего в отраженном свете, выпускается микрофотонасадка МФН-5. Она устанавливается на оптической головке микроскопа вместо бинокулярного тубуса. Иногда для увеличения размеров изображения на негативе и увеличения разрешающей способности микрофотографирования применяют переходные кольца. Они одеваются на тубус и крепятся специальным винтом. При этом фокусировка изображения производится через камеру фотоаппарата, которая должна быть зеркальной. Для освещения объекта желательно использовать несколько источников света с целью уменьшения тени. Фотографировать можно в темном и светлом полях. Исследовательские микроскопы МБИ-6, МБИ-12 и МБИ-15 имеют автоматический экспонометр и фотонасадки с фотоаппаратом «Зенит» или «Киев», которые входят в комплект микроскопа.

В качестве фотопленок в микрофотографии используют негативные пленки «Микрат-200» (желтый цвет на дневном освещении) и «Микрат-300» (зеленый цвет на дневном освещении). Эти пленки с высокой разрешающей способностью имеют низкую светочувствительность. Они требуют при микрофотографировании довольно длительной экспозиции, которая тщательно подбирается опытным путем.

Для работы пускового механизма камеры фотоаппарата необходимо обязательно использовать фототросик. В качестве фотопластинок используют пластинки репродукционные штриховые изоортохроматические (контрастные).

При сборе насадки и установке ее на микроскоп снимают наклонный тубус и ставят на его место насадку. Вставляют в верхнюю втулку тубуса окуляр из комплекта насадки, устанавливают на верхнюю конусную проточку тубуса корпус насадки и зажимают его винтом.

Для получения качественных микрофотографий необходимо добиться строго равномерного освещения поля зрения микроскопа при максимальном накале ламп осветителя. Тщательно удалить пыль с линз объектов и окуляров и обязательно использовать светофильтры для повышения контраста изображения. Препараты, окрашенные в красный цвет, фотографируют, как правило, с зеленым светофильтром, а фиолетовый – с желтым.

В процессе микрофотографирования необходимо вести специальный журнал, заполнить, который удобно по схеме:

Дата	Номер препарата	Увеличение микроскопа	Выдержка, с	Описание препарата

Для постоянных препаратов вводится дополнительная графа с координатами среза.

Рецепты для приготовления фоторастворов

Проявитель Ф-100 для пленки Микрат

1. Метол 1 г
 2. Сульфит натрия кристаллический ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 26 г
 3. Гидрохинон 3 г
 4. Сода безводная (Na_2CO_3) 26 г
 5. Бромистый калий (KBr) 1 г
 6. Вода дистиллированная до 1 л
- Время проявления 6–8 мин.

Проявитель А-103 для фотобумаг

1. Метол 3,5 г
2. Сульфит натрия кристаллический ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 90 г
3. Гидрохинон 11,5 г
4. Сода безводная (Na_2CO_3) 66 г

5. Бромистый калий (KBr) 1,2 г
6. Вода дистиллированная до 1 л

Закрепитель для пленок и фотобумаг

1. Гипосульфит натрия кристаллический ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 250 г
 2. Метабисульфит калия ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 25 г
 3. Вода дистиллированная до 1 л
- Время фиксации 5–10 мин.

Быстрый закрепитель

1. Гипосульфит натрия кристаллический ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 350 г
 2. Хлористый аммоний (NH_4Cl) 25 г
 3. Вода дистиллированная до 1 л
- Время фиксации до 10 мин.

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Процесс приготовления микротомных препаратов состоит из ряда последовательных операций: фиксации, промывки, обезвоживания, заливки в парафин, получения микротомных срезов, наклейки срезов на предметные стекла, окраски препаратов, заключения срезов в бальзам.

Фиксация материала

Под *фиксацией* (от латинского слова «фиксус» – прочный, неизменный, крепкий) понимается такая обработка материала, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте и сохранить неизменной тонкую структуру его клеток. Фиксация предпринимается для сохранения тканей и органов в таком виде, в каком они были в живом организме к моменту фиксации.

Наряду с сохранением прижизненного строения фиксирующие смеси оказывают на объект уплотняющее действие, что необходимо при его резке, а также химическое воздействие – протравливание, которое облегчает в дальнейшем окрашивание препарата.

При фиксации необходимо помнить, что неудачно зафиксированный материал дальнейшей обработкой уже не может быть исправлен, поэтому необходимо соблюдать *основные правила фиксации*:

1. Фиксатор должен быть всегда свежим. Смесь готовится непосредственно перед фиксацией материала. Нельзя повторно пользоваться

ся одной и той же порцией фиксатора. Любая фиксирующая смесь употребляется только один раз.

2. Фиксатор не должен быть слишком теплым. В летнее время его следует защищать от прямых лучей солнца. Хорошим средством является обертывание содержащих растворы склянок из темного стекла мокрой тканью.

3. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10–15 раз. Недостаточное количество фиксирующей жидкости препятствует равномерности ее воздействия, а разбавление растительным соком снижает концентрацию действующих начал.

4. Особое внимание следует обратить на состояние фиксируемого материала, фиксировать следует только совершенно свежий материал, в нем не должно быть признаков подсыхания или увядания. Для сохранения органами растения тургорного состояния их необходимо обильно полить накануне фиксации. Поскольку обычно фиксируются части растения, то максимально должно быть сокращено время между их отделением от растения и погружением в фиксирующую смесь. Поэтому фиксацию, как правило, следует проводить на месте произрастания растений.

5. В целях быстрого проникновения и полного пропитывания объекта фиксирующей жидкостью он не должен быть объемистым. Нельзя фиксировать органы растения целиком, следует их разрезать бритвой на небольшие кусочки размером 0,5–1 см. Все ненужные покровы и ткани снимаются и обрезаются. Следовательно, объекту придается та форма и величина, которые окажутся наиболее пригодными для дальнейшей обработки материала на микротоме.

6. Необходимым моментом при фиксации является удаление из тканей объекта воздуха, который препятствует равномерному проникновению фиксирующих смесей, особенно водных. Показателем пропитывания объекта фиксатором служит погружение его на дно склянки. Удалить воздух можно путем многократного встряхивания сосуда, где происходит фиксация, или с помощью вакуум-насоса. Довольно удобным и быстрым способом освобождения фиксируемого материала от воздуха является применение медицинского шприца типа «Рекорд».

7. Необходимо соблюдать рекомендуемое время фиксации.

8. В качестве посуды для фиксации можно использовать низкие пробирки с хорошо подобранными корковыми пробками или пени-

циллиновые склянки. Посуда должна быть тщательно промыта с использованием хромовой смеси.

9. При фиксации следует соблюдать этикетирование фиксируемого материала. С этой целью в сосуд с фиксирующей жидкостью перед или одновременно с погружением в нее образца опускают этикетку из бумаги с написанным на ней простым карандашом порядковым номером. Подробная расшифровка этого номера дается в журнале фиксации:

Порядковый номер	Дата фиксации	Фиксируемый орган	Изучаемый вид	Фиксатор	Примечание

Только четкое и аккуратное выполнение всех перечисленных условий и правил может привести к положительным результатам.

Фиксирующие жидкости. Все фиксирующие смеси, применяемые в ботанической микротехнике, делятся на две группы: *водные* и *спиртовые*. Наиболее употребляемые *водные фиксаторы*: фиксатор Навашина, фиксатор Флеминга (боннская смесь), фиксатор Модилевского, фиксатор Карнуа, смесь Яковлева, фиксатор Чемберлена.

Фиксатор Навашина

Хромовая кислота 1%-я – 10 частей,
Формалин 16%-й – 4 части,
Уксусная кислота ледяная – 1 часть.

Для получения 1%-й хромовой кислоты 780 мг хромового ангидрида (CrO_3) смешивают с 99 мл дистиллированной воды. Формалин 16%-й можно получить из продажного 40%-го путем соединения 100 мл 40%-го формалина со 150 мл воды или 40 мл 4%-го формалина с 60 мл H_2O .

Срок пребывания объекта в фиксаторе Навашина составляет 24 часа. Смесь Навашина удобна для фиксации мелких, нежных объектов, особенно верхушек побегов и корней и эмбриологических объектов. Она действует мягко и незначительно нарушает прижизненную структуру клеток, сохраняя морфологические особенности тканей, которые в дальнейшем очень хорошо окрашиваются гематоксилином по Гейденгайну. Но использование жидкости Навашина (в связи с медленным проникновением ее в ткани) требует обязательного отсасывания воздуха из объекта и длительной промывки мате-

риала после фиксации в проточной водопроводной воде. Однако полученные результаты вполне окупают затраченное время.

При применении хромо-формалиновых смесей необходимым условием является их свежесть. Поэтому фиксатор готовят непосредственно перед употреблением. Если и можно допустить смешение хромовой кислоты с уксусной заранее, то добавление формалина должно производиться непосредственно перед самой фиксацией. Поэтому готовить смесь следует в количестве, не превышающем требующегося для 1–2 порций материала. Смесь зеленая или фиолетово-зеленая для фиксации непригодна. Раствор хромовой кислоты лучше держать в склянке из темного стекла или обернутой черной бумагой.

Фиксатор Флеминга (боннская смесь)

Хромовая кислота 1%-я	– 25 мл
Осмиевая кислота 2%-я	– 5 мл
Уксусная кислота ледяная	– 10 мл
Вода дистиллированная	– 60 мл

Удобен для фиксации эмбриологического материала, предварительно расчлененного на мелкие кусочки, толщиной не более 2 мм. Считается наилучшим фиксатором для изучения структуры ядра и хромосом в процессе деления клетки.

Фиксатор Модилевского

Хромовая кислота 1%-я	– 9 частей
Уксусная кислота 5%-я	– 2 части
Двуххромовокислый калий 5%-й	– 2 части
Формалин 16%-й	– 2 части

Продолжительность фиксации 24 часа в темноте. Компоненты фиксирующей смеси соединяют непосредственно перед фиксацией. Фиксатор очень мягкий, хорошо сохраняет строение клеток. По действию на материал сходен с фиксатором М. С. Навашина.

Из *спиртовых фиксаторов* наиболее часто используются следующие:

Фиксатор Карнуа

Спирт 96%-й	– 6 частей
Хлороформ	– 3 части
Уксусная кислота ледяная	– 1 часть

Время пребывания в фиксаторе составляет около 2 часов (при толщине объекта 1–2 мм) или 3–6 часов (при толщине объекта 3–5 мм). Крупные объекты можно оставить в нем на ночь.

Смесь Карнуа удобна для фиксации объемистого эмбриологического материала (бутоны, завязи, соцветия). Она быстро проникает вовнутрь объекта, поэтому не требует отсасывания воздуха и продолжительной отмывки под струей проточной воды. Но раствор Карнуа является фиксатором более грубым, так как быстрое проникновение вовнутрь объекта способствует его сжатию и съеживанию. Кроме того, ткани после пропитывания смесью Карнуа плохо окрашиваются гематоксилином.

