

Շ. Ք. ՏՈՆՅԱՆ

ПРИМЕНЕНИЕ ФОРМАЛИНА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКРАСКИ ЯДЕР И ХРОСОМ ПРИ УСКОРЕННОМ МЕТОДЕ КАРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В настоящее время для целей систематики растений широко применяется метод ускоренного кариологического анализа [3, 4], который благодаря своей большой доступности дает возможность за короткий срок получить картину кариотипов. Преимущество этого метода заключается в том, что все хромосомы, входящие в состав одной клетки, располагаются в одной и той же плоскости, следовательно, представляется возможность одновременно исследовать их.

Ранее нами подробно была изложена мацерация окрашенного материала, путем воздействия на него органическими кислотами [2]. В отношении некоторых представителей различных групп растений наряду с хорошим разъединением клеток меристематической ткани корней наблюдалось частичное обесцвечивание ядер и хромосом.

В данном случае нашей целью явилась информация о дальнейшем усовершенствовании методики приготовления давленных препаратов при ускоренном кариологическом анализе, путем восстановления окраски ядер и хромосом с помощью 40% формалина.

Как известно, основой цитохимических методов исследования являются реакции, происходящие между различными веществами и структурными элементами клеток. Возможно также использование реакций, протекающих с продуктами распада, образующимися при различных химических превращениях в клетке.

Путем цитохимического анализа можно выявить нуклеопроteiиды и нуклеиновые кислоты ядра. В кариологических исследованиях возникает необходимость выделения хромосом из сложной структуры ядра. Как известно, в них содержится гигантская молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты в комплексе с белками-гистоновою прирoды.

Одним из наиболее распространенных цитохимических методов является окрашивание материала специфической реакцией Фельгена, которая протекает с освободившейся ДНК. При помощи реакции Фельгена можно установить, в каких частях клеток растений локализована ДНК.

Изучая хромосомы клеток, Дарлингтон [5, 6] подчеркивал первоестественное значение реакции Фельгена. Он отмечал, что после воздействия красителя в клетке происходит ряд химических процессов, в результате которых ядра становятся структурно-видимыми. После такой оценки становится ясной роль окрашивания в общем процессе приготовления давленных препаратов. Перед тем как окрасить материал, растительные

ткани подвергают слабому кислотному гидролизу, обрабатывая их соляной кислотой; отщепляются как пуриновые, так и другие азотистые основания, содержащиеся в ДНК, и обнажаются альдегидные группы дезоксирибозы. Материал окрашивается фуксином, который в реактиве Шиффа находится в связанной форме с сернистой кислотой (лейкосоединение).

Сернистая кислота, вступая в реакцию с альдегидными группами, освобождает фуксин и окрашивает ядра и хромосомы, образуя комплекс красно-фиолетовой окраски. Затем проводится промывание материала и его мацерация под воздействием следующих органических кислот: лимонной, уксусной, щавелевой и виннокаменной. При указанных процессах выявляется, что кратковременная мацерация материала органическими кислотами некоторым образом влияет на интенсивность окраски, уменьшая ее, в результате чего ядра и хромосомы несколько обесцвечиваются.

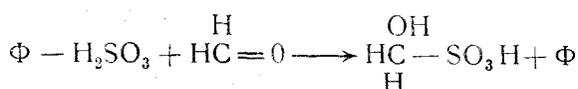
Такое обесцвечивание происходит за счет растворения в кислотах некоторой части фуксина. По-видимому, незначительная часть оставшегося фуксина вновь превращается в бесцветную форму (лейкосоединение). Подобное обстоятельство до некоторой степени затрудняет детальное наблюдение за раздавленным материалом под микроскопом.

Как показали наши опыты, вышеуказанные недостатки при обработке материала органическими кислотами легко устранимы применением 40% формалина (водный раствор формальдегида), который в течение 10—15 мин. легко восстанавливает фуксин до прежней формы. Это объясняется тем, что при наличии формальдегида фуксинсернистая кислота вступает в реакцию с ним, высвобождается основной фуксин, ядра и хромосомы клеток приобретают более интенсивную, чем при первичном воздействии красителя, красно-фиолетовую окраску.

Определение окончательного цвета по реактиву Шиффа вызвало споры среди многочисленных исследователей. Некоторые из них считали, что красно-фиолетовая окраска является единственно «истинным» цветом. Другие настаивали на том, что «истинный» цвет—синий. Лизон [7] находил, что конечная окраска варьирует в достаточно широких пределах.

Во время наших опытов различные представители филогенетически далеких семейств окрашивались по-разному, давая те или иные оттенки от красно-фиолетового до сине-фиолетового.

Учитывая разные вариации окраски исследуемых материалов, мы тоже склонны считать, что любое интенсивное окрашивание следует рассматривать как положительный результат воздействия реактивом Шиффа. Взаимодействие формалина с фуксином можно представить по следующей реакции:



Формалин при этом не вызывает сморщивания клеток. Однако воздействием формалина материал частично теряет свою мягкую консистен-

цию. В связи с этим после формалина исследуемый материал приходится вновь кратковременно обрабатывать кислотой, затем раздавливать.

Таким образом, применение формалина полностью устраняет некоторое обесцвечивание ядер и хромосом, которое наблюдается при мацерации материала органическими кислотами. При этом имеет место не только восстановление первоначальной окраски, но и ее усиление.

