

И. Н. СВЕШНИКОВА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦЕНТРОСОМ В ЖИВОТНОЙ
И РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 29 III 1952)

Методы изучения centrosом у животных были применены к исследованию митоза в растительной ткани. В результате применения методики, разработанной вначале на животном объекте, был проведен сравнительный анализ митоза животной и растительной клетки для обнаружения centrosом у высших растений.

В качестве животного объекта была взята *Ascaris megalocephala*, где изучались митозы при первом и втором дроблении яйца. Митозы в корешках у растительных объектов были взяты из различных семейств: Liliaceae, Leguminosae, Compositae, Gramineae. Вначале был применен известный метод Шапошникова — Живаго для изучения веретен в митозе — гидролиз в 30% серной кислоте при 58—59° (1). Перед фиксацией Карнуа яичники аскариды были подвергнуты в чашках Петри воздействию температуры 37° в течение 18 час. для получения нужной стадии дробления яйца. После гидролиза препаратов в течение 25 мин., хромосомы растворились (рис. 1), а нити веретена и центриоли набухли, как это было показано Л. С. Пешковской (2).

Растительные объекты были подвергнуты той же обработке, но для фиксации здесь применялись, кроме Карнуа, еще различные ядерные и плазменные фиксаторы: Буэн — Роскина, Сан-Феличе и Шампи. Вначале окраска производилась гематоксилином, в который прибавлялся 0,1 мольный раствор уксусной кислоты, и pH определялся приблизительно при помощи бумажного универсального индикатора. Таким образом были окрашены срезы толщиной 8—10 мк корешков лука при гидролизе 25 мин. и окраске гематоксилином приблизительно около pH 3. В результате плазма на препаратах была голубая, светлая и без дифференцировки, в квасцах ясно проявились набухшие нити веретена с бляшками на концах и набухшие центриоли, окруженные светлой сферой (см. рис. 2 и рис. 3 — на вклейке к стр. 696). Бляшки у нитей веретена указывают на метафазное расположение хромосом, которые растворились благодаря гидролизу. В телофазе при фиксации Буэн — Роскина и таком же гидролизе можно видеть расщепившиеся центриоли — по две на каждом полюсе.

Возможность элективной окраски протоплазмы и ее компонентов привлекала внимание цитологов еще со времен Эрлиха. В этом направ-

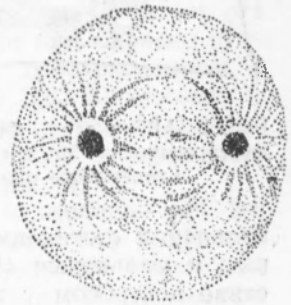


Рис. 1. *Ascaris megalocephala*. Первое дробление яйца. Фиксация Карнуа, гидролиз 25 мин., гематоксилин Гайденгайна

лении работал ряд исследователей, начиная с Бете, показавшего различную окраску толуидинблау в щелочных и кислых растворах. После известной работы Пишингера (3) (окраска толуиндинблау и кислым цианолем в различных рН) ряд авторов применил данный метод к живым объектам. Я. Е. Элленгорн (4, 5) впервые широко применил для растительных объектов этот исключительно интересный метод аналитической окраски.

Элективное окрашивание центросом нами было начато с известного в зоологической цитологии триада Эрлиха (фуксин-метилгрюн-оранж). При избытке фуксина плазма красилась в красный цвет, хро-

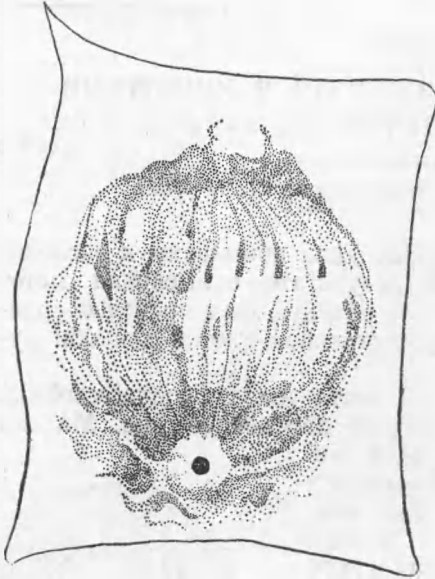


Рис. 2. *Allium* сера. Фиксация Сан-Феличе, гидролиз 30 мин., гематоксилин Гайденгайна около рН 3,0

сомы — в голубовато-зеленый и, что для нас было важно, интенсивно красились центросомы и нити веретена. Если же фуксина было взято настолько мало, что плазма от оранжева приобретала оранжевую окраску, а хромосомы — цвет яркой зелени, то центриоли совсем не красились. Аналогичный результат был получен на митозах в корешках лука: интенсивная окраска центросом при избытке фуксина и полное отсутствие окраски центриолей при недостатке фуксина и преобладании оранжева.