Смесь Яковлева

Вода дистиллированная	– 60 см ³
Спирт 96%-й	– 30 см ³
Уксусная кислота ледяная	– 4 см ³
Формалин 40%-й	– 6 см ³

Этот фиксатор удобен для грубых структур, особенно зерновок (но с обязательным предварительным замачиванием их в воде в течение суток). Материал в данной смеси может храниться очень долго, но после фиксации требуется продолжительная отмывка в проточной воде.

Фиксатор Чемберлена

Спирт 70%-й	– 90 частей
Формалин 40%-й	– 5 частей
Уксусная кислота ледяная	– 5 частей

Продолжительность фиксации 12–16 часов, хотя можно оставлять фиксируемый материал в нем и на более длительный срок. Этим фиксатором широко пользуются в цитологических и эмбриологических исследованиях. По своему действию занимает промежуточное место между фиксатором Карнуа (мягче) и Навашина (грубее).

Промывка фиксированного материала

В состав большинства фиксирующих смесей входят многие токсические вещества, длительное воздействие которых отрицательно сказывается на качестве материала. Кроме того, некоторые из компонентов фиксирующих жидкостей (формалин) при продолжительном действии вызывают излишнее уплотнение и хрупкость тканей. Поэтому вслед за истечением срока фиксации материал необходимо очень тщательно отмыть.

Объекты, зафиксированные в водных фиксаторах, промываются в проточной воде не менее 12–24 часов. Объекты, зафиксированные в спиртовых фиксаторах, промываются в двух-трех порциях 70 %-го спирта не менее 1–2 часов.

Для отмывки в проточной воде зафиксированный материал вместе с этикеткой, которая должна сопровождать материал до заливки его в парафин, осторожно переносится в специальную стеклянную трубку (диаметром 1–2 см, высотой 4–5 см), нижний конец которой обвязан марлей. Затем обвязывают марлей верхний конец трубки. При отсутствии трубок материал промывается в двухслойных марлевых салфетках, завязывающихся нитками в узелки. Стеклянные трубки или марлевые узелки переносят в химический стакан, в который ставится воронка. Стакан помещается под водопроводный кран таким образом, чтобы струя воды попадала в него через воронку, а вытекала через щель между ними или из носика стакана. При таком движении воды обеспечивается непрерывное обмывание материала струями, идущими снизу вверх.

Обезвоживание материала и заключение его в парафин

Вся последующая подготовка объектов для приготовления микротомных срезов направлена на создание условий, обеспечивающих непосредственное заключение их в парафин. Осуществляется это двумя последовательными этапами: сначала вода, имеющаяся в объекте, замещается спиртом, который в дальнейшем заменяется промежуточной средой (хлороформом или ксилолом), хорошо смешивающейся со спиртом и способной растворять парафин, полностью замещаясь последним.

Процесс замены воды в объекте называется *обезвоживанием*. Сложность данного процесса состоит в том, что перемещение материала из водной среды в другую должно происходить постепенно, без резкой смены ее состава и концентрации. В противном случае может быть нарушена структура клеток и тканей фиксированного материала. Для постепенного перевода материала из воды в парафин составляется набор смесей воды со спиртом увеличивающейся концентрации, начиная с 10%-го до абсолютного (100 %) через интервал в 10 градусов.

Процесс обезвоживания материала удобно проводить по следующей схеме:

Концентрация спирта, градусы	Срок пребывания материала, мин.
10	10
20	20
30	30
40	30
50	30
60	30
70	30
80	60
90	60
96 I	60
96 II	60
100 I	60
100 II	60

В 70 %-м спирте фиксированный материал может храниться длительное время. Прерывать проводку и оставлять материал в других спиртах не более длительный срок, чем указано в схеме, не рекомендуется.

При проведении материала через различные спирты удобнее не перекладывать материал из одной склянки в другую, а менять концентрации спиртов, сливая спирт меньшей крепости и наливая большей, оставляя объект в одном и том же сосуде. Чтобы объекты во время замены спиртов не попали в склянку со сливаемым спиртом, переливание производят через воронку, обтянутую капроновой или марлевой салфеткой. В качестве посуды для проводки удобно использовать пенициллиновые пузырьки.

После проведения через спирты большого количества материала они загрязняются и концентрация их постепенно снижается. Поэтому время от времени их фильтруют, а затем заменяют свежими. Чаще необходимо заменять спирты более высокой концентрации (70–100 %).

Для удобства работы заготавливают набор спиртов нужной концентрации заранее, пользуясь таблицей (табл. 1).

Получение абсолютного спирта. Абсолютный спирт, необходимый при проводке, получают обезвоживанием (дегидратацией) 96 %-го спирта. В качестве водоотнимающего средства используют медный купорос. Его обезвоживание производят путем нагревания на медленном огне, во время которого он превращается в белый аморфный порошок. Прокаливание производят под тягой в фарфоровом тигле при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Излиш-

Таблица 1

Приготовление спиртов различной концентрации

Требуемая концентрация спирта, градусы	Необходимо взять	
	96%-го спирта	воды дистиллированной
10	10	90
20	21	79
30	31	69
40	42	58
50	52	48
60	62	38
70	73	27
80	83	17
90	94	6

ний перегрев приводит к разложению медного купороса, в результате чего он теряет водоотнимающие свойства. О разложении соли можно судить по появлению бурой окраски.

Вводить обезвоженный медный купорос в спирт удобнее всего в бумажных гильзах из фильтровальной бумаги, которые с обоих концов крепко завязаны. На 1 литр 96%-го спирта необходимо в среднем 200 г безводного купороса. Медный купорос поглощает воду из спирта, постепенно приобретает голубой цвет. Через сутки в спирт погружают новые гильзы. Процедуру повторяют 3–4 раза до тех пор, пока порошок не начнет сохранять свой белый цвет. Полученный спирт хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой, куда опускаются гильзы, заполненные обезвоженным медным купоросом.

С помощью медного купороса можно добиться повышения концентрации спирта только до 98 %. 100%-й спирт можно получить только путем обезвоживания прокаленной негашеной известью.

Следующий этап проводки материала перед парафинированием состоит в замене спирта средою, легко смешивающейся с ним и способной растворять парафин, а также испаряться при расплавлении его. К таким веществам относятся *ксилол, бензол, толуол, хлороформ*. Наиболее часто используется продажный хлороформ, но перед употреблением его необходимо обезвоживать прокаленным медным купоросом.

Во избежание появления нежелательных изменений в фиксируемом материале замена спирта промежуточной жидкостью, а затем и парафином производится тоже плавно, с постепенным повышением концентрации заменяющего вещества. После абсолютного спирта проводка продолжается по следующей схеме:

Смесь I (75 % абсолютного спирта и 25 % хлороформа)	– 1 час 30 мин.
Смесь II (50 % абсолютного спирта и 50 % хлороформа)	– 1 час 30 мин.
Смесь III (25 % абсолютного спирта и 75 % хлороформа)	– 1 час 30 мин.
Чистый хлороформ I	– 1 час 30 мин.
Чистый хлороформ II	– 1 час 30 мин.

В случае необходимости в смеси II и III материал можно оставлять на 24 часа и более. После того как смесь пройдет пять порций материала, смесь I выливается, а смесь II занимает ее место. Смесь III готовится заново.

При перенесении объекта в новую смесь спирта с хлороформом он вначале всплывает на поверхность жидкости, а затем должен опуститься на дно стакана. Если объект не утонул, следовательно, он плохо пропитался хлороформом. Рекомендуется оставлять материал в этом растворе на более длительный срок. В чистом хлороформе материал всегда плавает на поверхности.

Показателем хорошего обезвоживания служит отсутствие помутнения при переносе материала в смесь II, III и чистый хлороформ. Нужно помнить, что при хорошем пропитывании хлороформом объекты становятся прозрачными. Появление у объекта непрозрачных участков свидетельствует о неблагополучии при фиксации или в проводке.

Последний этап работы заключается в полном замещении хлороформа парафином. Процесс основан на испарении хлороформа, вместо которого в ткани входит расплавленный парафин. Необходимо, чтобы испарение происходило не слишком быстро, иначе парафин не успеет войти в ткани, объекты съезжатся и могут вовсе не пропитаться парафином. Это обстоятельство бывает наиболее частой причиной порчи материала.

Парафинирование объекта складывается из ряда последовательных операций.

1. В стеклянные бюксы с хорошо притертыми крышками наливают небольшое количество хлороформа и переносят объекты с этикеткой. Уровень жидкости должен на 2–4 мм быть выше материала.

2. Несколько наклонив бюкс, осторожно по стенке наливают немного расплавленного, но не горячего парафина, который должен покрыть тонким слоем всю поверхность жидкости.

3. После этого бюкс выпрямляют, и как только на парафине возникает пленка, доливают так же осторожно парафин в несколько большем количестве, чем растворитель. Парафин, застывая, образует непосредственно над жидкостью с материалом пробку, препятствующую быстрому испарению растворителя

4. Бюксы плотно закрывают и помещают в термостат при температуре $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ на сутки.

5. Через сутки можно переходить к испарению хлороформа. Сначала слегка приоткрыв крышки, переносят бюксы в термостат с температурой $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$. По мере испарения хлороформа материал пропитывается расплавленным парафином, который можно доливать, если его окажется мало в бюксе.

Полное исчезновение растворителя определяется по отсутствию запаха и вкуса, специфичного для него. Хлороформ придает парафину приторно-сладкий привкус. При задержке испарения следует слить парафин, заменив его чистым. Определение окончания испарения хлороформа производить с максимальной точностью. Как правило, испарение продолжается от 5 до 8 суток. Длительное пребывание материала в термостате нежелательно, преждевременное удаление – тоже, так как делает его непригодным для резки на микротоме. Материал в расплавленном парафине должен быть столь же однороден и прозрачен, как и в чистом хлороформе.

6. При полном удалении растворителя из парафина, а следовательно и из объекта, материал вынимают из термостата и производят заливку. Заливка состоит в том, что расплавленный парафин вместе с объектом и этикеткой переливается в форму, где он застывает. Получающийся кусок парафина, содержащий в себе объекты и этикетку, называют *пряником*. Этикетку приклеивают к верхней поверхности пряника, накладывая ее на только что начавший остывать парафин, когда на нем появится тонкая пленка. Материал в таких пряниках может храниться годами. В качестве формы можно использовать самодельные коробочки из пергаментной бумаги ($3\times 2\times 1$ см) или металлические колпачки.

Успех пропитывания материала парафином в значительной степени обусловлен качеством парафина. Он должен быть однородным,

аморфным, чистым, не содержать летучих примесей и обладать определенной температурой плавления ($+50\text{--}54\text{ }^{\circ}\text{C}$). Высокая точка плавления сопряжена с твердостью, низкая – с мягкостью парафина.

