

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

М. Н. Авраменко, Г. И. Тарануха, Г. И. Витко

ЦИТОЛОГИЯ

Лабораторный практикум

*Рекомендовано учебно-методическим объединением
по образованию в области сельского хозяйства в качестве
учебно-методического пособия для студентов учреждений
высшего образования, обучающихся по специальности
1-74 02 02 Селекция и семеноводство*

Горки
БГСХА
2017

УДК 576.3(075.8)

ББК 28.05я73

A21

*Одобрено методической комиссией
агрономического факультета 25.10.2016 (протокол № 2)
и Научно-методическим советом БГСХА 26.10.2016 (протокол № 2)*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *М. Н. Авраменко*;
доктор сельскохозяйственных наук, профессор *Г. И. Тарануха*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Г. И. Витко*

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ведущий научный
сотрудник группы сопровождения научных программ РУП «Научно-
практический центр НАН Беларуси по земледелию» *Т. М. Булавина*;
доктор сельскохозяйственных наук, заведующий кафедрой основ
агрономии УО «Белорусский государственный аграрный
технический университет» *И. П. Козловская*

Авраменко, М. Н.

A21 Цитология. Лабораторный практикум : учебно-методическое
пособие / М. Н. Авраменко, Г. И. Тарануха, Г. И. Витко. – Гор-
ки : БГСХА, 2017. – 108 с. : ил.

ISBN 978-985-467-773-6.

Приведены необходимый теоретический минимум, методики выполнения
лабораторно-практических работ, включающие приготовление цитологических
препаратов для изучения строения клетки, кариотипов, процессов митоза, мейо-
за, перестроек и строения хромосом, жизнеспособности и фертильности пыль-
цы, спорогенеза, гаметогенеза, двойного оплодотворения и онтогенеза.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специ-
альности 1-74 02 02 Селекция и семеноводство.

УДК 576.3(075.8)

ББК 28.05я73

ISBN 978-985-467-773-6

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2017

ВВЕДЕНИЕ

В условиях научно-технического прогресса в селекционных учреждениях Республики Беларусь с целью интенсификации селекционного процесса все шире используются цитологические методы изучения наследственности и изменчивости растений. Интерес к цитологии – науке о клеточном уровне организации живой материи – вполне понятен, так как именно в клетке заложена наследственная информация и от ее реализации зависит судьба будущего урожая. На знании цитологии построена клеточная инженерия растений, которая является важным звеном в биотехнологии. Не зная цитологии, невозможно освоить современную генетику, представляющую собой теоретическую основу селекции. Изучение строения хромосом, кариотипов, процессов митоза и мейоза, оплодотворения позволяет понять, как осуществляется преемственность в ряду поколений клеток и организмов. При этом большое внимание уделяется эффективному использованию микроскопической техники, выбору и подготовке цитологических объектов к исследованиям, анализу и методам документации препаратов.

Лабораторный практикум предназначен для студентов специальности 1-74 02 02 Селекция и семеноводство. В данном пособии излагаются вопросы об общем строении клетки, использовании микроскопической техники и вспомогательных приборов к ней; методики изготовления временных препаратов, определения жизнеспособности и фертильности пыльцы, процесса оплодотворения, этапов онтогенеза.

Приготовление микропрепаратов и их зарисовка – это не только способ фиксирования материала, но и активный метод исследовательской работы, направленный на закрепление теоретических знаний. По заполнению таблиц преподаватель может проследить правильность их заполнения, усвоение студентами изучаемого материала и оценить их знания. Представленные в пособии рисунки дадут возможность студентам рассмотреть микроскопическое строение отдельных элементов клетки, а их зарисовка поможет лучше понять и запомнить учебный материал.

Знания о микроскопическом строении клетки растений необходимы для понимания протекающих в ней биологических процессов, что является немаловажным для будущих специалистов: агрономов, селекционеров.

1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И МЕТОДЫ ЦИТОЛОГИИ

1.1. Основные этапы развития цитологии

Цитология (от греч. *kitos* – полость, ячейка, клетка) – наука о строении, развитии и жизнедеятельности клетки.

Клетка – основная структурная, функциональная и генетическая единица организации живого, элементарная живая система. Клеткам свойственны следующие признаки живого: определенная структурная организация, обмен веществ, постоянное самообновление и самовоспроизведение, раздражимость и возбудимость, наследственность, движение.

В цитологии можно выделить четыре этапа развития.

Первый этап – зарождение понятий о клетке.

Открытие клетки и клеточного строения организмов связано с изобретением светового микроскопа братьями Янсен в 1590 г.

В 1665 г. была открыта клетка физиком Робертом Гуком, который рассматривал тонкие срезы пробки и обнаружил, что она состоит из мелких замкнутых полостей, названных им клетками.

В 1671–1679 гг. итальянец Марчелло Мальпиги дал первое систематическое описание микроструктуры органов растений, положившее начало анатомии растений.

В 1671–1682 гг. англичанин Неемия Грю также очень подробно описал микроструктуры растений; ввел термин «ткань» для обозначения понятия совокупности «пузырьков», или «мешочков».

Оба этих исследователя одновременно и независимо друг от друга подтвердили наблюдения Р. Гука на растениях и дали изумительные по точности описания и рисунки различных растительных тканей, опубликованные в трактатах «Обзор анатомии растений» (М. Мальпиги) и «Начало анатомии растений» (Н. Грю).

В 1632–1725 гг. голландец Антони ван Левенгук впервые увидел одноклеточные организмы (инфузории, бактерии) и клетки животных (эритроциты и сперматозоиды).

В XVII в. представления о клетке были примитивными и клетка рассматривалась как структурная единица. Исследователи того времени в клетке видели лишь оболочку, заключающую в себе полость (отсюда и не совсем удачный термин «клетка»), хотя Роберт Гук обращал внимание на то, что клетка имеет содержимое, назвав его питательным соком.

Второй этап – возникновение клеточной теории.

Благодаря трудам немецких ученых Г. Линка, Я. Мольденхавера, Ф. Мейена, Х. Моля, французских ученых Ш. Мирбеля, П. Тюрпена и др. в ботанике утвердился взгляд на клетки как на структурные единицы. Было обнаружено превращение клеток в проводящие элементы растений. Стали известны низшие одноклеточные растения. На клетки начали смотреть как на индивидуумы, обладающие жизненными свойствами.

В 1827 г. П. Ф. Горянинов, профессор ботаники Петербургской медико-хирургической академии, издал учебник «Начальные основы ботаники», в котором излагал клеточное строение растений. В 1834 г. он писал, что все живое состоит из клеток, возникает из клеток и отличается от неживого своим клеточным строением.

В 1831 г. Роберт Броун при изучении клеток эпидермиса орхидных впервые дает подробное описание ядра, как важного и обязательного компонента клетки.

В 1835 г. Х. Моль впервые наблюдал деление растительных клеток. Исследования французских ученых А. Мильн-Эдвардса, А. Дютроше, Ф. Распая, чешского ученого Я. Пуркине и др. к середине 30-х гг. дали большой материал по микроскопическим структурам животных тканей. Многие исследователи наблюдали клеточное строение различных органов животных, а некоторые проводили аналогию между элементарными структурами животных и растительных организмов, подготавливая тем самым почву для создания общебиологической клеточной теории.

В 1838–1839 гг. ботаник М. Я. Шлейден и зоолог Т. Шванн, объединив идеи разных ученых и свои наблюдения, сформировали клеточную теорию, согласно которой основной единицей структуры и функции живых организмов является клетка.

Третий этап – развитие клеточной теории.

Создание клеточной теории явилось сильнейшим стимулом к изучению клетки как основы всего живого.

В 1840 г. чешский ученый Ян Эвангелиста Пуркине ввел термин «протоплазма» (от греч. *protos* – первый и *plazma* – образование) для клеточного содержимого, представляющего собой живое вещество.

В 1858 г. Р. Вирхов выдвинул принцип «*omnis cellula e cellula*» – каждая клетка происходит только из клетки. Все клетки образуются путем клеточного деления, таким образом, большое значение имеют не оболочки их, а содержимое и ядро.

В 1866 г. Э. Геккель экспериментально доказал, что хранение и передача наследственных признаков осуществляются ядром.

В 1868 г. швейцарский ученый Ф. Мишер установил наличие в ядрах клеток нуклеиновой кислоты.

В 1872 г. русским цитологом И. Д. Чистяковым были открыты внутриядерные структуры – хромосомы.

В 1875 г. Э. Страсбургер открыл кариокинетическое деление клеток у растений, затем в 1878–1882 гг. русский ученый П. И. Перемежко и немецкий ученый В. Флемминг открыли это явление у животных.

В 1883 г. русский ботаник И. Н. Горожанкин описывает проникновение мужского ядра в яйцеклетку у голосеменных растений.

В 1898 г. русский цитолог С. Г. Навашин обнаружил у покрытосеменных растений двойное оплодотворение. Создал учение о форме, размерах и количестве хромосом в клетке (кариотип).

Совершенствование микроскопической техники и методов исследования (введение в микроскопию иммерсионных объективов, конденсора Аббе (1873) и апохроматов (1886), а также применение различных методов фиксации и окраски тканей, использование микротомов) способствовало быстрому развитию цитологии.

Так, в последней четверти XIX в. был обнаружен ряд постоянных составных частей протоплазмы – органоидов: центросомы (1876, бельгийский ученый Э. ван Бенеден), митохондрии (1897–1898, немецкий ученый К. Бенда, у животных; 1904, немецкий ученый Ф. Мевес, у растений), сетчатый аппарат, или комплекс Гольджи (1898, итальянский ученый К. Гольджи).

Достигнуты успехи в изучении физиологии клетки. В 1882 г. И. И. Мечников открыл явление фагоцитоза. Была обнаружена и подробно исследована избирательная проницаемость растительных и животных клеток (голландский ученый Х. Де Фриз, немецкие ученые В. Пфеффер, Э. Овертон); создана мембранная теория проницаемости; разработаны методы прижизненного окрашивания клеток (русский гистолог Н. А. Хржонщевский, 1864; немецкие ученые П. Эрлих, 1885, В. Пфеффер, 1886).

Дальнейшее совершенствование микроскопической техники и создание в 1928–1931 гг. электронного микроскопа позволило выйти на новый уровень. Создаются микроманипуляторы, с помощью которых можно производить над клетками разнообразные операции (инъекции в клетку веществ, извлечение и пересадку ядер, локальное повреждение клеточных структур и т. д.). Большое значение приобрела разра-

ботка метода культуры тканей вне организма, начало которому было положено в 1907 г. американским ученым Р. Гаррисоном. Большое значение имели исследования действия агентов, нарушающих механизм деления и хромосомный аппарат клеток (проникающее излучение, колхицин, ацетонафтен, трипофлавин и др.), которые привели к разработке методов искусственного получения полиплоидных форм, что дало возможность вывести ряд ценных сортов культурных растений. Огромное влияние на развитие цитологии в XX в. оказало открытие в 1900 г. законов Менделя. Изучение процессов, протекающих в ядрах половых и соматических клеток, дало возможность объяснить факты, установленные при изучении наследственной передачи признаков, и построить хромосомную теорию наследственности. В результате возникла отдельная отрасль цитологии – цитогенетика, изучающая цитологические основы наследственности.

Четвертый этап – современный этап развития цитологии.

С 50-х гг. XX в. начался современный этап развития цитологии. Использование электронного микроскопа привело к созданию субмикроскопической морфологии клетки и приблизило визуальное изучение клеточных структур к макромолекулярному уровню. Разработка новых методов исследования и успехи смежных дисциплин побудили к бурному развитию цитологии и привели к стиранию четких границ между цитологией, биохимией, биофизикой и молекулярной биологией, благодаря чему цитология из морфологической и описательной превратилась в экспериментальную дисциплину. Наряду с решением теоретических вопросов цитология участвует в разрешении ряда важнейших биологических, медицинских и сельскохозяйственных проблем. В зависимости от объектов и методов исследования развивается ряд разделов цитологии: цитогенетика, кариосистематика, цитоэкология, радиационная цитология, онкологическая цитология, иммуноцитология и т. д.

1.2. Клеточная теория и ее суть

Создателями клеточной теории считают ботаника Маттиаса Шлейдена и зоолога Теодора Шванна.

Профессор Йенского университета М. Шлейден в книге «Данные о развитии растений» привел наглядные доказательства клеточного строения растений и попытался объяснить возникновение самих клеток. Т. Шванн в 1939 г. в книге «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений» обобщил

результаты исследований М. Шлейдена и др., которые легли в основу клеточной теории.

В настоящее время клеточная теория постулирует:

1. Клетка – элементарная единица живого.
2. Клетки разных организмов гомологичны по своему строению.
3. Размножение клеток происходит путем деления исходной клетки.
4. Многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток, объединенные в систему тканей и органов, подчиненные и связанные между собой межклеточными формами регуляции.