Однако все эти опыты казались нам недостаточно убедительными. Действительно, еще Беляев в 1894 г. (6) видел в редукционном делении у *Lilium candidum* центриоли, хотя и поставил их под вопрос; за ним целый ряд авторов, как, например, Хумфрей у голосеменных (7), Остер-

вальдер у лютиковых (8), Шаффнер у лилейных (9), Немец у лилейных и мальвовых (10), Фенг у жимолостных (11), описывали присутствие центросом у высших растений, а затем некоторые из них, как, например, Немец, отвергали их. Д. Н. Насонов (12) методом осмирования при 37°, показав тянущую роль нитей веретена, обнаружил у растений структуры, аналогичные центросомам у животных. Кроме того, Л. С. Пешковская, Я. Е. Элленгорн и М. И. Сорокина также сообщили мне, что им удавалось наблюдать центросомы у высших растений.

Нужно было установить какую-то закономерность в проявлении центросом у высших растений и причину их отрицания, фигурировавшего со времен Немца во всех руководствах по цитологии. С этой целью была разработана специальная методика для проявления центросом.

Вновь на *Ascaris megalocéphala* была проведена тестовая окраска центросом кислым фуксином и метиленовой синькой по методу Пишингера. Был взят фосфорно-ацетатный буфер, для чего готовился 0,2-молярный раствор кислого ортофосфата натрия Na_2HPO_4 и 0,1-молярный раствор лимонной кислоты. Буферные смеси готовились по таблице определения рН Мак-Ильвейна и проверялись колориметрическим методом при помощи аппарата Михаэлиса. Все эти предосторожности дали возможность вполне точно при определенном рН получать искомые структуры. При рН 3,0 была получена у *Ascaris* особенно интенсивная окраска центросом при отсутствии окраски хромосом, находящихся при этом рН в изоэлектрической точке. При рН 3,6 кра-

сились только хромосомы, тогда как centrosомы, находясь при этом рН в изоэлектрической точке, совсем не красились. Эта методика была применена для исследования centrosом в митозе корешков у *Allium* сера и *Vicia faba*. Centrosомы у растений, в отличие от centrosом у аскариды, хорошо проявились при рН 2,5 и 2,6. При этом рН плазма красится очень слабо, а хромосомы совсем не красятся, что облегчает наблюдения. При рН 2,5 красятся centrosомы, интенсивно красится веретено и особенно ярко его кончик; при рН 2,6 веретено красится менее отчетливо, а самый кончик веретена не красится; центриоли при этом рН красятся наиболее интенсивно, и наиболее отчетливо можно наблюдать также при рН 2,6 окружающую их сферу. При рН 3,2 хорошо красятся хромосомы, а веретено и centrosомы совсем не красятся (ИЭП). При более щелочном рН плазма красится в интенсивно синий цвет, что затемняет картину и затрудняет наблюдения. Наши данные о том, что кончик веретена имеет несколько иной рН, чем средняя часть веретена, находят свое подтверждение в микрургических экспериментах Вада (13). Последний показал, что фибриллярная структура веретена есть реальность и полюсы веретена состоят из более вязкой субстанции, чем средняя часть веретена.

Для окончательного завершения предпринятого исследования centrosом у высших растений была разработана специальная методика окраски centrosом гематоксилином в различных рН. Гематоксидин с этой целью приготавливался на спирту, причем он должен был быть тем или иным способом окислен для перевода его в гематеин. Две капли такого гематоксилина растворялись в 10 каплях буфера. Эксперимент показал, что гематоксилином для выявления centrosом нужно красить в более щелочном буфере, чем при окраске кислым фуксином с метиленовой синькой. Можно предположить, что гематоксидин сдвигает рН на 0,2: вместо буферов рН 2,5 и 2,6, употребляемых при окраске centrosом фуксином с метиленовой синькой, окраска гематоксилином с той же целью производилась в буфере рН 2,7 и 2,8. Хромосомы и плазма в этом буфере не окрашиваются, и препарат, не требуя дифференцировки в квасцах, непосредственно после окраски и промывки быстро проводится через 2 спирта, 2 ацетона и 2 ксилола.

Окраска centrosом гематоксилином в рН 2,7 и особенно рН 2,8 сравнительно с фуксином с метиленовой синькой достигала особенной четкости и интенсивности. Если при окраске фуксином с метиленовой синькой особенно четко окрашивался конец веретена в рН 2,5, то при окраске гематоксилином конец веретена окрашивался соответственно при 2,7. Центриоли и окружающие их сферы достигали максимальной отчетливости при рН 2,8 (см. рис. 4 на вклейке к стр. 696), что соответствует картине, наблюдаемой в фуксине с метиленовой синькой при 2,6.

