

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

А. Г. АРАРАТЯН

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ПЫЛЬЦЫ

Среди методов исследования ряда вопросов по биологии цветения, опыления и оплодотворения растений [13], по палеогеографии и стратиграфии [1, 3, 4, 6, 10, 12], по происхождению меда [5] и др. определенная, иногда весьма важная, роль принадлежит методу спорово-пыльцевого анализа. Последний, например, имеет исключительное значение при исследовании четвертичных отложений, часто являясь почти единственно удовлетворительным методом при синхронизации пластов, почему и литература по его применению к геологическим вопросам особенно обширна [1]. При спорово-пыльцевых исследованиях часто бывает необходимым выяснить не только видовой состав и процентные отношения отдельных видов в смеси, т. е. так называемый спорово-пыльцевой спектр, но также абсолютные количества пыльцы или спор в определенной навеске той или другой горной породы, например, торфа [3], или в каком-либо генеративном органе растения, например, в пыльнике, в целом цветке, в соцветии, спорангии и равно также на опыленном рыльце [13, 14]. В последних случаях получение материала для анализа просто и не требует большой подготовки, в то время как при исследовании горных пород пыльцу и споры приходится извлекать из основной массы изучаемого объекта, притом часто весьма сложным способом [2, 3, 12 и др.].

Весьма точное определение количества пыльцы в пыльнике можно привести на срезах фиксированного материала. Такой способ является сравнительно трудоемким, требует специальной аппаратуры и реактивов и много времени. Неплохой результат получается однако методом разбавления и статистического подсчета, обычно с помощью счетной камеры. Этот метод и является общепризнанным для определения количества спор и пыльцы.

Метод определения количества пыльцы разбавлением весьма кратко описан в руководствах Н. А. Наумова [8, 9]. Пыльца, как и споры грибов, распускается в определенном объеме 30—50° спирта. Каждый раз, прежде чем взять каплю для рассматривания под микроскопом, необходимо встряхивать взвесь, так как пыльца в спирту быстро оседает на дно сосуда. Кроме того, каплю взвеси можно взять только пипеткой, так как при использовании стеклянной палочки результат получается неправильный [8].

Ф. Пооль определяет количество пыльцы в водной суспензии [15], иногда добавляя к взвеси немного формалина, для предотвращения развития плесени при продолжительном хранении взвеси и несколько крупинок сафранина, для окраски пыльцевых зерен с целью лучше различать их. Для подсчета он берет пипеткой 0,1 мл взвеси и переносит на обыкновенное предметное стекло и покрывает покровным стеклом достаточного размера. Счетную камеру он считает для этой цели непригодной. Подсчет чисел пыльцы в десяти таких пробах дают вполне удовлетворительный результат, с ошибкой приблизительно в 2%.

Несколько иным методом ведет исследование Г. Эрдтман [14]. Он берет соцветие, цветок или другой орган перед раскрытием пыльников и манцерирует в соответствующих реактивах, причем все части взятых органов разрушаются за исключением экзин пыльцы.

В. П. Гричук и Е. Д. Заклинская [3] выделяют пыльцу (вернее экзины) из определенной навески породы, готовят глицериновую или водноглицериновую суспензию и переводят ее в градуированную пробирку, после чего производят подсчет статистическим методом.

Описываемый нами метод определения пыльцы в пыльниках несколько отличается от вышеописанных и заключается в следующем.

Пыльники для анализа, как и при других методах [14, 15], собираются нераскрывшимися, но по возможности не раньше, чем за 1—2 дня до раскрытия. В зависимости от биологии опыления этот момент у разных растений наступает в разной фазе развития цветка, что в каждом случае определяется опытным путем.

Собранные пыльники кладутся в небольшие (5—8 мл) градуированные пробирочки, в каждую по одному или по несколько пыльников. Число взятых пыльников зависит от их величины и от поставленной задачи. Через некоторое время пыльники раскрываются. Во избежание рассеивания пыльцы, а также загрязнения извне, пробирочки ставятся в спокойное место и прикрываются бумажными калпачками или затыкаются кусочками ваты. Иногда пыльники сморщиваются, но не раскрываются. В таких случаях часто помогает влажная камера (или просто смоченный кусочек ваты) или нагревание на водяной бане. Если эти приемы не дают удовлетворительных результатов, то приходится разрушать пыльники стеклянной палочкой, а приставшую к кончику палочки пыльцу смыть в пробирочку несколькими каплями спирта.