1. Клетка как элементарная единица живого.

Различают два типа организации клетки:

1) наиболее простой – у прокариот (бактерии, сине-зеленые водоросли, вирусы). Они представляют собой доядерные клетки, так как не имеют ядерной мембраны. Их наследственное вещество заключено в единственной хромосоме, однако ядерной мембраны, отделяющей хромосому от остальной части клетки, нет;

2) сложный – у эукариот. У них есть ядерная мембрана, отделяющая ядро от остальной части клетки. Обычно имеется две хромосомы и более. Несмотря на эти отличия, клетки прокариот и эукариот имеют много общего. И те и другие одеты плазматической мембраной. У тех и у других синтез белка происходит на рибосомах. Сходны процессы синтеза РНК и репликации ДНК, а также биоэнергетические процессы.

В связи с этим клетке можно дать общее определение. Клетка – это ограниченная активной мембраной, упорядоченная, структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов), участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

2. Гомологичность клеток.

Внутри всех эукариотических клеток имеется ядро, принципиально сходное по строению у разных организмов. Строение и функции внутриклеточных структур также в принципе похожи. Такое сходство определяется гомологичностью общеклеточных функций, связанных с поддержанием самой живой системы (синтез нуклеиновых кислот и белков, биоэнергетика).

3. Клетка от клетки.

Размножение клеток прокариот и эукариот происходит только путем деления исходной клетки, которому предшествует воспроизведение ее генетического материала (редупликация ДНК).

Прокариотические клетки делятся простой перегородкой, без участия каких-либо специальных аппаратов деления. У эукариотических клеток осуществляется митоз (соматические клетки) или мейоз (половые). При этом образуется специальный аппарат клеточного деления – клеточное веретено, с помощью которого равномерно по двум дочерним клеткам распределяются хромосомы.

4. Клетка и организм.

Следует отметить, что клетка представляет собой единицу функционирования в многоклеточном организме. Но клетки объединены в функциональные системы, в ткани и органы, которые находятся во взаимной связи друг с другом. Таким образом, многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток, объединенные в целостные системы тканей и органов, подчиненные и связанные межклеточными формами регуляции.

1.3. Классификация методов исследований

Основной метод, который используют в цитологии, – это метод световой микроскопии. В настоящее время этот метод имеет целый ряд дополнений и модификаций, что значительно расширило круг задач и вопросов, решаемых цитологией. Революционным моментом в развитии современной цитологии было применение электронной микроскопии, открывшей необычайные перспективы. С введением электронной микроскопии практически стирается граница между собственно цитологией и биохимией, они объединяются на уровне макромолекулярного изучения объектов (микротрубочек, мембран, микрофиламентов и т. д.). Однако главным методическим приемом в цитологии остается визуальное наблюдение объекта. Кроме того, в данной науке применяются многочисленные приемы препаративной и аналитической биохимии, методы биофизики.

К методам цитологических исследований относят:

- 1) оптические методы;
- 2) прижизненное изучение клеток;
- 3) цитофизические методы;
- 4) исследование ультраструктуры клеток;
- 5) цито- и гистохимические методы;
- 6) фракционирование клеток.

Оптические методы.

Световая микроскопия. Объекты исследования – препараты, которые можно рассматривать в проходящем свете. Они должны быть до-

статочны прозрачны, тонки и контрастны. Биологические объекты не всегда обладают этими качествами. Для изучения их в биологическом микроскопе необходимо предварительно приготовить соответствующие препараты путем фиксации, обезвоживания, изготовления тонких срезов, окрашивания. Клеточные структуры в таких фиксированных препаратах не всегда соответствуют истинным структурам живой клетки. Их изучение должно сопровождаться изучением живого объекта в темнопольном и фазово-контрастном микроскопах, где контрастность повышается за счет дополнительных устройств к оптической системе.

Предельное разрешение, которое может дать биологический микроскоп при масляной иммерсии, – 1700 \AA (0,17 мкм) в монохроматическом свете и 2500 \AA (0,25 мкм) в белом свете. Дальнейшее увеличение разрешения может идти лишь за счет уменьшения длины волны света.

Темнопольная микроскопия. Метод основан на принципе рассеивания света на границе между фазами с разными показателями преломления. Достигается это в темнопольном или обычном биологическом микроскопе с помощью специального темнопольного конденсора, который пропускает только очень косые краевые лучи источника света. Поскольку краевые лучи имеют сильный наклон, они не попадают в объектив и поле зрения микроскопа оказывается темным, а объект, освещенный рассеянным светом, кажется светлым. На препаратах клеток обычно содержатся структуры разной оптической плотности. На общем темном фоне эти структуры четко видны благодаря их различному свечению, а светятся они потому, что рассеивают попадающие на них лучи света (эффект Тиндаля). В темном поле можно изучать живые объекты. Разрешающая способность такого микроскопа большая (менее 0,2 мкм).

Фазово-контрастная микроскопия. Метод основан на том, что отдельные участки прозрачного препарата отличаются от окружающей среды по показателю преломления. Поэтому проходящий через них свет распространяется с различной скоростью, т. е. испытывает смещение фаз, что выражается в изменении яркости. Частицы с показателем преломления, большим показателя преломления среды, дают темные изображения на светлом фоне, а с показателем, меньшим показателя среды, – изображения более светлые, чем окружающий фон. Фазово-контрастная микроскопия позволяет выявить множество деталей и особенностей живых клеток и срезов тканей. Большое значение имеет этот метод для изучения тканей, культивируемых *in vitro*.

Интерференционная микроскопия. Этот метод близок к методу фазово-контрастной микроскопии и дает возможность получить контрастные изображения неокрашенных прозрачных живых клеток, а также вычислить сухой вес клеток. Интерференционный микроскоп устроен так, что пучок параллельных световых лучей от осветителя разделяется на два потока. Один из них проходит через объект и приобретает изменения в фазе колебания, другой идет, минуя объект. В призмах объектива оба потока вновь соединяются и интерферируют между собой. В результате интерференции будет строиться изображение, на котором участки клетки, обладающие разной толщиной или разной плотностью, будут отличаться друг от друга по степени контрастности. В этом приборе, измеряя сдвиги фаз, можно определить концентрацию и массу сухого вещества в объекте.

Витальное (прижизненное) изучение клеток.

Приготовление препаратов живых клеток. Световой микроскоп позволяет видеть живые клетки. Для кратковременного наблюдения клетки помещают просто в жидкую среду на предметное стекло; если нужно длительное наблюдение за клетками, то используются специальные камеры. В любом из этих случаев клетки изучаются в специально подобранных средах (вода, физиологический раствор, раствор Рингера и др.).

Метод клеточных культур. Культивирование клеток и тканей вне организма (*in vitro*) связано с соблюдением определенных условий: соответствующая питательная среда, определенная температура, определенное количество клеток, стерильность, регулярные пересевы культуры на свежую питательную среду. В настоящее время метод культивирования клеток вне организма широко используется не только для цитологических, но и для селекционных, генетических, вирусологических, биохимических и других исследований.

Методы микрохирургии. Данные методы предполагают оперативное воздействие на клетку. Микрооперации на отдельных клетках мелких размеров стали проводить с начала XX столетия, когда был сконструирован прибор микроманипулятор. С его помощью клетки разрезают, извлекают из них отдельные части, вводят вещества (микроринъекция) и т. д. Микроманипулятор совмещается с обычным микроскопом, в который наблюдают за ходом операции. Микрохирургическими инструментами служат стеклянные крючки, иглы, капилляры, которые имеют микроскопические размеры. Кроме механического воздействия на клетки в микрохирургии в последнее время широко

применяют микропучки ультрафиолетового света или лазерные микропучки. Это дает возможность практически моментально инактивировать отдельные участки живой клетки.

Методы прижизненной окраски. При изучении живых клеток пытаются их окрашивать с помощью так называемых витальных красителей. Это красители кислой (трипановый синий, литиевый кармин) или основной (нейтральный красный, метиленовый синий) природы, применяемые при очень большом разведении (1:200000), следовательно, влияние красителя на жизнедеятельность клетки минимальное. При окрашивании живых клеток краситель собирается в цитоплазме в виде гранул, а в поврежденных или мертвых клетках происходит диффузное окрашивание цитоплазмы и ядра. Время для окрашивания препаратов сильно варьируется, но для большинства витальных красителей оно составляет от 15 до 60 мин.

Цитофизические методы.

Метод поглощения рентгеновских лучей. Метод основан на том, что разные вещества в определенной длине волны по-разному поглощают рентгеновские лучи. Пропуская рентгеновские лучи через препарат ткани, можно по спектру поглощения определить ее химический состав.

Флуоресцентная микроскопия. В основу метода положено свойство некоторых веществ флуоресцировать в ультрафиолетовых лучах. Для этих целей используют ультрафиолетовый микроскоп, в конденсоре которого установлен светофильтр, выделяющий из общего светового пучка синие и ультрафиолетовые лучи. Другой светофильтр, помещенный перед глазами наблюдателя, поглощает эти лучи, пропуская лучи флуоресценции, испускаемые препаратом. Источником света служат ртутные лампы и лампы накаливания, дающие сильное ультрафиолетовое излучение в общем световом пучке. Флуоресцентная микроскопия дает возможность изучать живую клетку. Целый ряд структур и веществ, содержащихся в клетках, обладает собственной (первичной) флуоресценцией (хлорофилл, витамины А, В₁ и В₂, некоторые гормоны и др.). Объекты, не обладающие собственной флуоресценцией, могут быть подкрашены специальными флуоресцирующими красителями – флуорохромами. Тогда они просматриваются в ультрафиолете (вторичная флуоресценция). С помощью этого метода можно видеть форму объекта, распределение флуоресцирующих веществ в объекте, содержание этих веществ.

Метод радиографии. Метод основан на том, что радиоактивные изотопы, будучи введенными в организм, вступают в общий клеточ-

ный обмен и включаются в молекулы соответствующих веществ. Места их локализации определяют по излучению, которое дается изотопами и обнаруживается по засвечиванию фотопластинки при наложении ее на препарат. Препарат изготавливается спустя некоторое время после введения изотопа с учетом времени прохождения определенных стадий метаболизма. Этот метод широко применяется для выяснения локализации мест синтеза биополимеров, для определения путей переноса веществ в клетке, для наблюдения за миграцией или свойствами отдельных клеток.

Методы исследования ультраструктуры.

Поляризационная микроскопия. В основе метода лежит способность различных компонентов клеток и тканей к преломлению поляризованного света. Некоторые клеточные структуры (нити веретена деления, миофибриллы и др.) характеризуются определенной ориентацией молекул и обладают свойством двойного лучепреломления. Это так называемые анизотропные структуры. От обычного биологического микроскопа поляризационный отличается тем, что перед конденсором помещается поляризатор, а за препаратом и объективом расположены компенсатор и анализатор, позволяющие детально исследовать двойное лучепреломление в рассматриваемом объекте. Поляризационный микроскоп дает возможность определить ориентировку частиц в клетках и других структурах, четко видеть структуры с двойным лучепреломлением, а при соответствующей обработке препаратов можно сделать наблюдения над молекулярной организацией той или иной части клетки.

Метод рентгеноструктурного анализа. В основу метода положено свойство рентгеновских лучей испытывать дифракцию при прохождении через кристаллы. На экране или фотопластинке появляется ряд колец, концентрически расположенных пятен и полос. Угол дифракции определяется расстоянием между группами атомов и молекулами в объекте. Чем больше расстояние между структурными единицами, тем меньше угол дифракции, и наоборот. На экране это соответствует расстоянию между темными зонами и центром. Ориентированные частицы дают на диаграмме круги, серпы, точки; неориентированные частицы в аморфных веществах – изображение концентрических колец.

Метод рентгеноструктурного анализа применяется для изучения строения молекул белков, нуклеиновых кислот и других веществ, входящих в состав цитоплазмы и ядра клеток. Он дает возможность определить пространственное расположение молекул, точно измерить расстояние между ними и изучить внутримолекулярную структуру.

Электронная микроскопия. Электронный микроскоп отличается от светового тем, что в нем вместо света используется быстрый поток электронов, а стеклянные линзы заменены электромагнитными полями. Изображение дают электроны, прошедшие через объект и не отклоненные им. В современных электронных микроскопах достигнуто разрешение в 0,1 нм. Под электронным микроскопом просматриваются неживые объекты – препараты. Живые объекты изучать пока не удается, так как объекты помещаются в вакуум, губительный для живых организмов. В вакууме электроны, не рассеиваясь, попадают на объект. Объекты, изучаемые под электронным микроскопом, должны иметь очень малую толщину, не более 400–500 Å (0,04–0,05 мкм), иначе они оказываются непроницаемыми для электронов. Для этих целей применяют ультрамикротомы. Биологические объекты, особенно вирусы, фаги, нуклеиновые кислоты, тонкие мембраны, обладают слабой способностью рассеивать электроны, т. е. низкой контрастностью. Контрастность их увеличивают путем напыления на объект тяжелых металлов (золото, платина, хром), углеродного напыления, с помощью обработки препаратов осмиевой или вольфрамовой кислотами и некоторыми солями тяжелых металлов.