Эти наблюдения показывают, почему до сих пор не было доказано присутствие centrosом у высших растений, хотя целому ряду авторов удавалось иногда видеть centrosомы у высших растений. Возможно, это происходило благодаря изменчивости свойств гематоксилина по мере созревания. В течение этого процесса, еще мало изученного, могли выявиться структуры, закономерное наблюдение которых не удавалось. Кроме того, исследование centrosом у растений проводилось независимо от centrosом у животных. Данное исследование еще раз показывает преимущество изучения вопросов общей цитологии параллельно на растительных и животных объектах. Существующее до сих пор представление об отсутствии centrosом у высших растений не давало возможности правильно трактовать само явление митоза, ибо таким образом устранялся один из факторов — центр — centrosома, являющаяся неотъемлемой частью всего процесса, наблюдаемого при митозе. На основании найденного факта — centrosом у высших растений — можно выдвинуть новую теорию митоза, основанную на обязательном присут-

ствии центросом. Обоснование теории митоза чрезвычайно важно. Например, без правильного понимания митоза, не имея даже достаточно обоснованной теории митоза, опираясь на одни гипотезы⁽¹⁴⁾, трудно плодотворно изучать патологический митоз, наблюдаемый при образовании раковой опухоли.

За последнее время большое значение в биохимии приобретает понятие о коацерватах⁽¹⁵⁾. Коацерват — такое физико-химическое явление или процесс, который сопровождается отщеплением слоя или капелек, более богатых коллоидами. Возникновение этих капель чаще всего происходит из хлопьевидного осадка⁽¹⁶⁾. Поведение коацервата зависит от многих причин — как от составляющих его частей, так и от температуры, рН, электрического тока и т. д. Поэтому, если рассматривать центросому как коацерват клетки, для понимания поведения центросом, их различий в животной и растительной клетке, а также явления митоза, необходимо цитологическое и термохимическое изучение процессов образования и внутренней структуры системы коацерватов, что подлежит подробному изложению в специальном сообщении. На основании представления о центросоме как одном из неотъемлемых атрибутов митоза и ее взаимоотношении с метаплазмой и веретеном следует искать объяснения явлениям, связанным с движением ядра и других компонентов клетки.

Выражаю благодарность за ценные указания в области зоологической цитологии проф. Г. К. Хрущеву, проф. Б. В. Кедровскому, Л. С. Пешковской и В. А. Шолохову и за техническую помощь М. А. Асикритовой и Л. М. Семеновой.

Выводы. 1. На основании сравнительного цитофизиологического анализа животной и растительной клетки обнаружены центросомы у различных семейств высших растений.

2. Специально разработанная методика окраски красителями определенных рН показала различие между центросомами животной и растительной клетки и вскрыло причину неоявления центросом в растительной клетке при обычной окраске гематооксилином.

3. Специфика поведения и проявления в растительном и животном организме центросом может получить новое объяснение, если рассматривать их как один из коацерватов клетки.

4. Новая теория митоза должна быть построена на основании представления о центросоме как неотъемлемом атрибуте митоза, т. е. на общем принципе строения кинетосомных структур животной и растительной клетки.

Поступило
29 III 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. И. Живаго и К. П. Трухачева, *Арх. анат., гист. и эмбр.*, **19**, № 1/2 (1938). ² Л. С. Пешковская, *ДАН*, **53**, № 2 (1946). ³ A. Pischinger, *Z. Zellforsch.*, **3** (1925). ⁴ Я. Е. Элленгорн и В. А. Яблокова, *Бот. журн.*, **33**, № 5 (1948). ⁵ Я. Е. Элленгорн, В. В. Светозарова, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 3 (1950). ⁶ W. Velajeff, *Flora*, **79**, 430 (1894). ⁷ J. E. Humphrey, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **12** (1894). ⁸ A. Osterwalder, *Flora*, **85** (1898). ⁹ J. H. Schaffner, *Bot. Gaz.*, **31**, No. 6 (1901). ¹⁰ B. Nemes, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **19** (1901). ¹¹ J. A. Feng, *Le Botaniste*, **24**, 355 (1932). ¹² Д. Н. Насонов, *Арх. анат., гист. и эмбр.*, **2**, в. 1 (1918). ¹³ B. Wada, *Cytologia*, **6**, 381 (1934). ¹⁴ P. Milovidov, *Physik und Chemie des Zellkernes*, **1** (1949). ¹⁵ H. G. Bungenberg de Jong, *Protoplasma*, **15**, Н. 1 (1932). ¹⁶ А. И. Опарин и Т. Н. Евреинова, *Сборн. О. Б. Лепешинской*, 1952.