Способ приготовления парафина. Продажный парафин непригоден для непосредственного употребления в работе, так как он не обладает перечисленными свойствами. Для получения парафина высокого качества его варят в течение 5–7 дней в кипящей дистиллированной воде при открытой крышке с добавлением пчелиного воска из расчета до 30 г на 1 кг парафина. Вода ежедневно меняется на свежую. В конце варки парафин фильтруется через горячую фильтровальную воронку с целью очистки его от механических примесей в эмалированную ванночку, стенки которой смазаны глицерином. После застывания парафин нарезается на палочки размером $10\times 1\times 1$ см.

При работе с парафином нужно соблюдать определенные правила: оберегать расплавленный парафин не только от капельно-жидкой воды, но и от паров ее, поэтому во время работы с ним стараться не дышать на него.

Получение микротомных срезов

Эта операция начинается с переноса объекта из парафинового пряника на деревянный блок (кубик) с размерами граней 1,5–2 см. Рекомендуется перед использованием блока прокипятить с парафином. Монтирование объекта на блок для последующей резки на микротоме удобнее всего производить методом закапывания, введенным С. Г. Навашиным. Укрепление объекта выполняется в следующей последовательности:

1. На пламени спиртовки нагревают одну из торцевых сторон деревянного блока и на нее с подогретого конца парафиновой палочки постепенно наносят каплю за каплей парафин, пока не образуется слой парафина в 2–4 мм. Это и называется *подушечка* или *фундамент*.

2. Пряник с материалом расплавляют над спиртовкой в фарфоровой чашечке (не кипятить!) и препаровальной иглой переносят объект в парафин на деревянный кубик.

3. Теплой иглой поправляют расположение объекта, ориентируя его в нужной плоскости, и осторожно начинают заливать парафином с подогретого конца парафиновой палочки. Чтобы капли не скатывались с возвышения, каждую из них следует наносить после появления пленки. Только тогда они могут удержаться на незастывшем ва-

лике парафина, окружающем объект. Капать следует до тех пор, пока объект не будет покрыт достаточным слоем парафина, который будет возвышаться в виде большой полупрозрачной капли.

4. Нагретой иглой провести около объекта, находящегося в капле застывающего парафина. Это поможет смешению наружного парафина с тем, который пропитывает материал, до получения однородной массы. В противном случае при резке объект будет выскакивать из срезов.

5. После затвердения парафина наклеивают на лицевую сторону блока этикетку с порядковым номером фиксации.

6. Теперь заливке нужно придать определенную форму и величину. Для этого удаляют лишний парафин вокруг объекта, пользуясь лезвием безопасной бритвы. Снимать его удобнее начиная со стороны верхушки парафиновой капли до тех пор, пока объект не начнет просматриваться через парафин. Затем обрезают парафин с боковых граней, оставляя с каждой стороны объекта слой 2–3 мм, и придают блоку форму прямоугольной призмы с гранями, строго параллельными друг другу. Только в этом случае при резке на микротоме получится правильная лента срезов.

Общим необходимым условием получения срезов на микротомах любого типа (ротационном и салазочном) является перпендикулярное положение ножа по отношению к объекту и изменение расстояния между ними после каждого среза на заданное число микрон. Для этого деревянный блок вместе с перенесенным на него объектом зажимается специальным устройством в микротомном столике и после установления блока в нужном положении закрепляется неподвижно. Микротомный столик связан микрометрическим винтом таким образом, что передвижение последнего приводит к смещению столика, а следовательно и блока, на строго определенное расстояние.

Срезы получают при следующей последовательности действий:

1. Вставив нож в держатель, отодвинуть салазки вместе с ножом назад и установить подачу микротома на нужное число микрон. С левой стороны разместить настольную лампу для подогревания ножа и блока и коробку, дно которой покрыто черной бумагой. С правой стороны – кисточку, иголку, марлевую салфетку.

2. Зажать блок в микротомном столике так, чтобы длинная сторона объекта приходилась параллельно ножу, установить его на таком

уровне, чтобы верхушка блока почти соприкасалась с ножом, и закрепить неподвижно.

3. Отодвинуть салазки с закрепленным в них ножом назад до упора. Подвинуть салазки с ножом на себя. Встречая на своем пути приподнятый блок, нож срезает парафин с объектом, и срез ложится на его поверхность. Вести нож следует быстро, сохраняя плавность движения и равномерность затрачиваемого усилия, что легко приобретается практикой.

4. Затем салазки снова отодвинуть назад до упора и снова автоматически поднять блок на толщину среза. Перемещая салазки к себе, сделать второй срез и т.д. Каждый новый срез остается на ноже, отодвигает предыдущий и соединяется с ним в ленту. Для получения хорошей ленты движения ножа должны быть достаточно быстрыми и плавными.

5. Ленту, состоящую из 10–30 срезов, нужно осторожно снять с ножа мягкой кисточкой, перенести в коробку с черным дном и уложить в строгой последовательности матовой стороной вверх, т. е. в том же положении, как срезы ложились на нож. В конце ленты обязательно разместить этикетку с номером, приклеенную к блоку во время закапывания объекта. В таких коробках при закрытых крышках ленты могут храниться до нескольких суток, особенно если они будут поставлены в холодильник.

При получении микротомных срезов необходимо соблюдать следующие правила:

1. Нож должен быть остро и правильно отточен (разрезает тонкий волос, если его поднести к лезвию и дунуть на него). Желательно перед началом работы производить правку ножа на ремне.

2. Нож закрепляется в таком положении, чтобы фасетка лезвия была параллельна граням парафинового блока и перпендикулярна направлению движения ножа. Угол наклона ножа определяется предварительно на пробных срезах. При слишком крутом наклоне нож начинает скоблить верхнюю поверхность блока, а при недостаточной величине угла при обратном движении ножа выкрашивается передний край блока.

3. Нож и все части микротома должны содержаться в большой чистоте. Нож протирается с обеих сторон мягкой тряпочкой, в случае необходимости смоченной ксилолом, легким движением вдоль фа-

сетки. Движущиеся части должны быть хорошо смазаны машинным или вазелиновым маслом, защищены от пыли и остатков парафиновых стружек. После каждой резки микротомом тщательно очищается и обязательно закрывается колпаком. Хорошо протертый нож вынимается и хранится в специальном футляре в подвешенном состоянии, не касаясь деревянной стенки лезвием.

Наиболее часто встречающиеся затруднения во время работы на микротоме и способы их устранения представлены в табл. 2.

Для качества парафиновых срезов важное значение имеет толщина срезов. Для анатомических препаратов меристем корня срезы удобнее делать толщиной 7–8 мкм, меристем побегов – 9–10 мкм, зародышей семян 6–7 мкм. Для эмбриологических целей толщина срезов может быть 10–15 мкм.

Наклеивание срезов на предметные стекла

Полученные микротомные срезы перед окраской должны быть наклеены на предметные стекла.

Подготовка предметных стекол. Подготовку предметных стекол начинают с подбора их по толщине. Они тщательно промеряются с помощью микрометра. Для микротомных препаратов применяются лишь стекла толщиной 1–1,2 мм. Затем на одном из концов стекла матируется с помощью ручного или электрического точила участок шириною в 1–1,5 см. В результате на поверхности стекла образуется матовый край, на котором при наклейке срезов делается надпись простым графитовым карандашом. Эти надписи держатся прочно и не смываются ни в одной из жидкостей, через которые проходит далее препарат. Если станок отсутствует, надписи можно делать прямо на стекле с помощью туши, смешанной в равной пропорции с куриным белком и глицерином.

Предметные стекла должны быть абсолютно чистыми и обезжиренными. Для этого их тщательно моют ершиком с мылом в горячей воде. Затем ополаскивают с холодной воде от мыла и помещают в насыщенный водный раствор двуххромовокислого калия с концентрированной серной кислотой (хромпик) в пропорции 3:1 или 4:1. При смешивании серной кислоты с водой в любых пропорциях происходит большое выделение тепла и сжатие объема жидкости. В связи с этим необходимо с большой осторожностью лить в воду серную кис-

Затруднения при работе на микротоме

Характер неудачи	Причина	Способ устранения
Срезы получаются α-дельно или крошатся, нет сплошной ленты	Слишком твердый парафин. В комнате холодно.	Повысить температуру около микротоме. Подогреть блок и нож электрической лампой
Срезы мнутся, морщатся и прилипают к ножу	Слишком мягкий парафин. В комнате высокая температура	Понизить температуру, залить объект в более твердый парафин
Лента искривляется	Отсутствует параллельность переднего и заднего краев блока	Выровнять неправильно обрезанные края парафинового блока. Попробовать другую часть ножа
При обратном ходе ножа срез снимается с его поверхности	Загрязнена нижняя сторона ножа. Нож поставлен слишком круто. Нож тупой	Протереть ксилолом нижнюю сторону ножа. Уменьшить угол его наклона. Наточить нож
Срезы ломаются, растрескиваясь в направлении, параллельном фасетке	Нож поставлен слишком круто	Уменьшить угол наклона ножа
Продольные царапины на ленте. Разрыв ленты	Нож имеет зазубрины. В блоке твердые пылинки	Передвинуть нож. Перезакапать объект
Нож скачет через объект и при обратном ходе выкрашивает переднюю грань блока	Нож поставлен слишком полого	Увеличить угол наклона ножа
Объект выпадает из срезов или из блока	Плохое парафинирование или заливка	Провести парафинирование или заливку снова
Пропуски в получении срезов. Срезы имеют различную толщину	Тупой нож для данной толщины среза	Наточить или заменить нож. Увеличить толщину срезов
Срезы получаются гфрированными (волнистыми)	Плохая заливка. Тупой нож	Перекапать объект. Наточить нож

лоту. В хромовой смеси стекла могут находиться неопределенно долгое время, но не менее одних суток.

Проверка чистоты стекол заключается в нанесении на них нескольких капель воды. Если вода хорошо растекается по стеклу, то оно

чистое, а если собирается каплями, значит на стекле имеются следы жира. На таких стеклах срезы не держатся и очень быстро отклеиваются. Чистые стекла берутся только пинцетом.

Для наклеивания срезов можно использовать и старые стекла, бывшие в употреблении, даже покрытые бальзамом. Для этого их нужно прокипятить в растворе любой моющей пасты 30–40 мин., ополоснуть под краном с помощью ершика, прокипятить еще раз и обезжирить в хромпике.

На хорошо промытые и абсолютно чистые предметные стекла можно наклеивать парафиновые срезы без белка или других приклеивающих веществ. Если нет уверенности в чистоте стекол, то срезы приклеиваются с помощью белка, который готовится следующим образом.