Специальные методы электронной микроскопии биологических объектов. В настоящее время методы электронной микроскопии развиваются и совершенствуются. *Метод замораживания – травления* заключается в том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при той же температуре переносят в специальную вакуумную установку, где он механическим способом скалывается охлажденным ножом. При этом обнажаются внутренние зоны замороженных клеток. В вакууме часть воды, перешедшей в стекловидную форму, возгоняется (травление), а поверхность скола последовательно покрывается тонким слоем испаренного углерода, а затем металла. Таким образом получается пленка-слепок, повторяющая прижизненную структуру материала, которую изучают в электронном микроскопе.

Методы высоковольтной микроскопии. Сконструированы электронные микроскопы с ускоряющим напряжением в 1–3 млн. вольт. При высокой энергии электронов, которые меньше поглощаются объектом, можно рассматривать образцы большей толщины (1–10 мкм). Этот метод перспективен в том, что если при сверхвысокой энергии электронов уменьшается их взаимодействие с объектом, то в принципе это можно использовать при изучении ультраструктуры живых объектов. В настоящее время ведутся работы в данном направлении.

Метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии позволяет изучить трехмерную картину поверхности клетки. При применении этого метода фиксированный и специальным образом высушенный объект покрывается тонким слоем испаренного металла (чаще всего золота), тонкий пучок электронов пробегает по поверхности объекта, отражается от него и попадает в приемное устройство, передающее сигнал на электронно-лучевую трубку. Благодаря огромной глубине фокуса сканирующего микроскопа, которая значительно больше, чем у просвечивающего, получается почти трехмерное изображение исследуемой поверхности.

Цито- и гистохимические методы.

Цито- и гистохимическими методами можно определить содержание и локализацию веществ в клетке с помощью химических реактивов, дающих с выявленным веществом новое вещество специфического цвета. Данные методы аналогичны методам определения веществ в аналитической химии, но реакция происходит непосредственно на препарате ткани, и именно в том месте, где локализовано искомое вещество. Количество конечного продукта цитохимической реакции можно определить с помощью метода цитофотометрии. Основу его составляет определение количества химических веществ по поглощению ими света определенной длины волны. Было выявлено, что интенсивность поглощения лучей пропорциональна концентрации вещества при одной и той же толщине объекта. Следовательно, оценивая степень поглощения света данным веществом, можно узнать его количество. Для такого рода исследований используют микроскопы-цитофотометры, у которых за объективом расположен чувствительный фотометр, регистрирующий интенсивность прошедшего через объектив светового потока. Зная площадь или объем измеряемой структуры и значение поглощения, можно определить как концентрацию данного вещества, так и его абсолютное содержание.

Разработаны приемы количественной флуорометрии, позволяющей по степени свечения определить содержание веществ, с которыми связываются флуорохромы. Так, для выявления специфических белков применяют метод иммунофлуоресценции – иммунохимические реакции с использованием флуоресцирующих антител. Этот метод обладает очень большой специфичностью и чувствительностью. Его можно использовать для выявления не только белков, но и отдельных последовательностей нуклеотидов в ДНК или для определения мест локализации РНК-ДНК-гибридных молекул.

Фракционирование клеток.

Принцип метода состоит в том, что при центрифугировании развивается центробежная сила, под воздействием которой взвешенные частицы оседают на дно центрифужной пробирки в виде отдельных фракций клеточных компонентов, после чего изучают их химию, ультраструктуру и свойства. Прежде чем подвергнуть клетки центрифугированию, их необходимо разрушить – разрушить жесткий каркас клеточных оболочек с помощью ультразвуковой вибрации, продавливания через маленькие отверстия или самого обычного измельчения растительных тканей пестиком в фарфоровой ступке. При осторожном применении методов разрушения можно сохранить некоторые оргanelлы целыми.

Так, в настоящее время в виде чистых фракций получают практически любые клеточные оргanelлы и структуры: ядра, ядрышки, хроматин, ядерные оболочки, плазматическую мембрану, вакуоли, эндоплазматическую сеть (ЭПС), рибосомы, аппарат Гольджи, митохондрии и их мембраны, пластиды, микротрубочки, лизосомы и т. д. Оседание частиц в пробирке после центрифугирования зависит от их размера и плотности (чем больше частица или чем она тяжелее, тем быстрее она оседает на дно пробирки). Полученные фракции, прежде чем их анализировать биохимическими способами, необходимо проверить на чистоту с помощью электронного микроскопа.

2. СТРОЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

2.1. Отличительные особенности растительной клетки, ее строение, размер и форма

Клетка – это наименьшая структурная и функциональная единица живого. Существует два основных типа клеточной организации: прокариотический (доядерный) и эукариотический (ядерный).

Клетки прокариотического типа устроены сравнительно просто. В них нет морфологически обособленного ядра, единственная хромосома образована кольцевидной ДНК и находится в цитоплазме. Мембранные оргanelлы отсутствуют, их функцию выполняют различные впячивания плазматической мембраны, в цитоплазме имеются многочисленные мелкие рибосомы, микротрубочки отсутствуют, поэтому цитоплазма неподвижна, а реснички и жгутики имеют особую структуру. Особенности структуры прокариотических клеток определяют

специфический характер процессов обмена веществ, жизнедеятельности и размножения. К прокариотам относят бактерии и сине-зеленые водоросли, или цианобактерии.

Большинство современных живых организмов (одноклеточные и многоклеточные растения, грибы, животные и человек) относятся к эукариотическому типу.

Однако клетки животных, грибов и растений имеют ряд отличительных признаков (табл. 1).

Таблица 1. Отличительные признаки клеток грибов, растений и животных

| Признак | Грибы | Растения | Животные |
|--------------------|-------------------------------------|--|---|
| Способ питания | Гетеротрофный | Автотрофный | Гетеротрофный |
| Клеточная оболочка | Имеется, основной компонент – хитин | Имеется, основной компонент – целлюлоза | Отсутствует |
| Пластиды | Отсутствуют | Имеются | Отсутствуют |
| Клеточный центр | Имеется | Имеется только у низших растений | Имеется |
| Вакуоли | Развиваются в старых частях мицелия | Крупные, заполнены клеточным соком. Являются осмотическим резервуаром клетки | Сократительные, пищеварительные, выделительные; обычно мелкие |
| Запасной углеводов | Гликоген | Крахмал | Гликоген |
| Синтез АТФ | В митохондриях | В хлоропластах и митохондриях | В митохондриях |
| Центриоли | Бывают редко | Отсутствуют | Имеются |

Растительная клетка обладает чрезвычайно сложной структурной организацией и представляет собой систему, дифференцированную на отдельные органеллы (рис. 1).

В растительной клетке следует различать клеточную оболочку и содержимое. Основные жизненные свойства присущи именно содержимому клетки – протопласту. Кроме того, для взрослой растительной клетки характерно наличие вакуоли – полости, заполненной клеточным соком. Протопласт состоит из ядра, цитоплазмы и включенных в нее крупных органелл, видимых в световой микроскоп: пластид, митохондрий. В свою очередь, цитоплазма представляет собой сложную систему с многочисленными мембранными структурами (аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, лизосомы) и немембранными структурами (микротрубочки, рибосомы и др.). Все указанные органеллы погружены в матрикс цитоплазмы – гиалоплазму. Каждая из органелл имеет свою структуру и ультраструктуру.

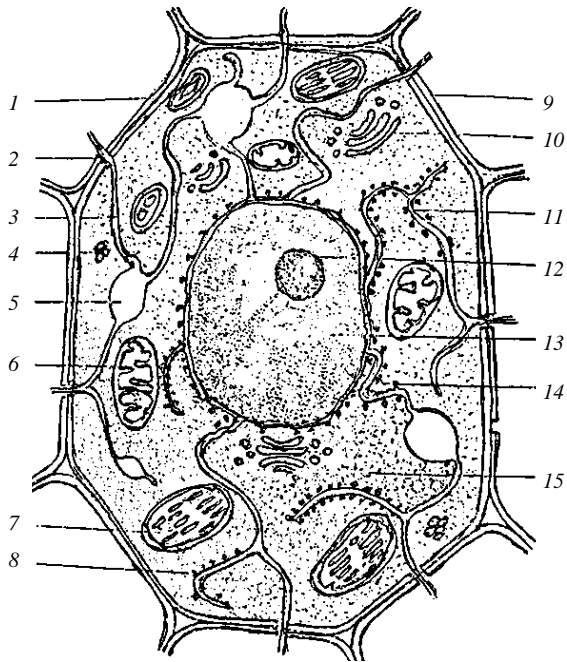


Рис. 1. Строение растительной клетки:

- 1 – алейроновое зерно с кристаллом белка; 2 – пора в клеточной оболочке; 3 – амилопласт с крахмальным зерном; 4 – капельки жира; 5 – вакуоль; 6 – митохондрии; 7 – хлоропласты; 8 – рибосомы; 9 – оболочка клетки; 10 – аппарат Гольджи; 11 – эндоплазматическая сеть; 12 – ядрышко; 13 – ядро; 14 – ядерная оболочка; 15 – основа цитоплазмы (матрике)

Под ультраструктурой понимается расположение в пространстве отдельных молекул, составляющих данную органеллу. Даже с помощью электронного микроскопа далеко не всегда можно увидеть ультраструктуру более мелких органелл (рибосом). По мере развития науки открываются все новые структурные образования, находящиеся в цитоплазме, и в этой связи современные представления о ней ни в коей мере не являются окончательными.

Форма растительных клеток разнообразна и зависит в основном от их местоположения и выполняемой функции. Свободные клетки

обычно шаровидные, овальные, яйцевидные, в тканях имеют многогранную форму. В основном клетки делятся на паренхимные (длина, ширина и высота приблизительно одинаковы) и прозенхимные (вытянутые в длину, часто имеющие заостренные концы).

Корневые волоски. Это тонкие волоски, своей огромной поверхностью всасывающие воду из почвы и расположенные на поверхности корня недалеко от его кончика.

Жгучие клетки. Эти клетки, втыкаясь в нашу кожу и ломаясь там, выливают из вакуоли, как из шприца, капельку кислоты. Результат известен каждому, кто имел дело с крапивой.

Одноклеточные. Клетки одноклеточных водорослей, выполняющие множество функций одновременно – от питания до размножения. Многие даже движутся с помощью подвижного жгутика.

Запасающие клетки. Клетки, несущие запасы воды, чаще всего встречаются в стеблях или листьях растений из засушливых мест (кактус, алоэ). Запас воды в клетках хранится в вакуолях.

Сосуды. От корня вверх вода поднимается по мертвым трубковидным клеткам сосудов. От этих клеток осталась только клеточная стенка.

Каменистые клетки. Там, где нужна особая прочность, стенка клетки может быть очень толстой. Так выглядят клетки скорлупы ореха.

Устьища. Клетки устьиц способны двигаться, регулируя доступ воздуха к внутренним полостям листа.

Клетки луба. От листьев вниз вода с растворенными в ней органическими веществами движется по живым клеткам луба, представляющим собой ситовидные трубки.

Пробка. Клетки пробки мертвы и пропитаны веществами, не пропускающими воду и воздух. Они являются отличной защитой.

Размер клеток варьируется от тысячных долей миллиметра (бактерии) до нескольких сантиметров (харовые водоросли). У покрытосеменных – 0,015–0,660 мм, лубяных волокон льна – 20–40 мм, крапивы – 60 мм и др.

2.2. Клеточная оболочка, ее строение, состав, функции

Клеточная оболочка растительной клетки плотно прилегает к плазмалемме. Строение, химический состав и свойства оболочек изменяются на разных этапах развития клетки, т. е. они не являются стабильными, неизменными.

Оболочки клеток низших растений развиты гораздо слабее, чем высших, их генеративные клетки лишены твердых оболочек.

У высших растений клеточные оболочки возникают после деления зиготы, формирующейся от слияния мелких мембранных пузырьков (вакуолей) в экваториальной плоскости клетки. Вновь образовавшаяся оболочка молодой клетки представляет собой тонкую (0,5–1,0 мкм) эластичную мембрану, способную легко растягиваться. Оболочка зрелых дифференцированных клеток состоит из трех слоев: средний слой – межклеточное вещество (срединная пластинка), первый и третий слои – первичные оболочки двух соседних клеток, склеенные прослойкой из межклеточного вещества.