К раскрытым пыльникам наливается около 1—2 мл 95° спирта, хорошо отмывающего пыльцу и фиксирующего ее. Смесь тщательно перемешивается стеклянной палочкой. Затем, если створки пыльников большие, то с помощью пинцета их переносят в чистую пробирку, куда наливают немного спирта и после встряхивания жидкость сливается в пробирочку с основной взвесью. Створки, на которых почти не осталось пыльцы, выбрасываются. Очень мелкие части пыльников не мешают подсчету и получению точных данных, почему и оставляются во взвеси. На стенках пробирочки тоже остается некоторое ко-

личество пыльцы, которое смывается в основную жидкость тонкой струей спирта.

После того как вся пыльца осядет на дно пробирочки, спирт осторожно сливается в другую посуду, оставляя его над осадком в возможно меньшем количестве, не более одной десятой части будущего общего объема жидкости. Для ускорения этой процедуры можно использовать ручную центрифугу. При оставлении пробирочек на некоторое время, от нескольких часов до 1—2 суток, лишний спирт может просто испариться.

К оставшемуся в пробирочке слою спирта с пылью наливается вязко-жидкая среда до определенной метки, 1,2 и более мл, и при помощи стеклянной палочки тщательно смешивается с пылью до получения равномерной суспензии (проверить под лупой). Следует пробирочки номеровать и под соответствующими номерами в журнале наблюдений записать необходимые данные: дату, вид растения, взятый для анализа орган, количество пыльников, вид вязко-жидкой среды с указанием процента раствора, результаты подсчета и вычислений.

Жидкая среда должна быть достаточно вязкой, чтобы пыльца после перемешивания в ней долго оставалась во взвеси и не оседimentировалась. Капля взвеси берется стеклянной палочкой. Хотя взвесь и относительно постоянна, но все же рекомендуется, прежде чем брать каплю для подсчета, той же палочкой перемешать смесь, особенно при взятии первой капли.

В качестве вязко-жидкой среды нами испробованы растворы ряда веществ—агара, желатина, траганта, картофельного крахмала в различных концентрациях, а также неразбавленный глицерин. Наиболее удобными оказались: однопроцентный раствор траганта, 0,1—0,2-процентный раствор агара; неразбавленный глицерин. Опыты проводились при температуре в помещении 18—22° С. Взвесь в растворах двух указанных веществ держалась по несколько дней, а в глицерине всего несколько часов. Употребление глицерина в качестве вязко-жидкой среды имеет то неудобство, что от него линии счетной камеры становятся плохо видимыми.

Растворы траганта и агара приготавливаются следующим образом. Сухой трагант размельчается в ступке. Из тонко измельченной части отвешивается нужное количество, переносится в коническую колбочку, прибавляется часть требуемого количества воды и оставляется до разбухания. С агаром поступают так же, но агар размельчения в ступке не требует. Через несколько часов или на другой день прибавляется оставшая часть воды в горячем или в холодном виде и в обоих случаях колбочки ставятся на горячую водяную баню до полного растворения агара или траганта. Если предполагается вязко-жидкую среду хранить продолжительное время, то к ней прибавляется немного антисептика (тимол, фенола или формалина), и раствор охлаждается до комнатной температуры. Трагакантовый раствор получается не-

сколько мутноватым, но эта муть не мешает подсчету пыльцы под микроскопом.