Приготовление белка. Куриный белок соединяют с равным по объему количеством глицерина и, хорошо взболтав, фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Фильтрация идет очень медленно в течение нескольких суток, поэтому воронка должна быть сверху обязательно прикрыта. В смесь белка с глицерином и сосуд, куда она фильтруется, добавляют кристаллик *фенола* или *тимола* (любого антисептика). Отфильтрованный белок готов к употреблению. Его разливают в пенициллиновые пузырьки. В пробку каждого из них вставлена стеклянная палочка, касающаяся нижним концом налитой жидкости.

Наклеивать срезы на предметное стекло удобнее всего в следующей последовательности:

1. Вынуть из хромпика предметные стекла, хорошо промыть в проточной воде и перенести их в стакан с дистиллированной водой.

2. Пинцетом достать предметное стекло, протереть с нижней стороны фильтровальной бумагой, положить на черный трафарет матированной стороной вверх. Слегка коснувшись его поверхности концом стеклянной палочки два раза, нанести белок, а из капельницы несколько капель дистиллированной воды так, чтобы она равномерно покрыла всю поверхность предметного стекла.

3. На матированном конце стекла простым карандашом аккуратно сделать надпись. Она пишется в виде дроби, у которой числитель показывает порядковый номер стекла, а знаменатель – номер фиксации. На оставшемся месте записывают толщину среза и координаты срединного среза (позднее).

4. Препаровальными иглами, а еще лучше кисточкой, смоченной водой, перенести на предметное стекло участки парафиновой ленты, осторожно опуская их на воду, на поверхности которой они удерживаются. Срезы располагаются блестящей стороной вниз, сохраняя пространственную ориентацию, возникающую при получении их. На одно предметное стекло можно положить столько срезов, сколько уместится на площади, занимаемой одним или двумя покровными стеклами.

5. На стекле срезы уложить в строгой последовательности друг за другом, располагая их рядами. Чаще всего начало препарата находится в верхнем углу – это значит, что туда кладут первый срез, а вниз укладывают следующие за ним. Так создается первый ряд, длина которого должна быть несколько меньше, чем длина покровного стекла. Сосчитав число срезов в ряду, на такие же участки скальпелем разделить парафиновую ленту, чтобы переносить на стекло сразу целые ряды срезов и укладывать их один за другим перпендикулярно длинной стороне предметного стекла.

6. Срезы, полученные на микротоме, почти всегда бывают несколько сжаты и сморщены. Для получения качественных препаратов необходимо их расправить. Для этого, уложив срезы, надо очень осторожно подогреть стекло над спиртовкой, чтобы вода, нагреваясь, увеличилась в объеме и растянула их. Температура воды должна быть несколько ниже точки плавления парафина, размягчая его, но не расплавляя, иначе можно испортить материал.

7. Как только срезы достаточно расправятся и вода остынет, несколько наклонив стекло, слить с его угла избыточную воду. Осторожно иглой поправить расположение срезов, аккуратно и плотно уложив их друг около друга. Срезы должны быть параллельны друг другу в продольном и поперечном направлениях, тогда их легче будет просматривать под микроскопом.

8. Промокнуть срезы фильтровальной бумагой, прижимая ее к стеклу подушечками пальцев, и по возможности быстрее перенести стекла на специальном трафарете в термостат с температурой 37–40 °С. Если вода испаряется при комнатной температуре, когда парафин находится в затвердевшем состоянии, то после удаления воды между ним и стеклом возникают щели и срезы могут отклеиваться во время покраски. При испарении воды в термостате размягченный парафин заполнит образовавшиеся пустоты и срезы прочно приклеятся к стеклу. Сушка длится 5–7 дней.

После высыхания срезы должны иметь совершенно равномерную прозрачность на просвет (не принимаются во внимание различия, зависящие от присутствия объекта). В отраженном свете с задней (стеклянной) стороны срезы не должны иметь светлого зеркального блеска. Блеск указывает на присутствие воздуха между срезами и стеклом. В последующих операциях они будут отклеиваться. Исправить дело можно, погрузив стекло с наклеенными срезами в разведенный спирт (40–50°) на 2–3 минуты и вторично высушив в термостате при температуре 40 °С. Предметные стекла с наклеенными срезами могут в случае необходимости сохраняться неограниченно долго в защищенном от пыли месте.

Окраска препаратов

Общие сведения о красителях. Большинство применяемых в анатомической и эмбриологической методиках красителей представляет собой сложные органические соединения солеобразного характера. Если в таких красителях красящим является основание, то они называются *основными*, если остаток кислоты – то *кислыми*. К основным красителям относятся сафранин, генциановый фиолетовый, малахитовый зеленый, фуксин основной, метиловый зеленый, метиленовый синий и др. К кислым красителям относятся конго красный, водный синий, фуксин кислый, светлый зеленый, эозин, пикриновая кислота и др.

Красители обычно употребляются в виде водных или спиртовых растворов. Водные растворы готовят чаще всего в концентрации 1–2 %. Спиртовые растворы готовят на 50–70 %-м спирте. Красители растворяют в той же концентрации.

В зависимости от объекта и красителя окрашивание делят на два основных вида: *прогрессивный* и *регрессивный*. В первом случае срез помещают в слабый раствор красителя и окрашивают довольно продолжительное время. Вначале краска бывает слабой, но со временем она усиливается, прогрессирует. Время от времени срез просматривают под микроскопом, чтобы не допустить переокрашивания. Так окрашивают срезы гематоксилином по Делафильду, по Майеру и др.

Наиболее распространенной является окраска срезов регрессивным методом. В этом случае препарат заведомо переокрашивают в концентрированном красителе, а затем удаляют избыток красителя путем отмывания его соответствующим растворителем. Этот процесс

называют *дифференциацией*. В качестве дифференцирующей жидкости используют спирт или водный раствор квасцов. Дифференцировку ведут под микроскопом, следя за тем, чтобы ослабление окраски дошло до желаемой степени и не привело к полной раскраске (обесцвечиванию) препарата. К таким регрессивным окраскам относятся окрашивание гематоксилином по Гейденгайну, основным фуксином, генциановым фиолетовым по Ньютону и др.

Очень часто в ботанической микротехнике употребляют так называемую *комбинированную* окраску. Красят данный препарат не одним, а несколькими красителями, подбирая их так, чтобы каждый из них окрашивал определенную ткань или ту или иную часть содержимого клетки. При комбинированной окраске желательно брать контрастные красители и считаться с возможностью вымывания одного красителя другим.

Окрашивание. Процесс окрашивания микротомных препаратов, независимо от способа окраски, состоит из трех последовательных операций:

1. Освобождение срезов от парафина и доведение препаратов до воды через промежуточную среду.
2. Само окрашивание с протравливанием и дифференцировкой в случае необходимости.
3. Обезвоживание и заключение в канадский бальзам.

Вся проводка стекол по средам и сама окраска проводится в склянках с притертыми крышками (высота 8–10 и диаметр 4–6 см). При их отсутствии можно пользоваться майонезными банками с полиэтиленовыми крышками. В них наливают растворы, необходимые для удаления парафина, обезвоживания и окраски. Уровень жидкости должен соответствовать уровню срезов на препаратах, стоящих в склянке, полностью закрывая их. При покраске кроме растворов, налитых в цилиндры, необходимо иметь эти же жидкости в капельницах – для предварительного смывания стекол перед опусканием в склянку. Склянки ставят строго в том порядке, в каком пойдет проводка и окраска стекол, помечая их соответствующими надписями.

Замена на препарате одной среды на другую происходит при переносе их из одной склянки с другую. При этом нужно выполнять следующие условия:

1. Стекла опускать в склянку с жидкостью надписью вверх, стараясь ее не замочить.

2. Препараты ставить таким образом, чтобы срезы находились на стороне, обращенной к стенке склянки. Если препаратов много, то, соединив их сторонами без срезов в пары, также располагают их по стенкам склянки. Пары стекол можно поставить и друг около друга, надев сверху стеклянные скобки (хомутики) для предотвращения соприкосновения поверхностей, имеющих срезы. Скобки можно заменить спичками с обломанными головками или канцелярскими скрепками.

3. При переносе из одной среды в другую со стекла самым тщательным образом нужно удалить остатки прежней среды. Для этого обратную сторону стекла хорошо протереть фильтровальной бумагой. Затем поверхность стекла со срезами смыть несколько раз из капельницы тем раствором, в который препарат переводится, а свободную от срезов поверхность осторожно промокнуть.

Все время следует следить за тем, чтобы срезы не подсохли, что сразу заметно по их побелению, и тогда их необходимо немедленно смочить из капельницы.

4. Стекла переносить только пинцетом с того конца, где имеется надпись.

Препараты с микротомными срезами следует начинать окрашивать только после того, как они хорошо подсохнут. Освобождение от парафина, как и противоположный процесс (пропитывание им), происходит постепенно, с использованием промежуточных сред. В качестве растворителя служат хлороформ, ксилол и бензол. Удобнее всего применять первый из них. Промежуточной средой является спирт разных концентраций.

Для предотвращения излишнего загрязнения реактивов проводки на препарат предварительно наносится из капельницы хлороформ, который начинает растворять парафин. Для ускорения растворения часто применяется легкий подогрев препаратов над пламенем спиртовки, но только до окапывания. Через несколько минут хлороформ сливают, препарат смывают несколько раз из капельницы и опускают стекло в хлороформ I, после чего, аккуратно соблюдая правила, проводку производят по схеме:

Хлороформ I	– лучше оставить на ночь;
Хлороформ II	– 10 минут;
Спирт 96 %-й I	– 5-10 минут;
Спирт 96 %-й II	– 5-10 минут;
Дистиллированная вода (две смены)	– по 5 минут.

Наиболее универсальным, широко распространенным в ботанической микротехнике, дающим хорошие результаты, особенно при изучении меристем побегов и корней, является способ окрашивания гематоксилином по Гейденгайну.

Окрашивание гематоксилином по Гейденгайну. Этот процесс удобнее вести по следующей схеме:

1. Препарат довести до дистиллированной воды вышеописанным способом.

2. Железоаммонийные квасцы 4%-е – 4–6 часов.

Растворы железоаммонийных квасцов, используемые для протравы, а в дальнейшем для дифференцировки, приготавливаются незадолго перед покраской, поскольку они долго не хранятся.

3. Вода дистиллированная I, II – ополоснуть.

4. Гематоксилин – 8–12 часов (можно на ночь).

5. Вода дистиллированная I, II – ополоснуть.

6. Дифференцировка в 2%-х железоаммонийных квасцах с контролем под микроскопом.

Наблюдения за ходом дифференцировки ведутся непрерывно, и просмотром должно быть охвачено большинство срезов. Срезы быстро отдают краску, и в клетке начинают постепенно проявляться отдельные структуры. Ориентируясь на четкую видимость ядрышек, в момент начала их раскраски прекращают дифференцировку. Для приостановки дифференцировки срезы ополаскивают дистиллированной водой.

7. Вода проточная водопроводная – 1 час.