Первичная оболочка состоит из полисахаридов – пектина и целлюлозы. Первичные клеточные стенки соседних клеток соединены пектиновой срединной пластинкой. В клеточной стенке линейные, очень длинные (несколько микрометров) молекулы целлюлозы, состоящие из глюкозы, собраны в пучки – мицеллы, которые, в свою очередь, объединяются в фибриллы – тончайшие (1,5–4,0 нм) волокна определенной длины. Целлюлоза образует многомерный каркас, который погружен в аморфный матрикс из нецеллюлозных углеводов: пектинов, гемицеллюлоз и др. Целлюлоза обуславливает прочность клеточной стенки. Микрофибриллы эластичны и по прочности на разрыв сходны со сталью. Полисахариды матрикса определяют такие свойства стенки, как высокая проницаемость для воды, растворенных мелких молекул и ионов, сильная набухаемость. Благодаря матриксу по стенкам, примыкающим друг к другу, могут передвигаться вода и вещества от клетки к клетке (путь через апопласт по «свободному пространству»). Некоторые гемицеллюлозы могут откладываться в стенках клеток семян в качестве запасных веществ.

При образовании первичной клеточной стенки в ней выделяются более тонкие участки, где фибриллы целлюлозы лежат более рыхло. Канальцы эндоплазматической сети проходят здесь через клеточные стенки, соединяя соседние клетки.

Вторичные оболочки возникают у клеток дифференцированных тканей в результате отложения на их поверхности различных веществ. Связь между цитоплазмами соприкасающихся клеток осуществляется с помощью плазмодесменных канальцев, проходящих по тонким участкам первичной клеточной оболочки, так называемым поровым полям.

Через поровые поля проходят цитоплазматические тяжи – плазмодесмы, представленные многочисленными нитями цитоплазмы (рис. 2).

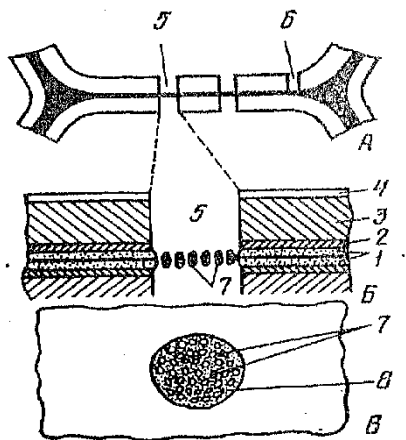


Рис. 2. Схема строения клеточной оболочки растений: *A* – общий вид; *Б* – часть оболочки при большом увеличении; *В* – вид сверху; 1 – срединная пластинка; 2–4 – соответственно внешний, средний и внутренний слои вторичной оболочки; 5 – пора; 6 – слепая пора; 7 – плазмодесменные каналцы; 8 – поровое поле

Оболочки растительных клеток выполняют следующие функции:

- 1) механическую – служат прочной опорой растениям, создавая как бы их скелет;
- 2) защитную – предохраняют растения от излишнего испарения воды, от проникновения инфекции;
- 3) противостоят тургорному давлению клетки;
- 4) ограничивает и в известной мере регулирует как рост, так и форму клеток ориентация целлюлозных микрофибрилл, поскольку от их расположения зависит способность клеток к растяжению.

Видоизменения клеточной оболочки:

1. Одревеснение – пропитывание клеточной стенки лигнином, что повышает ее твердость, плотность и снижает пластичность и способность к росту.

2. Опробковение – наслаивание на клеточную стенку суберина. Опробковевшие клетки непроницаемы для воды и растворенных в ней веществ, они отмирают и превращаются в защитный слой.

3. Кутинизация – процесс откладывания на наружную поверхность

клеточной стенки кутина. Характерна для покровных и защитных тканей.

4. Ослизнение – превращение клетчатки или крахмала в более высокомолекулярные углеводы – слизи, камеди. Характерно для покровных тканей семян, некоторых водных растений.

5. Минерализация – отложение кремнезема и солей кальция в толще стенок, на поверхности или в особых выростах оболочки. Богаты кремнеземом клетки кожицы стеблей и листьев хвощей, злаков, осок. Окремнению подвергаются жгучие волоски у крапивы двудольной.

2.3. Цитоплазма и органоиды клетки, их строение и функции

Цитоплазма – сложная, многокомпонентная, пластичная, дифференцированная система, включающая ряд мембранных и немембранных структур, т. е. цитоплазма – это содержимое клетки, за исключением ядра и оболочки. В цитоплазме протекают основные процессы метаболизма. Основу ее составляет матрикс, или гиалоплазма, – сложная, бесцветная, оптически прозрачная коллоидная система, способная к обратимым переходам из золя в гель. Важнейшая роль гиалоплазмы заключается в объединении всех клеточных структур в единую систему и обеспечении взаимодействия между ними в процессах клеточного метаболизма. Гиалоплазма включает сложную сеть белков (цитоскелет), состоящую из микрофиламентов и микротрубочек. Цитоскелет играет важную роль в процессах митоза, мейоза, внутриклеточного движения цитоплазмы, образования клеточных стенок, в транспорте воды и др.

Микрофиламенты представляют собой длинные тонкие белковые нити диаметром 5–7 нм из актина (глобулярный белок), которые, переплетаясь друг с другом, формируют общую сеть – цитоскелет. Цитоскелет удерживает все органоиды вместе, благодаря чему они могут сообщаться между собой и через них проходят вещества и молекулы, т. е. осуществляется метаболизм. Вся эта структура очень динамичная, лабильная, способная быстро перестраиваться, видоизменяться, распадаться и формироваться вновь. Это определяет такие свойства цитоплазматического матрикса, как изменения вязкости, подвижность, переход из состояния геля в золь и обратно.

Микротрубочки – полые цилиндрические органеллы диаметром 20–25 нм, достигающие в длину нескольких микрометров (рис. 3). Стенки микротрубочек толщиной 5–8 нм, состоят из цепочек глобулярного белка тубулина, свернутых спирально. Микротрубочки могут

разрушаться и снова возникать. С микротрубочками связано движение цитоплазмы, участие в перемещении органелл и построении клеточных стенок.

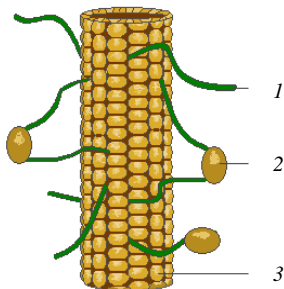


Рис. 3. Строение микротрубочки:
1 – белки; 2 – перемещаемые частицы;
3 – тубулиновые субъединицы

Ядро – обязательная и существеннейшая часть живой клетки всех *эукариотических* организмов. Ядро впервые было исследовано Робертом Броуном в 1831 г. Так им были названы шаровидные образования в клетках растений семейства Орхидные.

Размеры ядра различны: от 2–3 до 500 мкм (у половых клеток). Форма его чаще шаровидная или эллипсоидальная. В молодых клетках оно занимает центральное положение, но позднее обычно смещается к оболочке, оттесняемое растущей вакуолью.

Ядро окружено двухслойной мембраной с порами, которая отграничивает его от цитоплазмы (рис. 4).

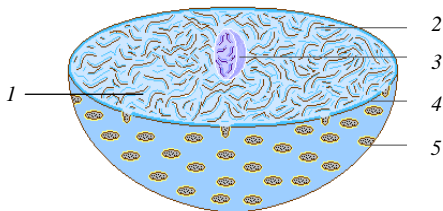


Рис. 4. Строение ядра клетки: 1 – кариоплазма;
2 – хроматин; 3 – ядрышко; 4 – оболочка ядра;
5 – ядерная пора

Внутреннее содержимое ядра составляет кариоплазма (ядерный сок), заполняющая пространство между его структурами. В ядре находится одно или несколько ядрышек сферической или неправильной формы. Ядрышко содержит преимущественно РНК и специфические белки. Важнейшая его функция заключается в том, что в нем происходит формирование рибосом, которые осуществляют синтез белков в клетке, а также хромосом – плотных удлинённых или нитевидных образований, видимых только при делении клетки. Хромосомы содержат молекулы ДНК, соединённые со специфическими белками – гистонами, в которых заключена наследственная информация, передающаяся из поколения в поколение.

Чтобы понять роль ядра и цитоплазмы для жизни клетки был проделан опыт с одноклеточной водорослью ацетабулярией (*Acetabularia mediterranea*). Эта водоросль по форме похожа на гриб. Её единственная гигантская клетка состоит из шляпки и ножки длиной 4–6 см. Шляпка содержит только цитоплазму, а ядро находится в нижней части ножки. Шляпка при отделении её от ножки, в которой осталось ядро, вскоре погибала, а ножка, имея ядро и хромосомы, продолжала жить и образовывала новую шляпку. Таким образом, часть одноклеточного растения, имевшая ядро, обладала способностью регенерировать, т. е. восстанавливать удалённую часть, а безъядерная часть клетки погибала.

В опытах Б. Л. Астаурова у тутового шелкопряда убивали ядро яйцеклетки высокой температурой, а затем производили «оплодотворение». Два сперматозоида, проникшие в яйцеклетку с убитым ядром, сливались между собой, давая начало особям с исключительно отцовскими признаками (так как информация внесена только ядрами сперматозоидов).

Ведущая роль ядра в жизни клетки и явлениях наследственности была показана в опытах американских эмбриологов Р. Бриггса и Т. Кинга. Они пересадили клеточное ядро, взятое из клетки кишечника головастика, в икринку, из которой предварительно удалили её собственное ядро. В результате такой трансплантации ядер из клеток дифференцированной ткани в женские половые клетки развивались нормальные головастики, а затем лягушки. Эти эксперименты ещё раз показали, что в ядре любой клетки тела организма заложена вся программа его развития. Не цитоплазма икринки, а пересаженное в неё ядро несло программу и функции управления развитием будущей особи.

После доказательства роли ядра в передаче наследственных признаков была сформулирована ядерная теория. В дальнейшем была разработана хромосомная теория наследственности, доказывающая, что наследственные факторы локализованы в хромосомах.

Наряду с ядерной (хромосомной) наследственностью существует цитоплазматическая (нехромосомная) наследственность, обусловленная наличием генов у органоидов (митохондрий, хлоропластов и некоторых других), находящихся в цитоплазме клетки и способных независимо от клеточного ядра синтезировать необходимые им белки.

Эндоплазматическая сеть, или эндоплазматический ретикулум, – это разветвленная сеть каналов, трубочек, пузырьков, цистерн, расположенных внутри цитоплазмы (рис. 5).

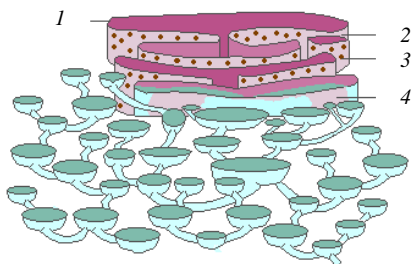


Рис. 5. Строение эндоплазматической сети:
1 – мембрана; 2 – гранулярная ЭПС;
3 – рибосомы; 4 – гладкая ЭПС

Была открыта в 1945 г. английским ученым К. Портером. Представляет собой систему мембран, имеющих ультрамикроскопическое строение.

Вся сеть объединена в единое целое с наружной клеточной мембраной ядерной оболочки. Различают ЭПС гладкую и шероховатую, несущую на себе рибосомы. На мембранах гладкой ЭПС находятся ферментные системы, участвующие в жировом и углеводном обмене. Данный тип мембран преобладает в клетках семян, богатых запасными веществами (белками, углеводами, маслами). Рибосомы прикрепляются к мембране гранулярной ЭПС, и во время синтеза белковой молекулы полипептидная цепочка с рибосомами погружается в канал ЭПС. Функции эндоплазматической сети очень разнообразны: транспорт веществ внутри клетки и между соседними клетками; разделение клет-

ки на отдельные секции, в которых одновременно проходят различные физиологические процессы и химические реакции.

Аппарат Гольджи впервые был выделен в 1896 г. итальянским ученым Камилло Гольджи и представляет собой многоярусную систему плоских мембранных мешочков (цистерн), которые по периферии утолщаются и образуют пузырьчатые отростки.

В растительных клетках обнаруживается ряд отдельных стопок (диктиосом). Диктиосомы у высших растений состоят из 4–8 цистерн, собранных вместе (рис. 6).

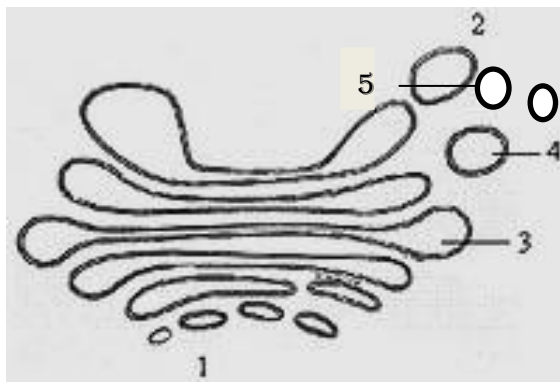


Рис. 6. Схема строения аппарата Гольджи:
1 – формирующий полюс; 2 – секреторный полюс;
3 – цистерны; 4 – пузырьки; 5 – лизосомы

В зоне диктиосом различают формообразующий и секреторный участки.