Вышеизложенное дает нам возможность представить весь процесс приготовления давленных препаратов по следующей схеме:

1. Предварительная обработка материала 0,01% раствором 8-окси-хинолина в течение 1,5—2,5 час.
2. Фиксация материала в течение 5—10 мин. фиксатором Баталья.
3. Полоскание материала 1 N HCl—один раз.
4. Гидролиз в HCl в разведении 1 : 1 в течение 40—60 мин. при комнатной температуре.
5. Окрашивание реактивом Шиффа в течение 0,5—1 час.
6. Промывание водой при температуре 40°—четыре раза по 1—2 час.
7. Мацерация различными органическими кислотами в течение 30—45 мин.
8. Воздействие 40% формалином в течение 10—15 мин.
9. Полоскание различными кислотами по одному разу.
10. Раздавливание и приготовление препарата.

В результате наших экспериментов с применением формалина нам удалось восстановить окраску ядер и хромосом растений разных родов из семейств: Asteraceae (*Acroptilon* Cass., *Aetheopappus* Cass., *Amberboa* (Pers.) Less., *Centaurea* L., *Chartolepis* Cass., *Crupina* Cass., *Grossheimia* Sosn. et Takht., *Hyalea* (DC.) Jaub. et Spach, *Oligochaeta* C. Koch, *Serratula* L., *Stizolophus* Cass., *Tomanthea* DC., Cucurbitaceae (*Citrullus* (Forsk.), *Cucurbita* L.), Poaceae (*Triticum* L., *Secale* L., *Zea* L.), Solanaceae (*Solanum* L.) и Oleaceae (*Syringa* L.).

Эти семейства хотя филогенетически далеки друг от друга, однако формалин был успешно применен в каждом отдельном случае, что дает право предполагать о его восстановительном свойстве в применении и к другим семействам растений.

Ботанический институт
АН АрмССР

Поступило 4.III 1968 г.

Յ. Թ. ՏՈՆՅԱՆ

ՖՈՐՄԱԼԻՆԻ ԿԻՐԱԹՈՒՄԸ ՔՐՈՄՈՍՈՄՆԵՐԻ ԵՎ ԲՋՋԱԿՈՐԻՋՆԵՐԻ
ՆԵՐԿՈՒՄԸ ՎԵՐԱԿԱՆԴՆԵԼՈՒ ՀԱՄԱՐ ԿԱՐԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱՆԱԼԻՋԻ
ԱՐԱԳԱՅՎԱԾ ՄԵԹՈՒԴԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Յիտորքիմիական մեթոդները, որոնք լայնորեն կիրառվում են կարիոլոգիական ուսումնասիրությունների ժամանակ, արդյունք են տարբեր ներկերի

և բջջի ստրուկտուրային էլեմենտների միջև ընթացող քիմիական ռեակցիաների:

Այդ մեթոդներից լայնորեն կիրառվում է Ֆյուլգենի նուկլեինային ռեակցիան, որը ներկման ճանապարհով, քրոմոսոմների հայտնաբերման յուրահատուկ միջոց է:

Ըստ այդ մեթոդի՝ բույսերի մերիստեմատիկ հյուսվածքի բջջակորիզներն ու քրոմոսոմները թույլ են ներկվում Շիֆի ռեակտիվով: Սակայն նկատվում է, որ ներկումից հետո օրգանական թթուներով մացերացման ժամանակ վերը հիշված օբյեկտների բջջակորիզներն ու քրոմոսոմները սովորաբար որոշ չափով գունազրկվում են, որպիսի հանգամանքը, սակայն, դժվարացնում է նրանց ուսումնասիրությունը մանրադիտակի տակ:

Հեղինակն առաջարկում է վերականգնել բջջակորիզների և քրոմոսոմների գույնը ֆորմալինի ջրային լուծույթով՝ ֆորմալդեհիդով: Այս դեպքում ներկված և մացերացված օբյեկտները 10—15 րոպե պահվում են ֆորմալինի 40% լուծույթում, որից հետո բջջակորիզներն ու քրոմոսոմները ո՛չ միայն վերականգնում են իրենց նախկին գույները, այլև ներկվում են ավելի ինտենսիվ՝ կարմրա-մանուշակագույնից մինչև կապտա-մանուշակագույնը:

Դա բացատրվում է նրանով, որ ֆորմալդեհիդի առկայության ժամանակ ֆուրսինծծմբային թթվի ծծմբային խումբը հեշտությամբ միանում է ֆորմալդեհիդի հետ, որի հետևանքով հիմնական ֆուրսինն անշատվում է, բջջակորիզներն ու քրոմոսոմներն ավելի ցայտուն են գունավորվում:

Քանի որ ֆորմալինի կիրառումը դրական արդյունքներ է տվել միմյանցից հեռու կանգնած ընտանիքների նկատմամբ, ուստի հեղինակը ենթադրում է, որ այն բավական ընդարձակ կիրառում կարող է գտնել նաև այլ բուսական ընտանիքների նկատմամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Каррер П. Курс органической химии. Л., Госхимиздат, 1962.
2. Коньян С. Некоторые модификации ускоренного метода кариологического анализа, ДАН АрмССР, 4, 1967.
3. Battaglia E. A simplified Feulgen method using cold hydrolisis. Caryologia, vol. IX, 2, 1957.
4. Battaglia E. A new, 5 minutes fixation in chromosome analysis, Caryologia, vol. 19, 2, 1957.
5. Darlington C. D. Symp. Soc. exp. Biol., 1, 252, 1947.
6. Darlington C. D. Nature, Lond., 149, 66, 1942.
7. Lison L. Bull. Histol. Tech. micr., 9, 77, 1932.