8. Вода дистиллированная I, II – ополоснуть.

Все последующие этапы направлены на обезвоживание срезов перед заключением их в бальзам. Процесс непрерывный и общий, независимо от типа красителя.

9. Спирт 96%-й III – 10–15 минут.

10. Спирт 96%-й IV – 10–15 минут.

11. Бутиловый спирт I – 10–15 минут.

12. Бутиловый спирт II – 10–15 минут.

13. Ксилол I – 10–15 минут.

14. Ксилол II – 10–15 минут (лучше на ночь).

15. Заключение в канадский бальзам.

Интенсивность окраски гематоксилином по Гейденгайну в большой степени зависит от качества фиксации и качества применяемых

материалов. Этот краситель лучше применять при фиксации материала в растворе Навашина. Однако даже незначительное увеличение количества формалина в фиксаторе приводит к тому, что при дифференциации в квасцах цитоплазма трудно отдает гематоксилин и слабо раскрашивается. Только строгое соблюдение всех правил последовательных операций при получении микротомных препаратов приводит к хорошим результатам. Срезы получают окрашенными в контрастные оттенки синего цвета. Наиболее интенсивно окрашивается ядрышко (оно почти черное), менее интенсивно – ядро, еще слабее – цитоплазма, а оболочка остается бесцветной. При такой дифференцированной окраске нетрудно получить с препарата микрофотографии хорошего качества, пользуясь желтым или синим светофильтром.

Приготовление гематоксилина. Гематоксилин ($C_{16}H_{14}O_6$) получают в виде кристаллического порошка из экстракта древесины кампешового дерева. Красящим началом служит не само вещество, а продукт его окисления – гематеин ($C_{16}H_{12}O_6$), получающийся после отдачи двух атомов водорода. Гематоксилин нужно употреблять самого лучшего качества. Существует несколько способов изготовления этого красителя.

Раствор гематоксилина по Гейденгайну приготавливают с обязательным использованием для разбавления дистиллированной воды. К 1 г гематоксилина прибавляют 10 мл 96%-го спирта и 90 мл воды и оставляют созревать при доступе воздуха на свету в течение 2–4 недель, сохраняя от пыли ватным тампоном. Перед употреблением разбавляют равным количеством воды, добавляя антисептик. Краситель годен для работы в течение длительного промежутка времени.

При ускоренном способе приготовления 1 г гематоксилина растворяют в 100 мл воды, нагревая на водяной бане в течение 30–60 мин. Полученный раствор хорошо фильтруют и после остывания добавляют кристаллик тимола. Перед употреблением к нему также прибавляется равное количество воды.

Правильно приготовленный раствор должен иметь красный или красно-бурый цвет. Проверка пригодности гематоксилина для окраски производится добавлением в стакан с водопроводной водой нескольких капель раствора. Если вода станет аметистово-лиловой, то гематоксилин пригоден, а если приобретает желтый или буровато-лиловый цвет или появляется черная муть, то раствором пользоваться нельзя, его возвращают на дозревание. При появлении в растворе

гематоксилина мути или хлопьев рекомендуется его профильтровать. Фильтрацию повторяют регулярно после нескольких раз его употребления.

Гематоксилин по Майеру. В 500 мл воды растворяют 0,5 г гематоксилина. К раствору добавляют 0,1 г йодноватокислого натрия ($NaJO_3$) (только не аптекарского йодистого натрия) и 25 г калийных квасцов. Встряхивают смесь, пока не растворятся квасцы, затем добавляют 25 г хлоралгидрата и 0,5 г лимонной кислоты – для лучшей сохранности его. Раствором можно пользоваться через несколько часов после приготовления. Сохранность его очень велика. Краситель прогрессивный. Длительность окраски 5–7 минут. Препараты окрашиваются в приятный лилово-фиолетовый цвет.

Генциановый фиолетовый. Генциановый фиолетовый, или генциан-виолет, окрашивает очень хорошо в фиолетовый цвет одревесневшие оболочки, ядра и хромосомы. Чаще употребляется водный раствор. Для его приготовления 1 г красителя растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор сразу готов к употреблению. Генциан-виолет часто применяется вместе с подкраской плазменными красителями: 1%-м спиртовым раствором *эозина* или насыщенным раствором *оранжа* в гвоздичном масле. Необходимый при окраске раствор йода в йодистом калии готовится соединением 1 части йода с 1 частью йодистого калия и 100 частями 80%-го спирта. Окраска идет обычным способом. Препарат, доведенный до воды, помещают в раствор генцианового фиолетового на 5–15 минут. После споласкивания в дистиллированной воде переносят в раствор йода в йодистом калии на 30–40 сек. Обезвоживание и заключение в бальзам проводят по общепринятой схеме.

Сафранин. Окрашивает в красный цвет одревесневшие оболочки, хромосомы, ядрышки. Употребляется 1%-й водный или 0,5%-й раствор в 50-градусном спирте. Особенно прочный краситель получается по *способу Кармуса*: 2 г красителя растворить в 100 мл воды, добавить 0,25 г поташа и 1/3 хлороформа от всего количества. Раствор хорошо взболтать и дать постоять сутки. Окраска сафранином продолжается от 5–10 минут до 1 часа. Хорошо комбинируется с водным синим или светлым зеленым.

Основной фуксин по Фельгену. Окраска по Фельгену считается одной из лучших для ядерного вещества. Процесс приготовления красящего раствора удобнее проводить в следующем порядке:

1. 1 г чистого основного фуксина (парафуксина) тщательно растереть в фарфоровой ступке и растворить в 200 мл кипящей воды.

2. Горячий раствор несколько раз взболтать и профильтровать через фильтр в склянку с притертой пробкой.

3. Остудить жидкость до 50°, прибавить 20 мл 1N HCl и, продолжая охлаждать до 25°, добавить 1 г бисульфита натрия (NaHSO₃).

4. Получившийся раствор густо-вишневого цвета должен через сутки-двое обесцветиться и приобрести светло-желтый цвет. Если раствор не обесцветился, он не пригоден для окраски. Иногда обесцвечивание получается только после дополнительного прибавления небольшого количества бисульфита натрия, который высыпают в раствор на вторые сутки.

5. Полученный реактив, часто обозначаемый как *реактив Шиффа*, может храниться долгое время, но в темноте, для чего склянку тщательно заворачивают в светонепроницаемую бумагу. Раствор должен быть бесцветным или слабо желтым.

Перед проведением окраски кроме реактива Шиффа готовят одно-нормальный раствор HCl и *сернистую воду* по следующему рецепту:

1. К 200 мл дистиллированной воды прилить 4 мл концентрированной соляной кислоты (удельный вес 1,19).

2. В 25 мл дистиллированной воды растворить 4 г безводного или 8 г кристаллического бисульфита натрия.

3. Соединить оба раствора и хранить в темноте. Сернистую воду готовят незадолго до окраски. Она годна до тех пор, пока сильно пахнет сернистым газом. Лучше каждый раз перед употреблением готовить свежий раствор.

1N раствор соляной кислоты готовится либо путем титрования с нормальным раствором щелочи, либо (что проще, но не столь точно) путем добавления 82,8 мл крепкой соляной кислоты удельного веса 1,19 к 1 л воды.

Следует помнить, что реакция Фельгена действительна только при гидролизованном материале, и применять ее без гидролиза нельзя.

Окраска реактивом Фельгена – Шиффа проводится по следующей схеме:

1. Препараты обычным способом довести до воды и опустить на 2–3 минуты в холодную 1N HCl.

2. Провести гидролиз в 1N HCl при температуре 50–60° в течение 6 минут. Для этого в химическом стакане заранее подогревают на

водяной бане соляную кислоту с таким расчетом, чтобы в момент погружения препаратов ее температура была 61–63°, которая сразу снизится до 58–60°. Гидролиз должен проходить при оптимальных условиях. Между препаратами обязательно ставится термометр, по которому все время следят за температурой, поддерживая ее на нужном уровне, снимая стакан с бани и вновь ставя на нее.

3. По истечении срока гидролиза препараты быстро опускают в холодную 1N HCl, после чего хорошо ополаскивают дистиллированной водой. В холодной соляной кислоте гидролиз сразу прекращается.

4. Поместить в реактив Шиффа на 3 часа.

5. Тщательно промыть в трех сменах сернистой воды по 5 минут в каждой.

6. Промыть водопроводной водой в течение 5–10 минут.

7. Промыть в двух сменах дистиллированной воды по 3–5 минут в каждой.

8. Обезвоживание, проводку через ксилол, заключение в бальзам проводить обычным способом.

Реактив Шиффа окрашивает в клетках обычно только ядра и хромосомы, поэтому очень хорошие результаты дает подкраска цитоплазмы светлым зеленым (*лихтгрюн*) или *эозином*. Подкрашивание производят 1%-м спиртовым раствором лихтгрюна после 96%-го IV спирта (перед погружением препаратов в бутиловый спирт) в течение 1–2 минут.

Заключение срезов в бальзам

Канадский бальзам, применяемый для заключения срезов и превращения их в постоянные препараты, получают из кедровой или пихтовой смолы, которую растворяют в ксилоле до густоты меда.

Готовый бальзам наливают в пенициллиновый пузырек, закрытый корковой пробкой, через которую пропущена стеклянная палочка.

Заключение срезов в бальзам производится следующим образом:

1. Вынув из ксилола препарат, сторону стекла, имеющую срезы, ополоснуть ксилолом, а противоположную протереть фильтровальной бумагой. Быстро определить, с какой стороны находятся срезы, поможет надпись, расположенная на одной поверхности с ними.

2. Положив препарат на чистую фильтровальную бумагу, нанести на срезы 1–2 капли канадского бальзама.

3. Взяв пинцетом чистое покровное стекло, поставить его наклонно вдоль срезов, поддерживая верхний край препаровальной иглой. Скользя по игле, стекло постепенно опускается на объекты, и канадский бальзам занимает все пространство между ним и покровным стеклом. Покровное стекло нужно размещать обязательно выпуклой стороной вверх. В этом случае при наведении стекла на электрическую лампочку четко просматривается ее спираль.

4. Слегка нажимая пинцетом или концом деревянной ручки препаровальной иглы, удалить лишний бальзам и пузырьки воздуха, если они появятся.

5. В горизонтальном положении на фанерных или картонных трафаретах поставить препараты сушиться. Обычно их сушат в термостате при температуре 37–40°. Сохнут они медленно, и только через 2–4 дня их можно просматривать.

6. Просохшие препараты очистить от выступившего из-под стекол лишнего бальзама с помощью ксилола, после проверки надписи их можно считать пригодными к просмотру.