Функции аппарата Гольджи:

1) участие в секреторных процессах клетки – образование и выделение особых продуктов (секретов), необходимых для жизнедеятельности организма: секретируемые белки собираются в пузырьки, отшнуровываются от цистерн и в конечном счете сливаются с оболочкой (плазматической мембраной), выбрасывая свое содержимое из клетки наружу;

2) накопление углеводов;

3) регуляция содержания воды в клетке;

4) синтез полисахаридов у растений;

5) выделение слизей и твердых веществ;

б) транслокация – перенос материалов, из которых состоит клеточная стенка;

7) образование клеточной стенки в растительной клетке после деления митозом (фрагмопласта). Пузырьки, происходящие из комплекса Гольджи, сливаются друг с другом, образуя фрагмопласт, плазматическую мембрану.

Лизосомы впервые были описаны в 1955 г. бельгийским биохимиком Кристианом де Дювом. Представляют собой мелкие пузырьки, ограниченные мембраной (рис. 7).

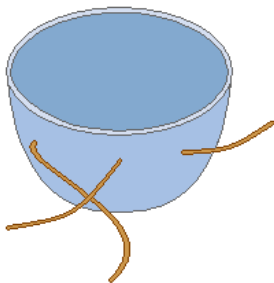


Рис. 7. Строение лизосомы

Лизосомы образуются из тяжелой эндоплазматической сети путем отщуривания мельчайших пузырьков. Для лизосом характерна кислая реакция внутренней среды (рН от 1,5 до 4,0–4,5).

Функции лизосом:

- 1) осуществление процесса внутриклеточного пищеварения;
- 2) выведение чужеродных тел или структурных элементов клетки, которые ей больше не нужны.

Рибосомы (от «рибонуклеиновая кислота» и греч. «сома» – тело) – немембранные клеточные органоиды, осуществляющие синтез белка. Присутствуют в клетках всех организмов. Рибосома представляет собой сферическую частицу диаметром около 20 нм, состоящую из двух субчастиц, которые могут разъединяться и вновь объединяться (рис. 8). Структурный каркас рибосомы образован молекулами рибосомальной РНК и связанными с ними белками.

Рибосомы синтезируются в ядре, затем покидают его, переходя в цитоплазму, где прикрепляются к наружной поверхности мембран эндоплазматической сети или располагаются свободно. В зависимости

от типа синтезируемого белка рибосомы могут функционировать по одиночке или объединяться в комплексы – полирибосомы.

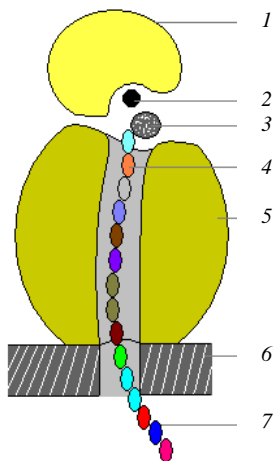


Рис. 8. Схема строения рибосомы:
1 – малая субъединица; 2 – и-РНК;
3 – т-РНК; 4 – аминокислота; 5 – большая субъединица; 6 – мембрана ЭПС;
7 – синтезируемая полипептидная цепь

Сферосомы обнаружены только у растений в 1880 г. Ганштейном и представляют собой одномембранные органеллы растительных клеток. Они образуются из элементов эндоплазматической сети. Функция сферосом – накопление липидов.

Пероксисомы и глиоксисомы – округлые органеллы (микротела) диаметром 0,2–1,5 мкм, ограниченные элементарной мембраной и содержащие гранулярный матрикс умеренной электронной плотности. В некоторых микротелах обнаруживается белковый кристаллоид, состоящий из трубочек диаметром около 6 нм. Количество микротел в клетке близко к числу митохондрий. Пероксисомы и глиоксисомы в клетках растений выполняют различные физиологические функции.

Пероксисомы многочисленны в клетках листьев, где они тесно связаны с хлоропластами. В них окисляется синтезируемая в хлоропластах в ходе фотосинтеза гликолевая кислота и образуется аминокисло-

та глицин, которая в митохондриях превращается в серин. В листьях высших растений пероксисомы участвуют в фотодыхании.

Глиоксисомы появляются при прорастании семян, в которых запасаются жиры, и содержат ферменты, необходимые для превращения жирных кислот в сахара: системы β -окисления жирных кислот и глиоксилатный цикл. При работе ферментных систем пероксисом и глиоксисом образуется пероксид водорода, который разрушается содержащейся в этих органоидах каталазой.

Вакуоль – важнейшая составная часть растительных клеток. Она заполнена клеточным соком (водный раствор минеральных солей, аминокислот, органических кислот, пигментов, углеводов) и окружена белково-липидной мембраной – тонопластом (рис. 9).

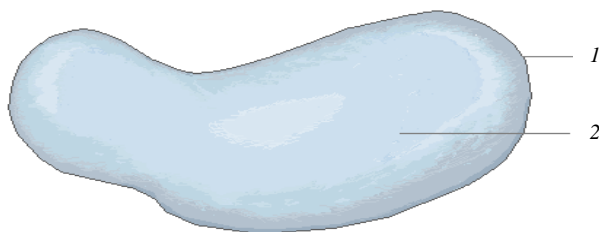


Рис. 9. Строение вакуоли:
1 – тонопласт; 2 – клеточный сок

Развитие вакуолей осуществляется с помощью эндоплазматической сети. Сначала они имеют маленькие размеры, но с развитием клетки отдельные вакуоли сливаются, оттесняя к периферии прослойки цитоплазмы, в результате чего в сформированной клетке находится обычно одна большая вакуоль, а цитоплазма со всеми органеллами располагается около оболочки.

Вакуоль играет большую роль в поддержании тургорного давления клетки за счет концентрации клеточного сока, а также участвует в процессах экскреции (через тонопласт осуществляется активный транспорт различных молекул, поэтому вакуоли могут использоваться клетками для выброса метаболитов). В вакуолях происходит накопление запасных веществ (сахаров, белков и др.).

Пластиды были открыты в 1676 г. Антони Левенгуком, более детальное описание им дал А. Шимпер в 1882 г. Эти органеллы характерны для растительных клеток. Размер пластид варьируется от 3 до

10 мкм. В зависимости от окраски различают следующие виды пластид: хлоропласты (зеленые), лейкопласты (бесцветные) и хромопласты (красные, бурые, оранжевые). Пластиды могут превращаться из бесцветных в окрашенные, из зеленых в бурые.

Хлоропласты – наиболее распространенные и наиболее функционально важные пластиды фотоавтотрофных организмов, которые осуществляют фотосинтетические процессы, приводящие в конечном итоге к образованию органических веществ и выделению свободного кислорода. Хлоропласты высших растений имеют сложное внутреннее строение (рис. 10).

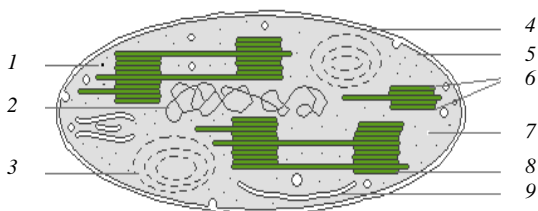


Рис. 10. Схема строения хлоропласта: 1 – рибосома; 2 – ДНК; 3 – крахмальное зерно; 4 – внешняя мембрана; 5 – внутренняя мембрана; 6 – граны; 7 – матрикс (stroma); 8 – тилакоид граны; 9 – тилакоид стромы (ламеллы)

Хлоропласты способны передвигаться в соответствии с движением цитоплазмы, также под воздействием освещения наблюдается активное передвижение их к источнику света.

Хлоропласты имеют различную форму: сферическую, яйцевидную, гантелевидную и др. Окраску им придают зеленые пигменты – хлорофиллы, благодаря которым зеленые растения способны использовать световую энергию.

Лейкопласты – бесцветные пластиды, содержащиеся в клетках неокрашенных частей растений – корнях, клубнях, клетках эмбриональных тканей и др. Отличаются от хлоропластов тем, что у них отсутствует развитая тилакоидная система (рис. 11), но лейкопласты способны к ее образованию и к приобретению зеленой окраски под влиянием света.

Форма лейкопластов однообразна, она близка к сферической.

Типы лейкопластов:

1) амилопласты (накапливающие крахмал);

- 2) олеопласты (накапливающие масла);
- 3) протеинопласты (накапливающие белок).

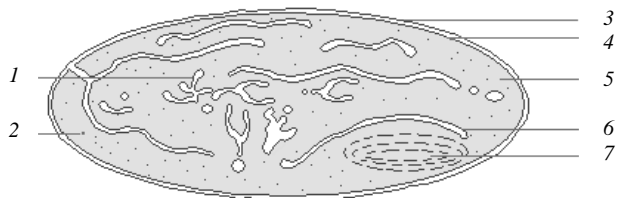


Рис. 11. Схема строения лейкопласта:
 1 – ДНК; 2 – рибосома; 3 – внешняя мембрана;
 4 – внутренняя мембрана; 5 – матрикс (stroma);
 6 – тилакоид стромы (ламеллы); 7 – крахмальное зерно

Хромопласты возникают в результате накопления пигментов из числа каротиноидов. Образуются из хлоропластов, значительно реже – из лейкопластов (например, в корне моркови). В процессе роста и развития отдельные органы растений (лепестки, листья, плоды) меняют свой цвет, что связано с уменьшением числа мембран в пластиде, исчезновением хлорофилла и крахмала. Строение хромопласта схожее с остальными пластидами (рис. 12).

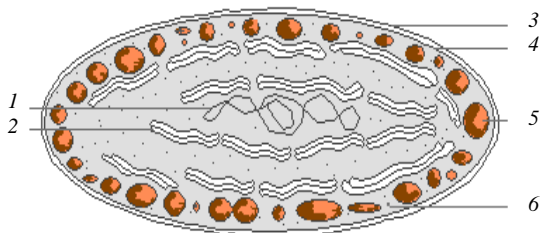


Рис. 12. Схема строения хромопласта:
 1 – ДНК; 2 – разрушающиеся мембранные структуры;
 3 – внешняя мембрана; 4 – внутренняя мембрана;
 5 – каротиноид; 6 – рибосома

Главная функция хромопластов заключается в том, что яркая окраска привлекает насекомых для опыления растений и животных, которые, поедая плоды, распространяют семена.

Митохондрии впервые описали В. Флемминг в 1882 г. и Р. Альтман в 1894 г. на животных клетках и Ф. Мевес в 1904 г. на растительных клетках. Эти органоиды имеют различную форму: палочковидную, округлую, овальную, нитевидную, в виде зернышек, нитей. Внутреннее строение митохондрий было изучено с помощью электронного микроскопа (рис. 13).

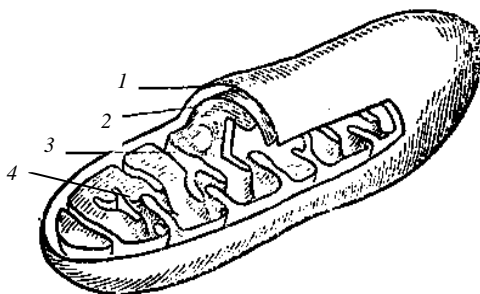


Рис. 13. Схема строения митохондрии:
1 – наружная мембрана; 2 – внутренняя мембрана;
3 – криста; 4 – матрикс митохондрии

Митохондрии имеют две мембраны. Внешняя мембрана гладкая, а внутренняя образует различной формы выросты – трубочки в растительных клетках. Пространство внутри митохондрии заполнено полужидким содержимым (матриксом), куда входят ферменты, белки, липиды, соли кальция и магния, витамины, а также РНК, ДНК и рибосомы. Ферментативный комплекс митохондрий ускоряет работу сложного и взаимосвязанного механизма биохимических реакций, в результате которых образуется АТФ. В этих органеллах осуществляется обеспечение клеток энергией – преобразование энергии химических связей питательных веществ в макроэргические связи АТФ в процессе клеточного дыхания. Именно в митохондриях происходит ферментативное расщепление углеводов, жирных кислот, аминокислот с освобождением энергии и последующим превращением ее в энергию АТФ. Накопленная энергия расходуется на ростовые процессы, на новые синтезы и т. д. Митохондрии размножаются делением и живут около 10 дней, после чего подвергаются разрушению.

2.4. Хромосомы

Хромосомы – это самовоспроизводящиеся органоиды клеточного ядра, которые являются носителями генов и определяют наследственные свойства клеток и организмов. Хромосомы впервые были открыты русским цитологом И. Д. Чистяковым в 1872 г. в виде заметных внутриядерных структур, фигурирующих в процессе деления растительных клеток.

Впоследствии в 1888 г. немецкий ученый В. Вальдейер наблюдал хромосомы во время изучения деления клетки, когда в ядре были видны в световой микроскоп хорошо окрашивающиеся основными красителями небольшие тельца, которые он назвал хромосомами (от греч. *chroma* – цвет и *soma* – тело).

