Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 6

БИОФИЗИКА

Г. Б. РАДЗИЕВСКИЙ и Я. Л. ШЕХТМАН

О ПРИМЕНЕНИИ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛЬДООБРАЗОВАНИЯ В ЗЕРНАХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 XII 1954)

Согласно известным из литературы представлениям ([1–3]), повреждение организма при замораживании связано с образованием в нем кристаллического льда. На этих представлениях построена теория «витрификации», объясняющая выживание некоторых организмов при их замораживании переходом тканевой воды в стекловидное состояние при переохлаждении.

Все имеющиеся данные по вопросу об образовании льда в живых организмах при их замораживании основаны на визуальном наблюдении образования льда (по появлению помутнения и непрозрачности в тонких объектах). Представлялось интересным изучать образование льда в живых неповрежденных органах более объективными методами, дающими возможность установить количественные закономерности этого процесса.

В качестве такого метода нами был использован метод рентгеноструктурного анализа образующегося при замораживании льда. Подобные исследования проводились ранее на воде ([4, 5]) и на желатине ([6]). Нами этот метод был применен для анализа льдообразования в зародыше пшеничного зерна.

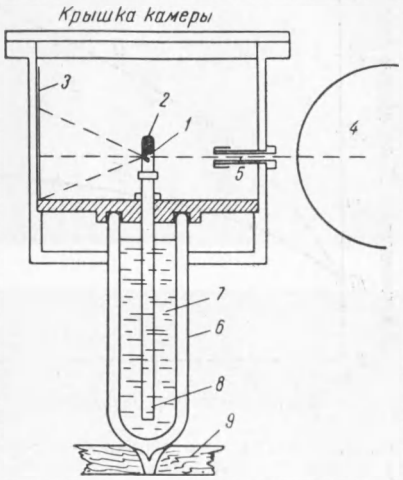

Рис. 1. Конструкция съемочной камеры для низких температур. *1* — держатель объекта, *2* зерно, *3* — пленка, *4* — рентгеновская трубка, *5* — диафрагма, *6* — дюаровский сосуд, *7* — жидкий азот, *8* — медная трубка, *9* — подъемная подставка

Для наших опытов была разработана конструкция цилиндрической съемочной камеры (см. рис. 1), позволяющей производить съемку по методу Дебая при низких температурах. В дне камеры была укреплена сквозная трубка *8* из красной меди, диаметром 6 мм, в верхней части которой находилось гнездо для держателя *1* снимаемого объекта. Устройство гнезда обеспечивало строго фиксированное положение объекта в отношении пучка лучей. Входная диафрагма *5* давала пучок лучей диаметром 0,5 мм. Объект (зерно) препарировался таким образом, чтобы зародыш был отделен от эндосперма и держался лишь на небольшом мостике оставшегося эндосперма. Отпрепарированный зародыш укреплялся в держателе так, что рабочий пучок лучей свободно проходил через него.

Под камерой на подъемной подставке *9* укреплялся дюаровский сосуд с жидким азотом. После установки препарата и закладки фотопленки

сосуд поднимался до погружения медной трубки в жизкий азот. Азот начинал кипеть, интенсивное парообразование выбрасывало мелкие капли жидкого азота на укрепленный препарат, чем достигалось быстрое охлаждение объекта в течение 1—2 сек. до —190°. После прекращения кипения азота температура объекта поддерживалась постоянной на уровне —120° вследствие теплопроводности металлического держателя.

В опытах с замедленным охлаждением в просвет металлической трубки вставлялась пробка, задерживающая проникновение паров азота и жидкого азота внутрь камеры. В этом случае температурный режим устанавливался в течение 5—6 мин.

Съемка производилась на трубке для структурного анализа с медным анодом при 35—40 кв, без фильтра. Длительность съемки 10—15 мин. Температура зерна при охлаждении измерялась термопарой медь — константан, проградуированной по реперным точкам: ртуть —38,9°, хлороформ —63,5°, толуол —95,1°, жидкий азот —195,8°.

Результаты исследования

Было исследовано льдообразование в зависимости от содержания влаги в объекте. Определялась влажность целых семян в зависимости от времени замачиванием посредством взвешивания суховоздушных и замоченных семян. Влажность суховоздушных семян составляла в наших опытах 9,6%. Содержание влаги в самом зародыше непосредственно не определялось, а оценивалось по данным Лайет, исходя из общей влажности зерна (см. рис. 2).