Подготовка покровных стекол. Покровные стекла нужной толщины, не превышающей 0,16–0,18 мм, отбираются с помощью микрометра. Более толстые стекла препятствуют наведению на фокус, что особенно сказывается при фотографировании препаратов. Среди отобранных стекол выбраковывают стекла, имеющие царапины, пузырьки и особенно кривизну поверхности, так как они вызывают вхождение пузырьков воздуха под покровное стекло и даже отставание его края или краев. Разложив стекла в один слой в чашки Петри, моют их в проточной воде при помощи мыла и ершика. Затем переносят в 70%-й спирт. Стекла насухо протирают марлей или мягкой тряпочкой и хранят в чистых бюксах с крышками. Брать чистые покровные стекла следует только пинцетом.

Итак, препарат готов. Смонтированный препарат заносится под очередным номером в каталог, в котором отмечается способ окраски, номер по журналу фиксации, стоящий на препарате.

Изложенная методика довольно сложная, трудоемкая, требует затраты большого количества времени, но в конечном результате вполне себя оправдывает. Полученные препараты могут храниться неограниченно долгое время и по мере надобности использоваться для изучения.

В заключение необходимо указать, что при работе с ксилолом, парафином, хлороформом и бутиловым спиртом следует соблюдать известную осторожность, так как вдыхание паров этих веществ далеко не безвредно для организма. Прежде всего необходимо устранить всякую возможность ненужного испарения этих веществ. Хранить эти растворы необходимо в склянках с хорошо притертыми пробками и работать только при включенной тяге.

Список необходимых материалов, инструментов, посуды и реактивов

Фиксация материала

1. Пенициллиновые пузырьки.
2. Пробки корковые разных размеров.
3. Медицинский шприц типа «Рекорд».
4. Иглы.
5. Пинцеты.
6. Скальпели.
7. Бритвы безопасные.
8. Препаровальные стекла.
9. Нарезанные этикетки размером 1×1 см.
10. Хромовый ангидрид.
11. Формалин продажный.
12. Ледяная уксусная кислота.
13. Спирт 96 %-й.
14. Хлороформ.
15. Вода дистиллированная.
16. Слянки для фиксирующих смесей.
17. Мерные цилиндры.
18. Бюретки.
19. Фильтровальная бумага.
20. Марлевые салфетки.
21. Весы с разновесами.
22. Линейка.
23. Ножницы.

Промывка фиксированного материала

1. Пинцеты.
2. Препаровальные иглы.

3. Стеклянные трубочки.
4. Марлевые салфетки.
5. Нитки.
6. Химический стакан с носиком.
7. Воронка.
8. Спирт 96%-й.
9. Дистиллированная вода.

Обезвоживание материала и заключение его в парафин

1. Склянки для спиртов разной концентрации с корковыми пробками на 100–200 мм (18 шт.).
2. Карандаш по стеклу.
3. Воронка, обтянутая капроновой салфеткой.
4. Пенициллиновые пузырьки.
5. Мерный цилиндр.
6. Хлороформ.
7. Абсолютный спирт.
8. Спирт 96%-й.
9. Дистиллированная вода.
10. Медный купорос.
11. Электрическая плитка.
12. Стеклянная палочка.
13. Фарфоровая чашка с ручкой.
14. Фильтровальная бумага.
15. Нитки.
16. Стеклянные бюксы с крышками.
17. Воск пчелиный.
18. Парафиновые палочки.
19. Глицерин.
20. Термостат.
21. Пинцеты.
22. Иголки.
23. Скальпели.
24. Металлические колпачки.
25. Ведро эмалированное.
26. Воронка горячего фильтрования.
27. Эмалированный поднос.
28. Ножницы.

Получение микротомных срезов

1. Деревянные блоки.
2. Парафиновые палочки.
3. Металлические колпачки.
4. Перпаровальные иглы.
5. Препаровальные стекла.
6. Бумажные этикетки.
7. Спиртовки.
8. Фильтровальная бумага.
9. Спички.
10. Пинцеты.
11. Скальпели.
12. Безопасные бритвы.
13. Микротом.
14. Микротомный нож.
15. Кисточки.
16. Коробки с черным дном.
17. Вазелиновое масло.
18. Капельница с ксилолом.
19. Фланелевая салфетка.
20. Марлевая салфетка.
21. Настольная лампа.
22. Ножницы.
23. Ремень для правки ножа.
24. Брусок для точки ножа.

Наклейка срезов на предметные стекла

1. Предметные стекла.
2. Станок для матировки стекол.
3. Склянка для хромпика.
4. Пенициллиновый пузырек с корковой пробкой и глазной палочкой.
5. Ершик.
6. Мыло.
7. Скальпели.
8. Пинцеты.
9. Препаровальные иглы.
10. Кисточки.

11. Серная кислота концентрированная.
12. Двухромовокислый калий.
13. Тимол или фенол.
14. Глицерин.
15. Куриный белок.
16. Химические стаканы.
17. Воронка.
18. Фильтровальная бумага.
19. Стекланный колпак.
20. Капельница с дистиллированной водой.
21. Спиртовка.
22. Спички.
23. Черный трафарет.
24. Термостат.
25. Ножницы.
26. Картонный трафарет для предметных стекол.

Окраска препаратов

1. Склянки с притертыми крышками для окрашивания.
2. Карандаш по стеклу.
3. Пинцеты.
4. Препаровальные иглы.
5. Фильтровальная бумага.
6. Ножницы.
7. Химические стаканчики на 100–200 мл.
8. Химический стакан с плоским дном на 1–2 л.
9. Фенол.
10. Хлороформ.
11. Спирт 96%-й.
12. Вода дистиллированная.
13. Бутиловый спирт.
14. Метаксиллол.
15. Лихтгрюн (порошок).
16. Гематоксилин (порошок).
17. Основной фуксин.
18. Весы с разновесами.
19. Железоаммонийные квасцы.
20. Микроскоп.

21. Водяная баня.
22. Воронка.
23. Бисульфит натрия.
24. Термометр.
25. Соляная кислота концентрированная.
27. Водный синий.

Заключение препаратов бальзам

1. Метаксиллол.
2. Кедровый или пихтовый бальзам.
3. Пенициллиновый пузырек с пробкой и глазной палочкой.
4. Спирт 96%-й.
5. Пинцеты.
6. Препаровальные иглы.
7. Трафарет из черной бумаги.
8. Фильтровальная бумага.
9. Ножницы.
10. Покровные стекла.
11. Микрометр.
12. Бюксы стеклянные с крышками.
13. Простой карандаш.
14. Настольная лампа.
15. Марлевые салфетки.
16. Коробки с ячейками для хранения препаратов.
17. Термостат.
18. Чашки Петри.
19. Ершик.

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для первоначального, ориентировочного знакомства с фиксированным материалом или для наблюдений над живым объектом нет необходимости готовить сложным путем постоянные препараты, а можно ограничиться препаратами *временными*, не рассчитанными на продолжительное хранение. Они дают достаточно достоверные данные, а их приготовление требует меньших затрат труда и времени, чем изготовление микротомных препаратов. Временные препараты широко используют в эмбриологических исследованиях

при изучении кариотипов растений, клеточных делений, особенностей прорастания пыльцы на рыльце пестика, вопросов споро- и гаметогенеза и других цитоэмбриологических процессов.

Среди способов приготовления временных препаратов наиболее распространен *ацетокарминовый метод*, согласно которому объекты подвергаются воздействию насыщенного раствора *кармина* в 45%-й уксусной кислоте. Особенность влияния такой смеси состоит в том, что она одновременно производит фиксацию и окраску. Фиксация осуществляется уксусной кислотой, а окраска – кармином. Он окрашивает ядра и хромосомы в темно-красный цвет, а цитоплазму – в светло-розовый.

Приготовление ацетокармина

1. В колбу с 55 мл дистиллированной воды добавляют 45 мл ледяной уксусной кислоты и 5 г кармина в виде ярко-красного порошка.

2. Закрыв колбу ватной пробкой, кипятят смесь на водяной бане в течение 1 часа, не допуская выбрасывания кипящей жидкости из колбы.

3. Смеси дают остыть и фильтруют в склянку с притертой пробкой. Получившийся раствор должен быть густого темно-красного цвета. Он сохраняет свою пригодность в течение длительного времени при хранении в прохладном темном месте. Для работы смесь отливают в небольшую капельницу.

Известны различные способы приготовления ацетокарминовых препаратов, при которых объекты или сразу подвергаются воздействию смеси, или предварительно фиксируются.

Окраска без предварительной фиксации. Этим способом пользуются при изучении процессов микро- и спорогенеза. В этом случае пыльники погружают в каплю ацетокармина на предметное стекло и выдавливают их содержимое. Выдавлившаяся спорогенная ткань или пыльцевые зерна, попав непосредственно в раствор, быстро фиксируются и начинают окрашиваться. Раздавить пыльники можно стеклянной палочкой или деревянным концом препаровальной иглы. Давление, производимое на пыльники, должно быть таким, чтобы выдавливалось их содержимое, но клетки не повреждались. После того как пыльники раздавлены, нужно удалить наиболее крупные части стенок пыльника, а каплю реактива с объектами осторожно закрыть покровным стеклом.

Очень часто применяется другой способ приготовления препарата, при котором сначала раствор с объектами закрывают покровным

стеклом, а затем надавливают на него до тех пор, пока не раздавятся пыльники. Окрашивание объектов усиливается при повышении температуры, поэтому препараты рекомендуется несколько раз подогреть, но не доводить до кипения. При излишнем перегреве начинается уменьшение интенсивности окраски.

Окраска после предварительной фиксации. Далеко не всегда бывает возможно сразу приготовить временные препараты. Часто приходится сначала зафиксировать материал и только через значительный промежуток времени приступить к приготовлению временных ацетокарминовых препаратов. В качестве фиксатора чаще всего употребляются растворы Карнуа или Чемберлена. Материал после истечения срока пребывания в фиксаторе отмывается 70%-м спиртом и хранится в нем.

Перед окрашиванием пыльник, вынув из спирта, погружают в каплю ацетокармина на предметное стекло, где из него выдавливают содержимое по одному из вышеописанных способов и готовят препарат так же, как и из нефиксированного материала. Следует только обязательно подогреть его 3–5 раз на пламени спиртовки, и препарат готов для микроскопического изучения.

Окрашивание ацетокармином фиксированного материала применяется также для подсчета числа хромосом, митотической активности клеток, нарушений, происходящих во время деления соматических клеток и определения жизнеспособности пыльцы. У фертильных пыльцевых зерен цитоплазма и спермии окрашиваются в карминово-красный цвет. Стерильные пыльцевые зерна не окрашиваются или окрашиваются неравномерно, содержимое отходит от оболочки, спермиев нет. Подсчитывают процент фертильных пыльцевых зерен от общего числа пыльцевых зерен в 10–20 полях зрения микроскопа.