Подсчет пыльцы производится при помощи счетной камеры. Как известно, имеется несколько типов счетных камер с глубиной в 0,1 мм. На счетной пластинке выгравированы параллельные линии на расстоянии в 50 μ. Получаются квадратики в 2500 кв. μ или 0,0025 кв. мм. Во многих счетных камерах для удобства каждые шестнадцать квадратов очерчены двойной линией. Двадцать пять таких квадратов составляют один квадратный миллиметр. Такие счетные камеры приспособлены для подсчета кровяных телец, диаметр которых равен 6—7 μ, весьма удобны также для подсчета спор грибов, т. к. в каждом квадратике может поместиться по несколько кровяных телец или спор. По сравнению с последними пыльцевые зерна намного крупнее. Правда, попадаются и весьма небольшие пыльцевые зерна, всего 4 μ в длину (у незабудки), но бывают и очень крупные 150—200 μ в диаметре (у тыквенных и мальвовых). Чаще всего размер пыльцевых зерен колеблется между 15 μ и 50 μ. Ясно, что наименьшие квадратики счетных камер малы для подсчета пыльцевых зерен. Подсчет пыльцы нами производится на миллиметровых квадратах, которые целиком помещаются в поле зрения микроскопа при объективах малых увеличений, например, 8 х.

Для подсчета пыльцы особенно удобны те типы счетных камер (Тюрка, Нейбауера), в которых вокруг центрального миллиметрового квадрата имеется еще восемь таких же квадратов. На каждом препарате можно получить девять подсчетов. Несмотря на наличие двух счетных сеточек в камере Горяева, последняя для целей подсчета пыльцы мало пригодна, т. к. квадратные миллиметры плохо различимы.

Обычно достаточно произвести не более ста подсчетов и вывести среднее.

Примеры

1. Взят один пыльник тюльпана (дикорастущего в Армении *Tulipa Julia* С. Koch). Пыльца хорошо отмывается спиртом. Приготовлена суспензия в однопроцентном растворе траганта. Общий объем жидкости вместе с остатком спирта доведен до 2 мл. Среднее от ста подсчетов — 13. Следовательно, количество пыльцы в одном пыльнике равно

$$13 \times 10000 \times 2 = 260000.$$

2. Взято двадцать пыльников пшеницы сорта гамаданикум-66. Так как раскрывание не наступало, пришлось растереть стеклянной палочкой. Растертые стенки пыльников не удалены. Общий объем суспензии 1 мл. Среднее от ста подсчетов — 5,6. Следовательно, количество пыльцы в одном пыльнике равно

$$5,6 \times 10000 : 20 = 2800.$$

Ա. Գ. ԱՐԱՐԱՏՅԱՆ

ՓՈՇԱՆՈՒԻ ՄԵՋ ԾԱՂԿԱՓՈՇՈՒ ՔԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴ

Ս. մ փ ո փ ու մ

Բիոլոգիական և գեոլոգիական որոշ հարցեր ուսումնասիրելու ժամանակ կիրառվում է սպորա-ծաղկափոշային վերլուծություն: Որոշում են բույսերը ըստ սպորների կամ ծաղկափոշու, հաշվում են ծաղկափոշիների տոկոսային հարաբերությունը և կազմում են ծաղկափոշային սպեկտր: Հաճախ կարիք է լինում որոշել նաև ծաղկափոշու քանակությունը, որի վերաբերյալ կան մեթոդներ [3, 8, 9, 14, 15]: Հստ այդ մեթոդների հաշվելու համար վերցնում են ծաղկափոշի կամ նրա էքզիները, խառնում են որևէ հեղուկի մեջ և վիճակագրական եղանակով որոշում ընդհանուր քանակությունը: Որպես հեղուկ միջավայր օգտագործում են սպիրտ, ջուր, գլիցերին: Մենք գտնում ենք, որ ծաղկափոշու (և ոչ թե դատարկ էքզիների) քանակությունը որոշելու համար այդ միջավայրերը այնքան էլ հարմար չեն: Ծաղկափոշին սպիրտի և ջրի մեջ արագորեն նստում է հատակին, իսկ գլիցերինի դեպքում հաշվիչ ապակու գծիկները շեն երևում:

Կայուն սուսալենդիա ստանալու համար մենք օգտագործում ենք թանձր հեղուկ միջավայր, որը պատրաստում ենք տրագանտից և ագարից: Փորձերը ցույց տվին, որ պետք է վերցնել տրագանտի մեկ տոկոսային լուծույթ, իսկ ագարի մեկ ութերորդից մինչև մեկ քառորդ տոկոսային լուծույթ: Ավելի մեծ կոնցենտրացիայի դեպքում ստացվում է սառած դոնդող, պակաս կոնցենտրացիայի դեպքում ծաղկափոշին նստում է հատակին:

Տրագանտի լուծույթը պատրաստում ենք հետևյալ կերպ: Տրագանտը նախապես սանդի մեջ մանրացնում ենք և ամենամանր մասից կշռում անհրաժեշտ քանակություն: Վերջինս լցնում ենք կոնաձև փոքր կոլբայի մեջ, վրան ավելացնում անհրաժեշտ ջրի մի մասը և թողնում, որ տրագանտը ջրի մեջ ուռչի: Նույն ձևով ենք վարվում նաև ագարի հետ, միայն թե այն հարկավոր չէ սանդի մեջ մանրացնել: Մի քանի ժամից հետո կամ հետևյալ օրը ավելացնում ենք մնացած ջուրը և ջրի բաղնիքի վրա տաքանում մինչև լրիվ լուծվելը:

Ծաղկափոշու քանակությունը որոշելու համար վերցնում ենք մեկ կամ մի քանի դեռ չբացված առէջներ և տեղավորում ենք շափիչ փորձանակի մեջ: Երբ առէջները բացվում են և փոշին թափվում է, ավելացնում ենք մի քիչ սպիրտ՝ ծաղկափոշին առէջի փեղկերից անջատելու և ֆիքսելու համար: Այնուհետև սպիրտի մեծ մասը հեռացնում ենք, ավելացնում թանձր հեղուկ միջավայր և ապակե ձողիկով լավ խառնում մինչև որ ստացվի համաչափ խառնուրդ (ստուգել խոշորացույցով):

Ծաղկափոշու հատիկները հաշվելու համար օգտագործում ենք հաշվիչ կամերա: Ծաղկափոշին հաշվում ենք ըստ քառակուսի միլիմետրերի: Կատարում ենք 100 հաշվում և գտնում միջինը: Ստացված թիվը բազմապատկում ենք 10 հազարով, որովհետև մեկ միլիմետրի մեջ կա 1000 խորանարդ միլի-

մետր, իսկ մեր ստացած թիվը վերաբերում է մեկ տասնորդական խորանարդ միլիմետրին: Այնուհետև ստացած միջին թիվը բաժանում ենք առէջների թվի վրա: Օրինակ, վերցված է ցորենի 20 առէջ և պատրաստված է սուսպենզիա նկարագրված ձևով: Հարյուր հաշվումների միջինը 5,6 է: Ուրեմն մեկ առէջի մեջ կա՝

$$5,6 \times 10000 : 20 = 2800 \text{ փոշեհատիկ,}$$

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вальц И. Э. Методика спорового анализа для целей синхронизации угловых пластов, М — Л. 1941.
2. Гладкова А. Н., Гричук В. П. и др. Пыльцевой анализ. М., 1950.
3. Гричук В. П. и Заклинская Е. Д. Анализ ископаемых пыльцы и спор и его применение в палеогеография. М., 1948.
4. Докторовский В. С. Метод анализа пыльцы в торфе. Известия Научно-экспер. торф. инст., 5, 1923
5. Жадовский А. Е. Микроскопический анализ пищевых и вкусовых веществ растительного происхождения, 1934.
6. Крейзель Р. Методы палеоботанического исследования, Л., 1932.
7. Маллицкая Н. Г. Руководство к практическим занятиям по физиологии. Л., 1940.
8. Наумов Н. А. Методы микроскопического исследования в фитопатологии. М.—Л. 1932.
9. Наумов Н. А. и Козлов В. Е. Основы ботанической микротехники, М. 1954
10. Нейштадт М. И. Анализ пыльцы, Труды центр. торф. опытн. станции, том 6, часть 2, М. 1939.
11. Нейштадт М. И. Спорово-пыльцевой метод в СССР, М. 1952.
12. Солоневич К. И. Метод и техника пыльцевого анализа, «Советская ботаника», 3, 1939.
13. Тер-Аванесян Д. В. Роль количества пыльцевых зерен цветка в оплодотворении растений. Труды по прикл. бот., ген., и сел., том 28, вып. 2, 1949.
14. Erdtman G. An introduction to pollen analysis, 1943.
15. Pohl F. Pollenerzeugung der Windblüter. Beihefte z. Bot. Centralbl., Abt. A, Bb. LVI. 1937.