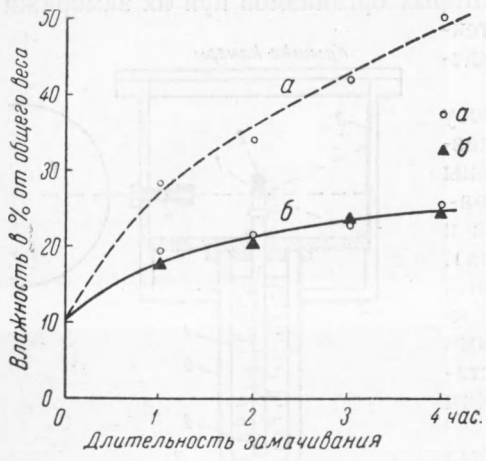

Рис. 2. Зависимость влажности зародыша (*а*) и зерна (*б*) от длительности замачивания. *а* — по [3], *б* — наши данные

При исследовании льдообразования в эндосперме делались тонкие срезы эндосперма толщиной 0,9 мм.

Структурные снимки зародыша и эндосперма были выполнены при различной продолжительности замачивания — от 30 мин. до 39 час. Эти снимки делались при быстром и при медленном охлаждении. Интерференционная картина оказалась в обоих случаях одинаковой, следовательно, образование льда в этих опытах не зависело от скорости охлаждения.

Полученные интерференционные линии были сопоставлены с результатами расчета диффракционных колец для гексагональной кристаллической решетки льда с параметрами $a = 4{,}5$ Å и $c = 7{,}3$ Å по известной квадратичной форме для гексагональной системы:

$$\sin^2\theta = \frac{\lambda^2}{4a^2}\left[\tfrac{4}{3}(h^2 + k^2 + hk) + \frac{a^1}{c^2}\,b^2\right].$$

При введении поправки на поглощение в объекте получилось хорошее совпадение (с точностью 0,5%) вычисленных и наблюдаемых (α и β) линий (табл. 1).

Схема расположения линий дана на рис. 3, фотоотпечатки снимков — на рис. 4. Для контроля были также сделаны снимки замороженной 15% желатины; при этом полученные линии в точности совпали с линиями на снимках замороженных семян.