Определение фертильности пыльцы иодным методом. В пыльцевых зернах некоторых видов злаков накапливается крахмал. Содержание крахмала в стерильной пыльце никогда не достигает нормы. Степень окрашивания пыльцы растворами, содержащими йод, может служить способом идентификации стерильной пыльцы. В качестве материала можно использовать свежие и фиксированные пыльники. В каплю раствора, содержащего йод (в 100 мл воды растворяют 3 г йодистого калия, затем 0,2 г кристаллического йода), помещают пыльник, из которого иглой извлекают пыльцевые зерна. Фертильные пыльцевые зерна окрашиваются в густой синева-фиолетовый

цвет, стерильные пыльцевые зерна окрашиваются значительно слабее, имеют бурую окраску или бесцветны.

Перевод временных препаратов в постоянные. Часто временные давленные препараты бывают настолько хорошими, что их следует оставить на более длительный срок. Имеется несколько способов сохранения временных препаратов и перевода их в постоянные. Самым простым будет нанесение расплавленного парафина по краям покровного стекла, который, заполняя просвет между ним и предметным стеклом, значительно снизит испарение жидкости, окружающей объект. Такие препараты сохраняются в течение нескольких недель, а иногда и месяцев.

Значительно удлиняется срок хранения временных препаратов при погружении объектов в глицерин, который замещает среду, окружавшую их раньше. Замена среды осуществляется таким путем: у одного из краев покровного стекла фильтровальной бумагой оттягивают жидкость, имевшуюся в препарате, в это самое время на противоположном конце наносится новая среда, которая легко проникает под стекло и способствует вытеснению прежней. Испарение глицерина настолько невелико, что в нем объекты могут сохраняться годами, особенно при окантовке стекла парафином.

Можно перевести временные препараты в полупостоянные и другим способом: стараясь не сдвинуть с места объект, осторожно снимают покровное стекло, препарат обезвоживают 96%-м спиртом, затем бутиловым спиртом, проводят через ксилол и заключают в канадский бальзам. Самым сложным моментом является отделение покровного стекла без нарушения структуры клеток, что требует большого навыка.

МЕТОДИКИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспресс-методы приготовления тотальных препаратов зародышевых мешков

Наряду с микротомным методом приготовления препаратов для исследования женского гаметофита растений, в последнее время часто используются ускоренные методы, такие как препарирование семяпочек с мацерацией и без мацерации тканей. Преимущества этих

методов состоят в ускорении процесса приготовления препаратов и в улучшении их качества – сохраняется целостность изучаемого объекта. При использовании целых зародышевых мешков появляется возможность изучить их истинную форму, взаимное расположение элементов, динамику изменения их взаимного расположения в процессе роста и развития.

Методики, включающие мацерацию тканей семяпочки, основаны на разрушении оболочек клеток тканей семяпочек комплексом ферментов пищеварительных желез виноградной улитки, условно называемым «цитазой», химически чистыми целлюлазой, пектиназой, а также на других способах. Мацерация тканей применяется в исследовании видов как с мелкими, так и с крупными семяпочками. Если изучаются завязи, содержащие большое количество сравнительно мелких семяпочек (сем. Solanaceae, Papaveraceae), то целесообразно мацерировать ткани семяпочек и приготавливать суспензию, состоящую из соматических клеток семяпочек и зародышевых мешков. Из суспензии выделяется с помощью центрифугирования наиболее тяжелая ее фракция, содержащая зародышевые мешки. Этот метод разработан на кафедре генетики и цитологии Саратовского государственного университета (Хохлов, Зайцева, Куприянов, 1978). По методике, предложенной М. П. Солнцевой и В. П. Левковским (1978), после ферментативной мацерации проводится препарирование каждой семяпочки в отдельности. Эта методика пригодна для видов со сравнительно крупными семяпочками (сем. Poaceae, Liliaceae).

Для изучения развития женского гаметофита часто пользуются методом исследования прозрачных семяпочек после их обработки в просветляющих средах. Существует большой набор просветляющих сред для разнообразных ботанических объектов – силиконовое масло, молочная кислота, метилсалицилат, этилсалицилат и др. В отделе цитологии и анатомии ВНИИР им. Н. И. Вавилова в качестве просветляющей среды используют этилсалицилат (этиловый эфир салициловой кислоты). Эта среда кроме просветляющего действия оказывает также и мацерирующее действие на ткани семяпочки, благодаря чему становится возможным выдавливание или вычленение зародышевых мешков (Орел, Константинова и др., 1988). Фиксацию цветков разных фаз развития проводят в смеси спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1) в течение одних суток. После трехразовой промывки 96-градусным спиртом материал хранят в нем до лабора-

торного исследования. Перед исследованием проводят обработку цветков или отдельных частей завязи в растворе этилсалицилата. Время обработки зависит от особенностей объекта (люцерна – 12–24 часа, клевер – до 7 суток). Затем завязи дважды промывают 96-градусным спиртом и помещают на предметное стекло в каплю ацетокармина или 45%-й уксусной кислоты. Завязь препарируют на предметном стекле под микроскопом МБС. Препаровальными иглами раскрывают плодolistик, стенки завязи удаляют, оставляя только семяпочки на плаценте.

При выделении зародышевых мешков путем раздавливания семяпочек их накрывают покровным стеклом и осторожно, слегка надавливая, касаются концом иглы покровного стекла над каждой семяпочкой. В этот момент происходит раздавливание семяпочки и освобождение зародышевого мешка. После надавливания под покровное стекло добавляют ацетокармин. При выделении зародышевых мешков вычлениением их продолжают препарировать электролитически заточенными тонкими препаровальными иглами, осторожно раздвигая интегументы и удаляя их. Для наиболее длительного сохранения препарата под покровное стекло закапывают раствор глицерина в воде (1:1). Для выявления крахмала в зародышевых мешках, просветленных в метил- или этилсалицилате, необходимо вынуть цветок из указанных сред и три раза промыть в 96-градусном спирте. Затем цветок следует поместить на предметное стекло в каплю раствора йода в йодистом калии и препарировать под лупой, освобождая семяпочки.

Способы выделения зародышевых мешков без предварительной мацерации нашли применение преимущественно при исследовании однодольных растений с относительно крупными семяпочками: рожь, тритикале, пшеница, ячмень и др. (Орлова, Авалкина, 1985). Цветки или соцветия на разных этапах формирования фиксируют по Чемберлену в течение 24 часов. Материал можно оставить в фиксирующей жидкости на несколько суток (качество обычно не ухудшается). Затем его промывают сутки в 70-градусном спирте и оставляют на хранение в новой порции 70-градусного спирта. Перед окрашиванием завязи извлекают из цветков и промывают в дистиллированной воде 17–18 час. Выделенные завязи окрашивают по Фельгену. Препарирование завязей и семяпочек проводят в капле дистиллированной воды с добавлением глицерина (1:1). Зародышевый мешок хорошо заме-

тен, благодаря интенсивной окраске антиподального комплекса. Вычлененный зародышевый мешок можно подкрасить ацетокармином, предварительно убрав с предметного стекла глицерин.

Приготовление этилового эфира салициловой кислоты. В конической колбе емкостью 100 мл в 44 мл этилового спирта растворить 5 г салициловой кислоты. Затем осторожно, чтобы не взболтать жидкость в колбе, влить 10 мл концентрированной серной кислоты. Жидкость в колбе расслоится. Нижний слой будет коричневой окраски, верхний прозрачный, сиреневатого оттенка. Колбу (не встряхивая!) сразу закрыть резиновой пробкой с дефлегматором (стеклянной трубкой диаметром 10 мм длиной не менее 50 см). Затем колбу осторожно поместить в горячую водяную баню. После закипания жидкости в колбе, кипятить не более 4 минут. Колбу вынуть и остудить, не открывая. Верхний слой слабо-сиреневого цвета осторожно слить.

Методика подсчета хромосом в верхушечной меристеме корня

Метод давленных препаратов позволяет проводить подсчет хромосом и изучение их морфологии относительно быстро и качественно. Основные этапы работы: проращивание семян, клубней, корневищ и лукович для получения молодых растущих корней; предварительная обработка живых (нефиксированных) кончиков корней веществами, влияющими на митоз; фиксация и окрашивание материала; исследование готовых препаратов под микроскопом.

Семена, клубни, луковичы, корневища проращивают в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге или мокром песке при комнатной температуре. Корни, в зависимости от вида, должны быть не короче 0,5–20 мм, так как только в этом случае в них наблюдаются интенсивные клеточные деления. Предфиксационную обработку применяют только в случае исследования хромосом в метафазе. Это может быть холодовая обработка или воздействие колхицином, 8-гидроксихинолином, парадифхлорбензолом и др. Предфиксационная обработка вызывает определенные физические изменения в цитоплазме и хромосомах, способствуя разбрасыванию и укорачиванию хромосом, четко выявляя их морфологию. Существенным моментом является определение наиболее подходящей концентрации и времени воздействия используемых веществ, которые для не изученных ранее объектов подбираются опытным путем. Передозировка колхицина

может привести к возникновению полиплоидных клеток. Холодовая обработка к таким нарушениям не ведет. Для ее проведения корни утром (не позднее 9–10 часов) переносят в холодную воду (+5 °С) и в течение суток выдерживают в холодильнике.

Затем материал промывают 96-градусным спиртом и переносят в фиксатор (раствор Карнуа, ледяную уксусную кислоту и др.). При последующей ацетокарминовой окраске фиксацию можно проводить прямо в красителе. Для того чтобы хромосомы в клетках стали отчетливо видны, необходимо окрасить зафиксированный материал красителем, выявляющим хроматин. При окраске большое значение имеет чистота стекол. Окраску проводят по Фельгену с холодным гидролизом или ацетокармином. Используют и различные быстродействующие красители, в состав которых в качестве растворителя входят уксусная и пропионовая кислоты (ацетоорсеин, ацетолакмид, пропионовый лакмид, уксусный и пропионовый гематоксилины). При работе с трудноокрашиваемыми объектами лучшие результаты получаются, если перед окрашиванием материал несколько минут выдерживают в соответствующей кислоте, в которую добавлено несколько капель насыщенного раствора уксуснокислого железа.

При приготовлении препаратов кончики корня помещают на предметное стекло в каплю 45%-й уксусной кислоты и отрезают корневой чехлик и неокрашенную часть. Зону деления клеток разрезают на несколько частей и распределяют на стекле так, чтобы все они попали под покровное стекло, но лежали друг от друга на некотором расстоянии. Покровное стекло накладывают сверху и лишнюю жидкость убирают фильтровальной бумагой. Затем легким постукиванием заостренной спички добиваются равномерного распределения клеток в один слой. В случае неудовлетворительной окраски препарат подкрашивают несколькими каплями ацетокармина, добавив его под покровное стекло.