А. Вейсман предположил, что наследственность сосредоточена в хромосомах, а доказали это Т. Х. Морган, К. Бриджес, Г. Меллер и А. Стертевант, завершившие к середине 1930-х гг. разработку хромосомной теории наследственности.

Морфологию хромосом можно изучить во время митоза методом микроскопии, когда хромосомы максимально спирализованы (метафаза и начало анафазы). В этот период хромосомы животной и растительной клетки представляют собой палочковидные структуры разной длины и диаметра. Различают зону первичной перетяжки, которая делит хромосому на два плеча (рис. 14).

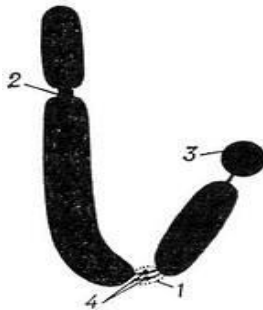


Рис. 14. Схема строения хромосомы:
1 – нить веретена; 2 – вторичная перетяжка;
3 – спутник; 4 – центромера (первичная перетяжка)

В области первичной перетяжки расположена центромера (кинетохор). Это пластинчатая структура, имеющая форму диска. Она связана тонкими фибриллами с телом хромосомы в области перетяжки. Кинетохор является одним из центров полимеризации тубулинов, от него отрастают пучки микротрубочек митотического веретена, идущие в направлении к центриолям. Эти пучки микротрубочек принимают участие в движении хромосом к полюсам клетки при митозе. Некоторые хромосомы имеют вторичную перетяжку, расположенную вблизи их дистального конца и отделяющую маленький участок – спутник. Размеры и форма спутника постоянны для каждой хромосомы, как и размер и протяженность вторичных перетяжек. Вторичные перетяжки связаны с образованием ядрышка (ядрышковые организаторы).

Плечи хромосом оканчиваются конечными участками – теломерами. Теломерные концы хромосом не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами, в отличие от концов хромосом, лишенных теломерных участков (в результате разрывов), которые могут присоединяться к таким же разорванным концам других хромосом.

По расположению первичной перетяжки (центромеры) выделяют следующие типы хромосом:

1) метацентрическая – центромера расположена посередине, плечи равной или почти равной длины, в метафазе приобретает V-образную форму;

2) субметацентрическая – первичная перетяжка слегка сдвинута к одному из полюсов, одно плечо немного длиннее другого, в метафазе имеет L-образную форму;

3) акроцентрическая – центромера сильно сдвинута к одному из полюсов, одно плечо гораздо длиннее другого, в метафазе не перегибается и имеет палочковидную форму;

4) телоцентрическая – центромера располагается на конце хромосомы, но такие хромосомы в природе не обнаружены.

Кроме обычных хромосом в некоторых клетках обнаружены гигантские хромосомы, образующиеся в результате эндомитоза. Имеется и другая группа хромосом – хромосомы типа ламповых щеток, они имеют центральную ось и боковые выросты.

Размеры хромосом у разных организмов могут колебаться от 0,2 до 50 мкм. Самые мелкие хромосомы обнаруживаются у некоторых простейших, грибов, водорослей, очень мелкие – у льна и морского камыша. Наиболее длинные хромосомы обнаружены у некоторых прямокрылых насекомых, у амфибий и у лилейных. Длина хромосом челове-

ка находится в пределах 1,5–10,0 мкм. Толщина хромосом варьируется от 0,2 до 2,0 мкм.

В интерфазном ядре различные участки хромосом неоднородно окрашиваются основными красителями. Наиболее интенсивно окрашивающиеся участки называются гетерохроматиновыми, слабо окрашивающиеся – эухроматиновыми.

Гетехроматиновые участки в интерфазе не деспирализуются и сохраняются в виде хромоцентров. Локализация их в различных хромосомах неодинакова. Эухроматиновые участки хромосом во время интерфазы находятся в деспирализованном состоянии и вновь спирализуются в профазе следующего деления. Эти участки содержат основной комплекс генов, поэтому их считают активной зоной хромосом.

Молекулярное строение ДНК гетерохроматиновых участков хромосом более лабильно по сравнению со строением ДНК эухроматиновых участков. Гетерохроматиновые участки не содержат генов, контролирующих развитие признаков организмов, а оказывают лишь количественное их проявление. Так как эти участки в генетическом отношении инертны, то их потеря не отражается на функционировании клетки. При воздействии различными химическими реактивами хромосомы разрываются именно в этих местах.

Хромосомы в составе интерфазного ядра находятся в деконденсированном состоянии (не уплотненные). В составе хромосом обнаружены ДНК, РНК, гистоны (основные белки), кислые белки, липиды. Из минеральных соединений выделены ионы кальция и магния. Рибонуклеиновая кислота и кислые белки представляют собой продукты функциональной активности хромосом и не играют существенной роли в их организации. Основную массу хромосомы (около 90 %) составляет гигантская фибрилла ДНП (дезоксирибонуклеопротеид).

Минеральные компоненты (ионы кальция и магния) придают хромосомам пластичность, и их удаление делает хромосомы очень хрупкими.

В ядре эукариотической клетки ДНК упакована в хроматин. Это характерная особенность организации генома эукариот. Линейные размеры ДНК значительно превышают диаметр клетки. При упаковке ДНК в клеточном ядре происходит многократное сокращение ее линейных размеров – компактизация (рис. 15).

Выделяют следующие уровни компактизации:

1. Нуклеосомный. Нуклеосома – дисковидная частица, которая образуется в результате скопления белка гистона. Каждая нуклеосома

содержит примерно 200 нуклеотидных пар ДНК, связанной с октамерной частицей, состоящей из белков-гистонов – по две копии H2A, H2B, H3 и H4. Белки-гистоны H3 и H4 богаты аргинином, H2A и H2B – лизином. Это сердцевинные гистоны. Молекула гистона H1 является мономером и расположена снаружи нуклеосомы, так как ее удаление не влияет на структуру частицы.

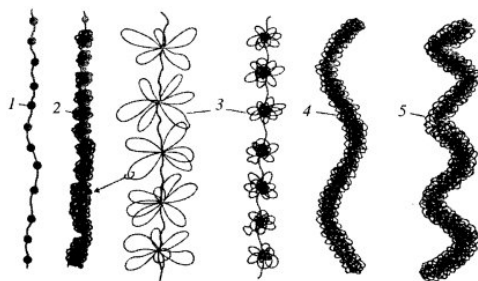


Рис. 15. Схема различных уровней компактизации:
 1 – нуклеосома; 2 – нуклеомер «сверхбусина»;
 3 – хромомер; 4 – хромонема; 5 – хромосома

Молекула ДНК образует два неполных витка вокруг октамера. Период такой организации ДНК составляет примерно 200 нуклеотидных пар ДНК. Участок ДНК между двумя нуклеосомами называется линкером, т. е. ДНК длиной 146 нуклеотидных пар обматывается вокруг октамера, еще около 50 нуклеотидных пар приходится на линкер. Длина хромосомы сокращается за счет этого уровня в 6,2 раза.

2. Нуклеомерный («сверхбусина»). Это фибрилла, состоящая из нуклеомеров (сближенных нуклеосом) и одиночных нуклеосом. Характер упаковки нуклеосом в составе фибриллы хроматина диаметром 30 нм может быть различен: по типу соленоида (спиральный тип укладки) или по нуклеомерному типу (4–12 нуклеосом образуют глобулу). Нуклеомерная укладка хроматина содействует укорочению нити ДНК приблизительно в 6 раз, а оба уровня приводят к компактизации ДНК в среднем в 50 раз (42–60).

3. Хромомерный или петлевой. Образуются петли фибрилл ДНП, объединенных скрепками из негистоновых фибрилл.

4. Хромонемный. Петли укладываются в стопки (хромонемы).

5. Хромосомный. Хромонемы сближаются, получают плотные образования, хорошо видимые в световой микроскоп, – хромосомы.

В хромосомах линейным порядком расположены гены. В гомологичных хромосомах каждый ген представлен дважды – по одному в каждой хромосоме в одном и том же ее участке (локусе).

Ген – это участок молекулы ДНК, содержащий информацию о строении РНК или полипептида.

Связь между генами, находящимися в хромосомах, и проявлением признаков можно представить следующим образом: хромосома → ДНК → РНК → белок → признак.

При классификации генов их подразделяют на ядерные и цитоплазматические (плазмогены), которые, в свою очередь, делятся на митохондриальные и пластидные. По расположению в хромосомах гены подразделяют на *аллельные* и *неаллельные*. Аллельные гены расположены в одинаковых (гомологичных) хромосомах, неаллельные – в разных (негомологичных) хромосомах или в гомологичных хромосомах, занимающих различное местоположение. По силе проявления они могут быть доминантными и рецессивными. Доминантные гены (А) проявляются в первом поколении гибридов (F_1) и обеспечивают единообразие первого поколения, рецессивные гены (а) в F_1 находятся в скрытом состоянии и проявляются во втором поколении гибридов (F_2) при расщеплении, согласно второму закону генетики, в определенном соотношении.

Гены могут быть в *гомозиготном состоянии* (АА, аа), когда в аллельной паре находятся одинаковые гены или в *гетерозиготном состоянии* (Аа), когда в аллельной паре находятся доминантные и рецессивные гены.

Свойства и особенности гена заключаются в том, что он действует в системе целостного генотипа на протяжении всей жизни, оказывает влияние на развитие признаков, сохраняет и передает генетическую информацию из поколения в поколение, может изменяться (мутировать).

2.5. Типы деления соматических и половых клеток

В природе существуют следующие типы деления клеток:

- митоз – не прямое деление соматических клеток тела ($2n$);
- амитоз – прямое деление путем перетяжек клеток запасующих и специализированных тканей;
- мейоз – редукционное деление клеток при образовании половых гамет (n);

– эндомитоз – внутриядерное деление с удвоением числа хромосом ($4n$).

В 1874 г. профессор Московского университета И. Д. Чистяков опубликовал работу о сложном, «непрямом», делении клеточного ядра у растений. В 1875 г. это же явление было описано немецким ботаником Э. Страсбургером. В 1882 г. В. Флемминг предложил не прямое деление клетки называть митозом, который лежит в основе бесполого (вегетативного) размножения и роста организмов.

Митоз (от греч. *mitos* – нить), или не прямое деление клетки, представляет собой непрерывный процесс, в результате которого происходит сначала удвоение материальных основ наследственности (хромосом или генов), а затем точное равномерное распределение между двумя дочерними клетками наследственной информации, закодированной в молекулах ДНК.

Биологическое значение митоза заключается в том, что в результате этого типа деления образуется относительно однородное потомство, происходит рост и развитие организма, осуществляется омоложение клеток и тканей. Митоз лежит в основе бесполого (вегетативного) размножения организмов.

Деление клеточного ядра путем митоза влечет за собой деление всей клетки. Этот процесс называется цитокинезом. В течение митоза ядро проходит четыре фазы: *профазу*, *метафазу*, *анафазу*, *телофазу*. Состояние клетки между двумя митозами называется *интерфазой*. Период от одного деления до другого и совокупность процессов, происходящих при этом, называется *митотическим циклом* (рис. 16).

Ход митотического деления соматических клеток является непрерывным процессом. Первый этап митоза начинается с *профазы*, которая характеризуется появлением тонких хроматиновых нитей. По мере прохождения профазы от ранней до поздней в результате спирализации хромосом происходит резкое укорачивание хромосом и их утолщение. К концу этого этапа хромосомы становятся видимыми в обычный микроскоп после окрашивания, постепенно исчезает ядерная оболочка и ядрышко, в цитоплазме начинают образовываться ахроматиновые нити.

В метафазе хромосомы приобретают характерную форму, располагаются в экваториальной плоскости клетки в определенном направлении – центромерами в сторону полюсов. Ахроматиновое веретено на этом этапе выражено в наибольшей степени. В конце метафазы хроматиды дублированных хромосом начинают отходить одна от другой

под действием отталкивающей силы центромер и тянущих ахроматиновых нитей.