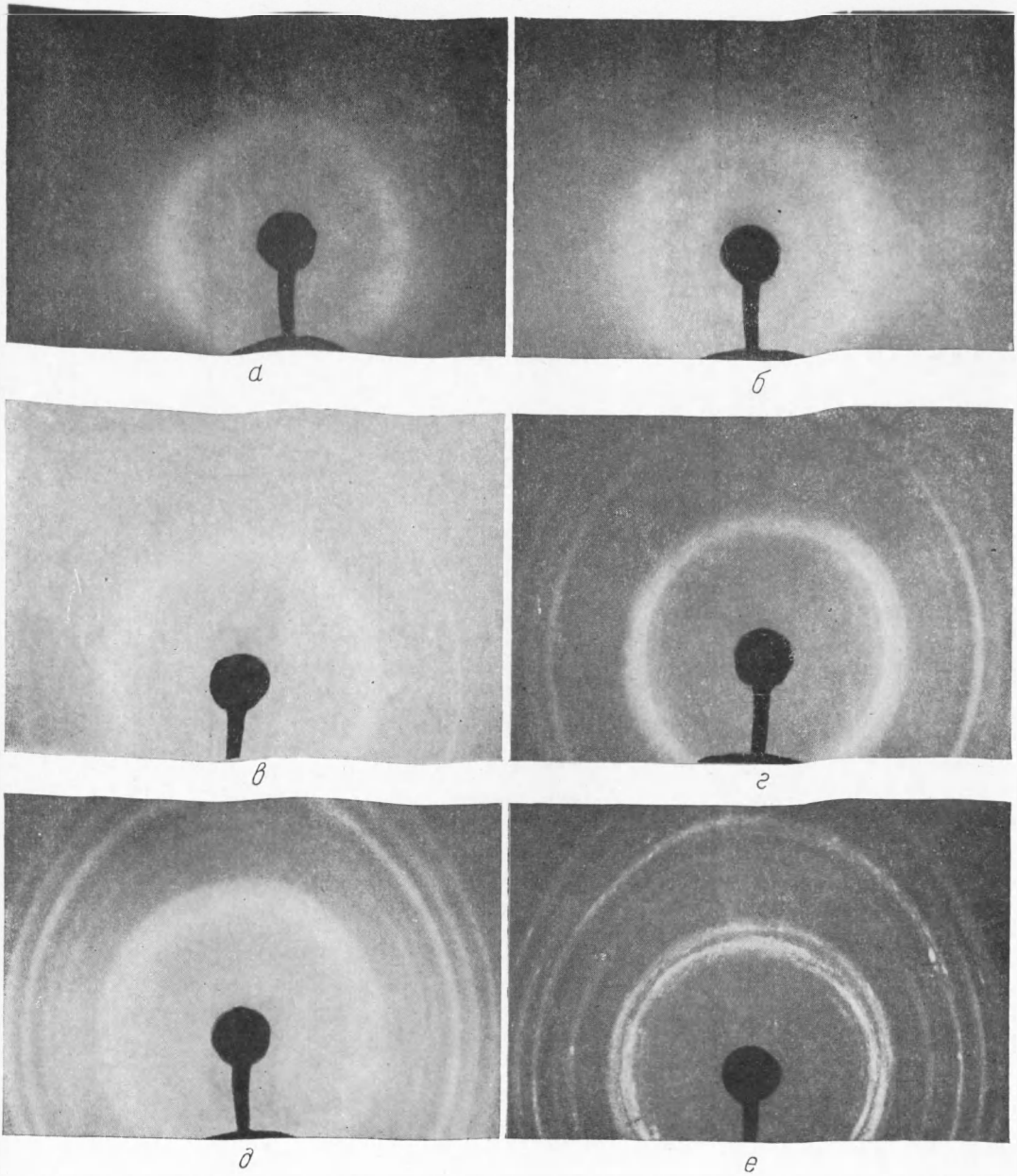

Рис. 4. Рентгенограммы: *а* — *г* — зародыша, *е* — желатины. *а* — воздушно-сухой зародыш, охлажденный до —120° (контрольный снимок); *б* — после 30 мин. замачивания быстро охлажден до —120°, 20% влажности; *в* — после 2 ч. 45 м. замачивания и охлаждения, 37,5% влажности; *г* — после 7 ч. 55 м. замачивания, 60% влажности; *д* — после 25 ч. замачивания, более 60% влажности; *е* — 15% желатина, быстро охлажденная до —120°, 85% влажности

Таблица 1

Расчет рентгенограммы льда

Последовательность линии	Интенсивность*	Измеренные радиусы колец	Исправленные радиусы колец	$\sin^2\theta$ набл.	$\sin^2\theta$ выч.	Отражающая плоскость
1	сл.	15,8	15,4	0,031	0,031	(100)β
2	о. с.	17,5	17,1	0,0385	0,0385	100
3	ср.	18,7	18,3	0,0442	0,0441	001 (2)
4	»	20	19,6	0,050	0,0495	101
5	о. сл.	23,3	22,9	0,069	0,067	(102) β
6	сл.	25,7	25,3	0,083	0,0825	(102)
7	о. сл.	27,5	27,1	0,095	0,094	(110) β
8	ср.	30,3	29,95	0,116	0,116	(110)
9	сл.	33	32,7	0,137	0,138	(103)
10	»	35,6	35,3	0,159	0,160	(112)

* сл. — слабая, о. с. — очень сильная, о. сл. — очень слабая, ср. — средняя.

В результате произведенных исследований было установлено:

1) образование кристаллического льда в зародышах пшеницы имеет место в тех случаях, когда влажность зародыша достигает 33—34%.

2) количество образующегося льда постепенно нарастает по мере увеличения содержания влаги сверх 34%;

3) при содержании влаги меньше 33—34% образование кристаллического льда в сколько-нибудь заметных количествах не происходит ни при быстром (1—2 сек.), ни при медленном (5—6 мин.) охлаждении.

Очевидно, вода при влажности меньше 33—34% находится в особом, «связанном» состоянии.

Полученные результаты находятся в согласии с данными, полученными на желатине, в которых льдообразование оценивалось непосредственно по микроскопической картине (7) или посредством рентгеноструктурных снимков желатины (6).

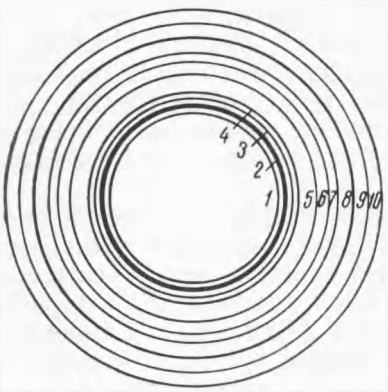

Рис. 3. Схема расположений линий на рентгенограмме льда (ширина линий на рисунке соответствует наблюдаемым интенсивностям линий)

Метод рентгеноструктурного анализа может быть использован в биохимии и коллоидной химии для исследования «связанной» воды в тех случаях, когда это исследование должно вестись при сохранении макро- и микроструктуры исследуемого объекта (8).

Авторы выражают благодарность Г. С. Жданову и Г. А. Гольдеру за участие в обсуждении полученной диффракционной картины структуры льда.

Поступило
27 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] П. Ю. Шмидт, Анабиоз, М., 1948. [2] Э. Я. Граевский, Усп. совр. биол., **25**, № 2, 185 (1948). [3] M. C. Lockett, B. I. Luyet, Biodynamica, **7**, No. 134, 67 (1951). [4] E. F. Burton, W. F. Oliver, Proc. Roy. Soc. London, **153**, No. 878, 166 (1936). [5] D. M. Dennison, Phys. Rev., No. 17, 20 (1921). [6] W. Barnes, F. Mattews, Biodynamica, No. 49, 1 (1939). [7] T. Moran, Proc. Roy. Soc. London, A, No. 112, 760, 30 (1926). [8] Е. Харин, Сборн. Технологические процессы и контроль пищевой индустрии под ред. А. В. Думанского, Воронеж, 1938.