Методика подсчета хромосом в пыльцевом зерне

Хромосомы в пыльцевом зерне удобнее всего считать во время первого митоза. У различных растений митотические деления в пыльцевых зернах наблюдаются в разное время суток, это зависит прежде всего от температуры окружающей среды. Поэтому время сбора материала устанавливается экспериментально для каждого объекта. При теплой погоде митоз начинается в более ранние часы и протекают

активнее. Материал фиксируют в растворе Карнуа. Хорошее окрашивание хромосом в пыльцевых зернах дает ацетокармин. Крупный пыльник помещается на предметное стекло в каплю ацетокармина, у него отрезается широкий конец и содержимое выдавливают в краситель. Оболочки пыльника удаляют. Мелкий пыльник целиком помещается в каплю ацетокармина. Приготовленный препарат несколько раз нагревается над пламенем спиртовки (не допускать закипания!). Избыток ацетокармина убирают фильтровальной бумагой после того, как препарат окрасится. Мелкие пыльники хорошо мацерируются при нагревании в красителе и легко раздавливаются при постукивании спичкой по покровному стеклу. После окрашивания ярко-красные хромосомы четко видны на фоне светло-розовой цитоплазмы.

Исследование роста пыльцевых трубок в пестике при наблюдении в ультрафиолетовом свете

Одно из наиболее эффективных средств для изучения прогамной фазы оплодотворения – исследование роста пыльцевых трубок в пестике под люминесцентным микроскопом. Этот метод сочетает в себе быстроту приготовления препаратов и высокую объективность исследования. Метод основан на специфической способности флуорохрома анилинового синего соединяться с каллозой, которая входит в оболочки пыльцевых трубок. С помощью люминесцентного микроскопа можно проследить рост пыльцевых трубок от рыльца до семязачки, а также возможные нарушения их роста в случаях несовместимости при скрещиваниях или самонесовместимости. Пыльцевые трубки флуоресцируют желтовато-зеленым цветом на темном фоне. Предлагаемый метод разработан в отделе анатомии и цитологии ВИР (1989).

Для приготовления флуорохромированных препаратов пестиков из исследуемого материала необходимо экстрагировать хлорофилл, так как он обладает собственной флуоресценцией. Для этого фиксированные в ацетоалкоголе цветки или пестики необходимо промыть в двух-трех сменах 96-градусного спирта. Хранят материал также в 96-градусном спирте. Для мацерации материал помещают в тигель и заливают концентрированной щелочью (NaOH или KOH). Крупные и толстые пестики предварительно разрезают вдоль столбика. Тигель нагревают на спиртовке и доводят раствор до кипения, затем его охлаждают. Материал и жидкость, в которой он находится, становятся

бурого цвета. При исследовании роста пыльцевых трубок злаков, мацерацию проводят без нагревания. Пестики выдерживают в 1N растворе щелочи 30–40 мин.

После мацерации материала тонкими препаровальными иглами под микроскопом МБС-10 удаляют стенки завязи. Материал при помощи пинцета переносят на часовое стекло и промывают водой два раза. Затем пестики переносят на предметное стекло в каплю раствора флуорохрома – анилинового синего, накрывают покровным стеклом и исследуют под люминесцентным микроскопом Люмам, МУФ-2, МУФ-3 или микроскопами МБИ-1, МБИ-2, МБИ-15 с осветителем ОИ-18. При подсыхании препарата к флуорохрому можно добавить глицерин или дистиллированную воду. При хранении в холодильнике препарат можно использовать 2–3 дня.

Микрофотографирование в УФ-лучах рекомендуется проводить в темном или затемненном помещении. На фотоокуляр микрофотонасадки помещают запирающий светофильтр ЖСЗ, который предотвращает попадание УФ-лучей на фотоэмульсию. При использовании пленок Микрат-200 и Микрат-300 экспозиции составляют 1–4 мин.

Приготовление раствора флуорохрома. В качестве флуорохрома используют раствор водорастворимого анилинового синего. Используют красители: хлопчатобумажный синий, метиловый синий, анилиновый синий.

В 1 л дистиллированной воды растворяют 34,2 г K_2HPO_4 (калий фосфорнокислый двузамещенный). РН раствора должен быть около 8. Затем в приготовленный раствор небольшими порциями добавляют порошок флуорохрома, каждый раз раствор тщательно перемешивают и доводят его до сине-фиолетового цвета. Раствор должен оставаться прозрачным. В раствор добавляют 50 мл 10%-го раствора аммиака и оставляют на свету при комнатной температуре.

Для приготовления 1N раствора NaOH в 100 мл дистиллированной воды необходимо растворить 40 г едкого натрия.

Методы изучения микосимбиотрофных связей

Выявление типов микориз и определение интенсивности микоризной инфекции проводят при микроскопическом изучении активных корневых окончаний. У трав с мочковатой корневой системой собирают все корни. У растений со стержневой корневой системой

собирают лишь самые тонкие корни, толщиной не более 1 мм. Максимум развития микориз у древесных растений приходится на 5–20-сантиметровый слой почвы, поэтому корни для изучения микориз берут именно с этой глубины. Лопатой, совком или тупым ножом обнажают тончайшие корневые ответвления изучаемого растения. При невозможности взятия проб у взрослого дерева, их берут у 10–12-летних экземпляров, растущих более или менее отдаленно друг от друга. Взятые образцы необходимо отряхнуть от частичек почвы и этикетировать.

Корни деревьев и кустарников фиксируют в фиксаторе Карнуа. Корни травянистых растений – в 4%-м растворе формалина или 70-градусном этиловом спирте. При морфологическом анализе корней отмечают их окраску, характер ветвления, наличие или отсутствие корневых волосков, степень их развития, наличие или отсутствие эктомикориз. Эктомикоризы классифицируют по форме (булавовидные, вильчатые, коралловидные и др.), определяют их размеры, цвет, форму поверхности, подсчитывают количество микоризных окончаний. Особенности строения эктомикориз изучают на поперечных срезах корней, изготовленных на микротоме. При известных навыках хорошие результаты получаются и при изготовлении срезов бритвой от руки.

Изучение эндомикориз начинают с мацерации фиксированных корней. Корни помещают в 15%-й раствор КОН и кипятят в течение 1–3 часов на водяной бане (время кипячения необходимо корректировать в зависимости от особенностей объекта).

Корни окрашивают анилинблау в молочной кислоте, который приготавливают по рецепту Кобеля: анилиновая синь – 0,1 г, молочная кислота – 50 г, вода – 100 г. Срезы и отмытые от щелочи мацерированные корни помещают в раствор анилинблау на 1–2 часа без нагревания, затем отмывают от красителя в дистиллированной воде и переносят на 30 минут в молочную кислоту для дифференцировки окраски. Срезы и мацерированные корни после окраски отмывают от молочной кислоты, помещают в глицерин и хранят под стеклянным колпаком или в холодильнике.

Список литературы

Абрамова Э. В., Карлинский О. А. Руководство к практическим занятиям по генетике. Л.: Колос, 1968.

Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г. и др. Основы микроскопических исследований в ботанике: Справ. рук. М.: Изд-во каф. высш. растен. биол. ф-та Моск. гос. ун-та, 2000.

Клейн Р. М., Клейн Д. Т. Методы исследования растений. М.: Колос, 1974.

Львова И. Н. Большой практикум по дарвинизму и генетике. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. Вып. 1.

Методические указания по цитологической и цитоэмбриологической технике / Л. И. Абрамова, И. Н. Орлова, М. А. Вишнякова и др. Л.: Изд-во ВИР, 1982.

Навашин М. С. Методика цитологического исследования для селекционных целей. М.; Л.: Сельхозгиз, 1936.

Наутов И. А., Козлов В. Е. Основы ботанической микротехники. М.: Совет. ботаника, 1954.

Орел Л. И., Константинова Л. Н. и др. Экспресс-методы определения фертильности зародышевых мешков люцерны (методические указания). Л.: Изд-во ВИР, 1988.

Оценка характера взаимодействия пыльцевых зерен и пыльцевых трубок с пестиком в совместимых и несовместимых вариантах опыления / Сост. Вишнякова М. А.; под ред. Орел Л. И. Л.: Изд-во ВИР, 1989.

Паламарчук И. А. Большой практикум по высшим растениям. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. Вып. 1, 2.

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980.

Пермяков А. И. Микротехника: Учеб.-метод. пособие. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988.

Приготовление препаратов целых зародышевых мешков пшеницы, ржи и тритикале: Метод. указ.) Л.: Изд-во ВИР, 1985.

Прозина М. Н. Ботаническая микротехника. М.: Высш. шк., 1960.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит., 1953.

Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. М.: Совет. наука, 1957.

Селиванов И. А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. С. 16–27.

Солнцева М. П., Левковский В. П. Ускоренное изготовление постоянных препаратов зародышевых мешков и пыльцевых комплексов растений // Цитология и генетика. 1978. Т. 12, № 6. С. 489–492.

Федин Л. А., Барский И. Я. Микрофотография. М.: Наука, 1971.

Фурст Г. Г. Методы анатомо-гистохимических исследований растительных тканей. М.: Наука, 1979.

Хохлов С. С., Зайцева М. И., Курьянов П. Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка / Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1978. С. 29–36.

СОДЕРЖАНИЕ

Микроскоп	4
Основные вспомогательные приборы	9
Микрофотография	13
Методика получения постоянных препаратов	15
Фиксация материала	15
Промывка фиксированного материала	19
Обезвоживание материала и заключение его в парафин	20
Получение микротомных срезов	25
Наклеивание срезов на предметные стекла	28
Окраска препаратов	32
Заключение срезов в бальзам	39
Список необходимых материалов, инструментов, посуды и реактивов	41
Методика получения временных препаратов	45
Методика приготовления препаратов для цитоэмбриологических исследований	48
Экспресс-методы приготовления тотальных препаратов зародышевых мешков	48
Методика подсчета хромосом в верхушечной меристеме корня	51
Методика подсчета хромосом в пыльцевом зерне	52
Исследование роста пыльцевых трубок в пестике при наблюдении в ультрафиолетовом свете	53
Методы изучения микосимбиотрофных связей	54
Список литературы	56

Учебное издание

БОТАНИЧЕСКАЯ МИКРОТЕХНИКА

Руководство к практическим занятиям

Составители *Изольда Алексеевна Уткина,*
Алексей Владимирович Мальцев,
Светлана Анатольевна Зимницкая,
Наталья Анатольевна Кутлунина

Ответственный редактор
Изольда Алексеевна Уткина

Редактор и корректор М. А. Овечкина
Компьютерная верстка Н. В. Комариной

ЛР № 020257 от 22.11.96. Подписано к печати 05.07.2001. Формат 60x84 $\frac{1}{16}$.

Бумага для множительных аппаратов. Гарнитура Times.

Уч.-изд. л. 3,19. Усл. печ. л. 3,37. Тираж 200 экз. Заказ .

Издательство Уральского университета. 620083, Екатеринбург, пр. Ленина, 51.

Отпечатано в ИПЦ «Издательство УрГУ». 620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.