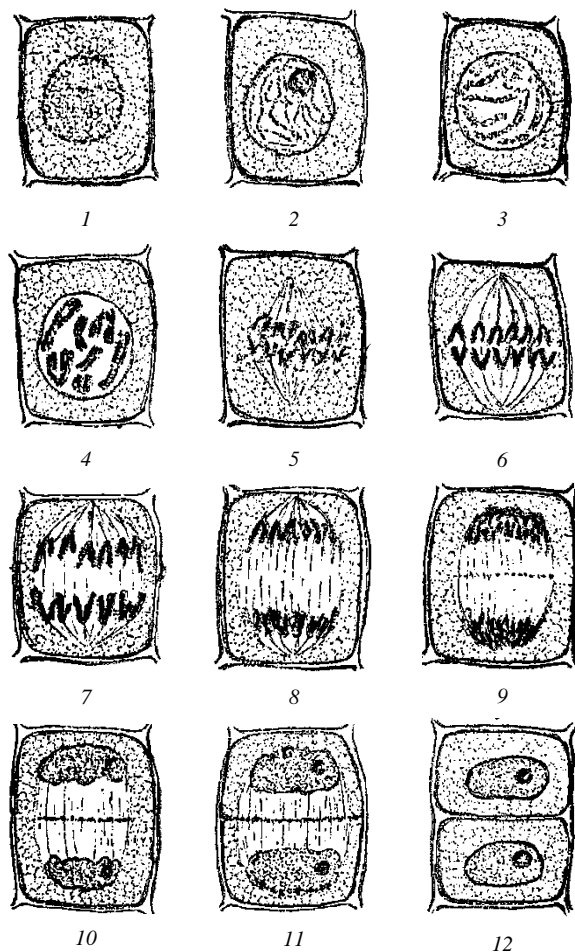


Рис. 16. Схема митоза (ориг.):
 1 – интерфаза; 2 – ранняя профаза; 3 – средняя профаза;
 4 – поздняя профаза (прометафаза); 5 – метафаза;
 6, 7 и 8 – ранняя, средняя и поздняя анафаза;
 9, 10 и 11 – ранняя, средняя и поздняя телофаза;
 12 – интерфаза дочерних клеток – интеркинез

С момента начала расхождения хромосом к противоположным полюсам клетки начинается **анафаза**. После разделения хроматид их называют дочерними хромосомами.

Расхождение хромосом к полюсам происходит за счет сокращения ахроматиновых нитей. Завершается анафаза скоплением дочерних хромосом у полюсов клетки. За счет дубликации (удвоения) первоначального числа хромосом материнской клетки и одновременного расхождения дочерних хромосом к противоположным полюсам во вновь образованных клетках получается такое же количество хромосом, как и в материнской, т. е. кариотип точно копируется в потомстве.

На этапе **телофазы** происходит обратный процесс по сравнению с профазой. Из митотического состояния ядра после восстановления ядерной оболочки, ядрышек, деспирализации хромосом переходят в интерфазное состояние и начинают готовиться к новому делению или специализируются. Во время формирования дочерних ядер в средней зоне клетки образуется перегородка, которая превращается в клеточную оболочку и разделяет исходную клетку на две дочерних. Органоиды и все содержимое цитоплазмы во время митоза распределяются между новыми клетками более или менее равномерно.

Амитоз (прямое деление) в отличие от митоза осуществляется путем перетяжки ядра на две части, микроскопически видимых хромосом при этом не наблюдается. Процесс амитоза обычно начинается с разделения ядрышка, затем на ядре появляются вдавления, перетяжка, которая углубляется до полного разделения на два ядра. Деление ядра называется **кариотомией**, вслед за которой наступает **плазмотомия** – разделение цитоплазмы (рис. 17).

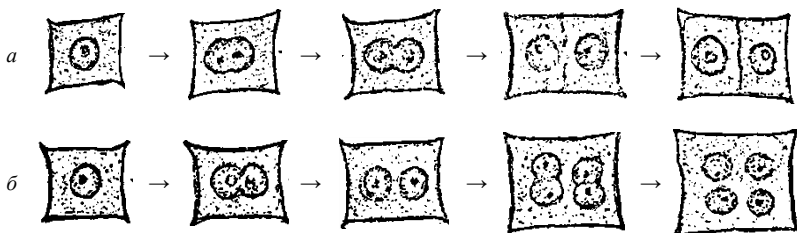


Рис. 17. Схема амитоза:

а – протекает процесс кариотомии и плазмотомии с образованием двух дочерних клеток; *б* – кариотомия не сопровождается плазмотомией, образуются многоядерные клетки

Иногда после деления ядра деление цитоплазмы не наблюдается. В таких случаях образуются двухъядерные или многоядерные клетки. Амитотическое деление чаще всего происходит в запасующих тканях или других специализированных клетках.

При образовании половых гамет происходит специфический тип деления, в результате которого половые клетки получают только гаплоидный (одинарный) набор хромосом, а после их слияния при оплодотворении диплоидный набор хромосом, характерный для кариотипа определенного вида растения или животного, восстанавливается, хромосомы становятся парными. Этот вид клеточного размножения получил название **мейоз**.

С помощью мейоза устраняется удвоение числа хромосом в каждом поколении. Все клетки тела взрослого организма имеют диплоидный (двойной) набор хромосом ($2n$), а образующиеся половые клетки содержат гаплоидный (одинарный) набор (n). При оплодотворении мужская и женская половые клетки сливаются и образуют зачаток (зиготу) нового организма с диплоидным набором хромосом. Следовательно, у живых организмов, размножающихся половым путем, происходит смена ядерных фаз (диплоидная – гаплоидная – диплоидная), $2n \rightarrow n \times n \rightarrow 2n$.

Таким образом, мейоз (редукционное деление) является особым типом деления, которое происходит при образовании половых клеток, в результате чего нормальный диплоидный набор хромосом превращается в гаплоидный в каждой половой клетке (гамете). Благодаря мейозу из поколения в поколение поддерживается постоянство кариотипа, характерного для каждого вида. Все типы мейоза состоят из двух последовательных делений (мейоз I и мейоз II). На всем протяжении мейоза происходит одна конъюгация и одна дупликация гомологичных хромосом. Благодаря конъюгации диплоидный набор хромосом уменьшается в два раза (происходит редукция) в образующихся половых клетках. Каждое мейотическое деление имеет четыре собственные фазы с аналогичным названием, как и при митозе (рис. 18).

В целом мейоз является весьма сложным биологическим процессом, в результате которого из одной диплоидной соматической материнской клетки образуются четыре дочерние гаплоидные клетки (тетрада).

Схема мейоза включает ряд этапов и фаз (рис. 19).

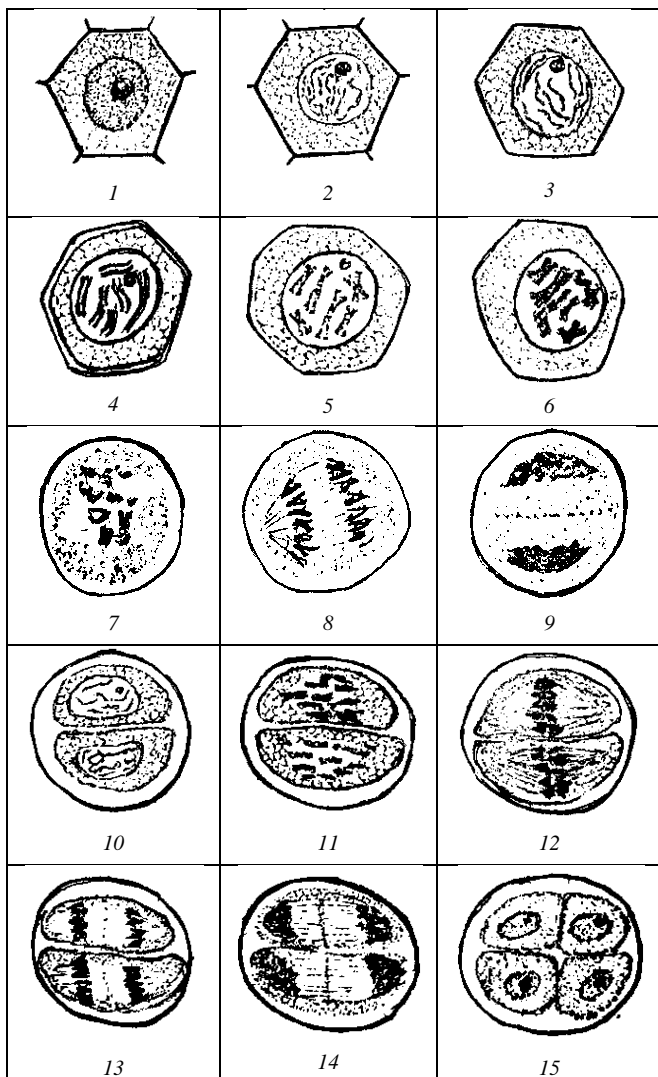


Рис. 18. Схема мейоза (ориг.):
 1 – материнская клетка микроспора; 2–6 – стадии профазы I;
 7 – метафаза I; 8 – анафаза I; 9 – телофаза I; 10 – диада,
 профаза II; 11–12 – метафаза II; 13 – анафаза II;
 14 – телофаза II; 15 – тетрада микроспор

Наиболее продолжительной и сложной является *профаза первого деления*, которая подразделяется на пять стадий. В процессе прохождения 1-й стадии в ядре начинается образование хромосом в виде тончайших нитей, количество которых равняется диплоидному набору, характерному виду объекта изучения. К концу этой стадии (*лептонема*) нити удваиваются и сильно сближаются, переходя в стадию *зигонемы* (стадия спаривания), когда наступает конъюгация гомологичных хромосомных нитей, из моновалентов образуются биваленты.

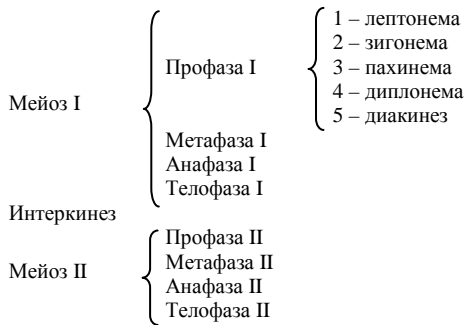


Рис. 19. Схема мейоза

Конъюгируют, как правило, сходные по происхождению отцовская и материнская хромосомы. Механизм подбора пары гомологичных хромосом для спаривания до сих пор остается загадочным.

Конъюгирующие хромосомы постепенно сближаются между собой от центромеры по всей длине и переходят в стадию толстых нитей (*пахинема*), во время которой биваленты укорачиваются, утолщаются, контакт между хромосомами усиливается. При переходе к стадии *диплономы* (стадия двойных нитей) сила притяжения между хромосомами утрачивается, проявляется взаимоотталкивание между ними. Сестринские хроматиды начинают также расходиться со стороны теломер. В результате этого каждый бивалент оказывается представленным четырьмя хроматидами. Во время расхождения моновалентов наблюдается проявление перекреста (кроссинговера) хроматид между собой и наличие тесных контактов в местах перекреста (хиазм). По мере удаления конъюгированных хромосом и уменьшения числа хиазм профаза I переходит в свою последнюю стадию, которая называется *диакинезом*. При этом хромосомы бивалентов максимально утолщаются и удаляются друг от друга. Ядро и клетка достигают наибольшего раз-

мера, ядрышко и оболочка ядра начинают исчезать. Так заканчивается профазы I, ядро переходит в метафазу I.

Метафаза I, как и при митозе, характеризуется исчезновением ядерной оболочки, появлением ахроматинового веретена и расположением хромосом по экватору клетки. К каждому биваленту присоединяются по две ахроматиновые нити, так как каждая конъюгированная хромосома имеет свою центромеру. По мере расхождения гомологичных хромосом к полюсам наступает *анафаза I*, которая имеет такую же характеристику, как и при митозе, только разошедшиеся хроматиды здесь сближаются.

При достижении хромосомами полюсов начинается восстановление ядерной оболочки, возникают две дочерние клетки (диада) с одинарным (гаплоидным) набором хромосом. Так заканчивается *телофаза I* и весь этап *мейоза I*.

За первым редукционным делением после кратковременной стадии покоя следует второе деление – *мейоз II*. На этом этапе *профаза II* бывает очень короткая или совсем отсутствует, после нее хромосомы располагаются по экватору, возникает ахроматиновое веретено в *метафазе II*. Центромеры становятся функционально двойными и присоединяют ахроматиновые нити с обоих полюсов, поэтому в *анафазе II* сестринские хроматиды расходятся к различным полюсам и становятся хромосомами дочерних клеток. В *телофазе II* формируются новые клетки, возникшие после второго этапа деления.

Таким образом, в результате двухступенчатого мейоза из одной диплоидной соматической клетки образуются четыре гаплоидные половые клетки. У высших растений в результате мейоза образуются тетрады микро- и макроспор.

При тщательном изучении образования половых клеток было выявлено, что мейоз является не только процессом, способствующим увеличению количества клеток с гаплоидным набором хромосом, но и процессом, создающим качественно новые клетки, образующиеся в результате конъюгации, кроссинговера и независимого распределения отцовских и материнских хромосом при их расхождении к полюсам клетки.

В тех случаях, когда во время деления клетки на нее оказывают сильное влияние несвойственная температура, различные излучения или химические реагенты, процесс клеточного деления нарушается и притормаживается. Часто при этом в профазе дупликация хромосом проходит нормально, но в дальнейшем деление ядра приостанавливается и не проходит до конца. В данном случае ядро оказывается с удвоенным числом хромосом, образуется полиплоидная клетка. Такой путь возникновения новых полиплоидных клеток носит название осо-

бого типа деления – **эндомитоза**, или внутреннего деления (рис. 20). Иначе увеличение количества хромосом в ядре без деления клетки называется **эндополиплоидией**.

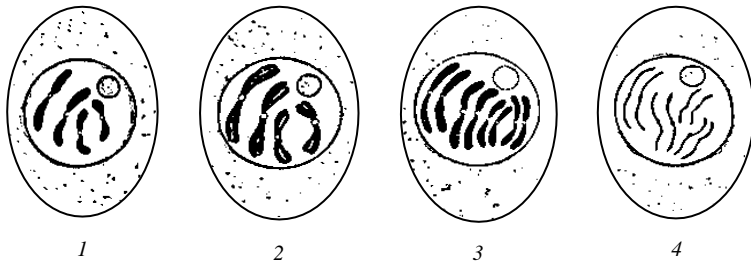


Рис. 20. Эндомитоз:
1 – эндопрофаза; 2 – эндомиетафаза;
3 – эндоанафаза; 4 – эндотелофаза

Если при образовании половых клеток нарушается ход мейоза, то редукция числа хромосом может не произойти. При оплодотворении таких нередуцированных гамет возникают настоящие автополиплоиды, которые будут переходить из поколения в поколение в результате полового размножения.

Благодаря эндомитозу возникают спонтанно в природе и создаются искусственно в селекционной практике новые формы и сорта культурных видов растений на полиплоидном уровне (рис. 21, 22).

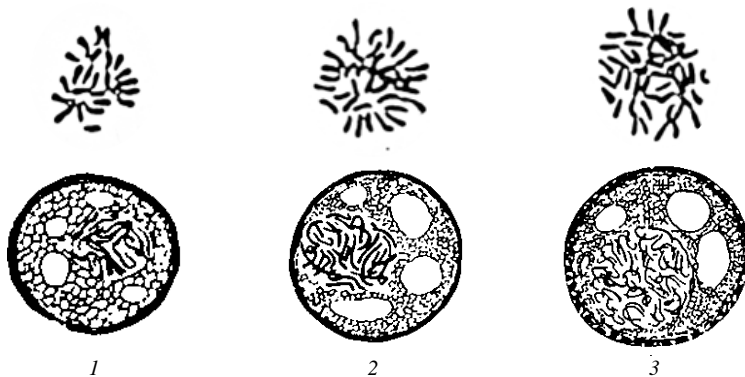
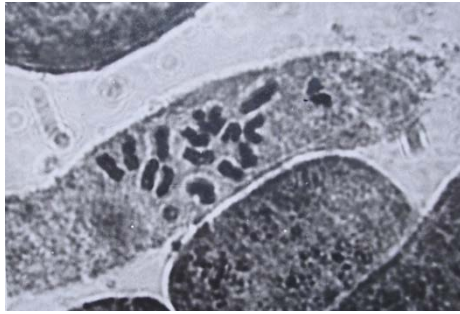
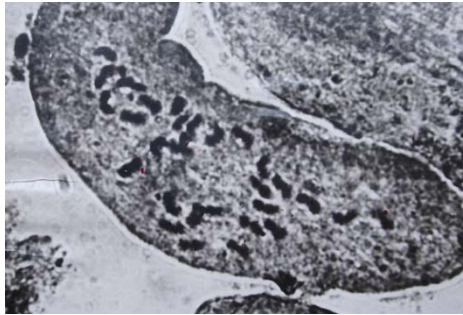


Рис. 21. Полиплоидия у гиацинтов:
1 – диплоид ($2n$); 2 – тетраплоид ($4n$); 3 – октаплоид ($8n$)



a



б



в

Рис. 22. Полиплоидия у гречихи (ориг.):
a – хромосомы диплоидной гречихи ($2n$);
б – хромосомы тетраплоидной гречихи ($4n$);
в – цветки диплоидной и тетраплоидной гречихи

Явление эндомитоза эффективно используется в селекционной практике при применении метода прямого получения плодовых триплексов путем скрещивания пшеницы, формирующей нередуцированные гаметы, с тетраплоидной рожью и для преодоления нескрещиваемости близкородственных видов растений, имеющих различный уровень пloidности.

В этом случае эндомитоз вызывают путем обработки цветущих растений колхицином или закисью азота, когда происходит в генеративных органах мейоз у растений с меньшим числом хромосом. Метод удвоения числа хромосом является наиболее эффективным для преодоления бесплодия отдаленных гибридов F_1 и создания аллополиплоидов.

2.6. Спорогенез и гаметогенез у растений

На определенном этапе роста и развития у растений в результате высокой дифференциации клеток образуются генеративные органы. Из них в итоге формируются плоды и семена, с помощью которых происходит размножение растений половым путем и ради которых выращивается большинство сельскохозяйственных полевых, овощных, плодово-ягодных и технических культур.

Сущность полового размножения заключается в слиянии женской и мужской половых гамет, которые формируются соответственно в женских и мужских половых органах цветов.

Типичный мужской половой аппарат (тычинки) состоит из тычиночных нитей и пыльников, или микроспорангиев. В пыльцевых гнездах пыльников из археспориальной ткани образуются материнские клетки микроспор. После достижения определенных пределов в своем развитии археспориальные материнские клетки начинают делиться. В результате мейоза каждая такая клетка образует четыре микроспоры (тетраду) с одинаковым набором хромосом в каждой. Весь процесс, происходящий до образования тетрады, называется **микроспорогенезом** (рис. 23).

Образованием тетрады микроспор не заканчивается процесс образования пыльцевых зерен. До формирования зрелого пыльцевого зерна каждая микроспора проходит еще один этап развития, который называется **микрогаметогенезом**.

При микрогаметогенезе происходит два последовательных деления ядра микроспоры, сама клетка при этом не делится. В результате пер-

вичного деления получается два неравноценных ядра, одно из которых утрачивает способность к делению, оно называется вегетативным. Второе (генеративное) ядро делится еще раз, образуя при этом два спермия. После этого пыльцевое зерно при наличии вегетативного ядра и двух спермиев считается полностью созревшим и способным к оплодотворению (фертильным).

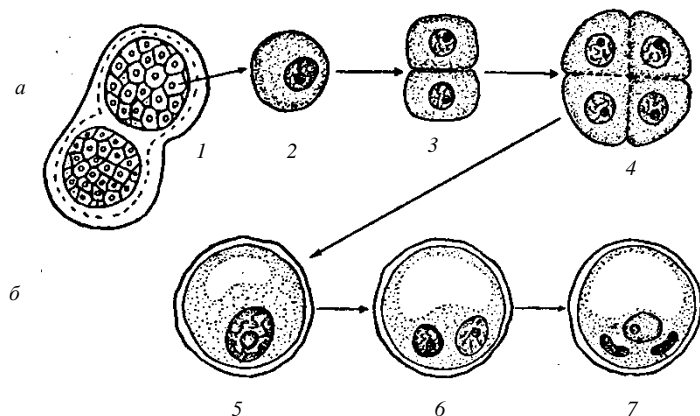


Рис. 23. Схема микроспорогенеза (а) и микрогаметогенеза (б) у покрытосеменных растений (по Константинову):
 1 – пыльник с археспориальной тканью; 2 – материнская клетка;
 3 – диада гаплоидных клеток; 4 – тетрада микроспор;
 5 – микроспора в начале микрогаметогенеза; 6 – пыльцевое зерно с вегетативным ядром и генеративной клеткой; 7 – зрелое пыльцевое зерно с вегетативным ядром и двумя спермиями

При нарушении хода микроспорогенеза и микрогаметогенеза образуется стерильная пыльца, которая не способна к оплодотворению. Явление стерильности пыльцы следует относить к нежелательным, но в практических целях оно играет большую роль. Создание стерильных линий, например, внесло значительный прогресс в производство гетерозисных межлинейных гибридов кукурузы в огромных масштабах, исключив при этом большое количество затрат на механическое удаление мужских соцветий на материнском сорте или линии.

Женским органом, в котором образуются половые гаметы, является пестик цветка, состоящий из завязи, столбика и рыльца. В гнездах завязи образуются и развиваются семяпочки. По мере развития семяпоч-

ки в нуцеллусе дифференцируется отличающаяся по размерам, форме и консистенции клетка. Это и будет археспориальная клетка, из которой в результате микроспорогенеза путем мейотического деления образуется тетрада гаплоидных микроспор. В дальнейшем в процессе макрогаметогенеза развивается только одна из тетрады макроспор, а остальные дегенерируют. На этапе макрогаметогенеза происходят последовательно три деления ядра и образуется восьмиядерный зародышевый мешок (рис. 24).

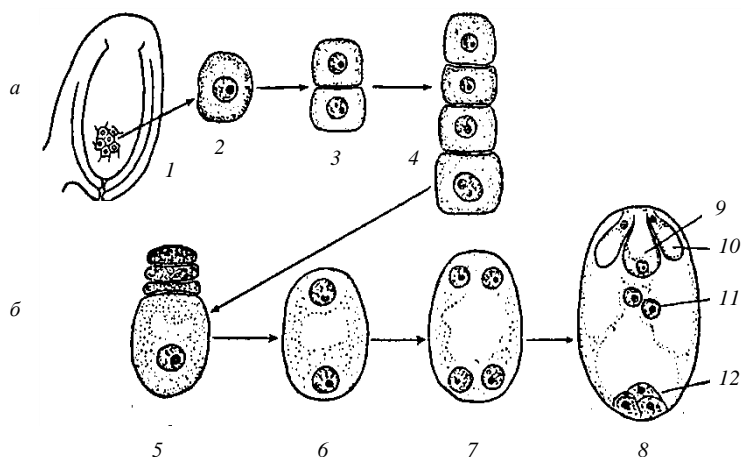


Рис. 24. Схема макроспорогенеза (а) и макрогаметогенеза (б) у покрытосеменных растений: 1 – семяпочка с археспориальной тканью; 2 – материнская клетка; 3 – диада гаплоидных клеток; 4 – тетрада макроспор; 5 – развивающаяся макроспора; 6–7 – последовательное деление ядра макроспоры; 8 – зрелый зародышевый мешок с яйцевым аппаратом (9 – яйцеклетка; 10 – синергиды), центральным ядром (11) и антиподами (12)

В нуцеллусе зрелой, готовой к оплодотворению семяпочки расположена женская половая гамета – зародышевый мешок, строение которого очень сложное. В микропиллярной части зародышевого мешка находится яйцевой аппарат, состоящий из яйцеклетки и двух синергид.

В противоположной, халазной части располагаются три антиподы, а в средней части или ближе к яйцевому аппарату находятся два полярных ядра, сливающихся в центральное ядро зародышевого мешка,

которое, в отличие от всех остальных ядер и яйцеклетки, имеет диплоидный набор хромосом еще до оплодотворения.

В период подготовки и формирования зародышевого мешка он влияет не только на окружающие клетки нуцеллуса и интегументов, но и на весь растительный организм, так как приток питательных веществ в значительной степени усиливается к семяпочкам молодых завязей. Жизнедеятельность вполне развитого, подготовленного к оплодотворению зародышевого мешка до опыления цветка временно приостанавливается. Из этого состояния равновесия он выводится в результате опыления, а особенно в момент оплодотворения, когда оплодотворенная семяпочка становится как бы центром физиолого-биохимических процессов и центром притяжения питательных веществ. Это положение подтвердилось в наших опытах при изучении причин разнокачественности семян зернобобовых культур в пределах материнского растения с использованием метода меченых атомов ^{32}P (Г. И. Тарануха, 1968).

2.7. Оплодотворение у растений и формирование семян

Оплодотворению у растений всегда предшествует опыление, которое является стартовым моментом в этом сложном биологическом процессе. Опыление рыльца пестика может осуществляться пылью своего цветка или другого цветка этого же растения. Такой способ опыления называется самоопылением (автогамией). В природе имеется ряд приспособлений, которые препятствуют самоопылению и способствуют перекрестному опылению, так как в эволюционном смысле и с точки зрения практики перекрестное опыление является более прогрессивным, способствуя большему разнообразию форм и повышению жизнеспособности потомства. По этому поводу Ч. Дарвин даже писал, что перекрестное опыление полезно, а самоопыление вредно. Однако это утверждение не является абсолютно правильным, так как в природе до сих пор растительный мир подразделяется на самоопылители и перекрестники. Между этими двумя группами имеются такие виды растений, которые занимают промежуточное положение и называются факультативными (необязательными) перекрестниками или факультативными самоопылителями.

При различных способах опыления на рыльце пестика попадает масса пыльцы, но не каждое из пыльцевых зерен прорастает и достигает семяпочки, т. е. опыление не всегда обеспечивает оплодотворение.

Под оплодотворением понимается процесс слияния мужских половых гамет с женскими, после чего образуется зачаток нового организма – **зигота**.

Оплодотворение происходит при наличии благоприятных условий. В этом случае попавшие на рыльце пестика пыльцевые зерна начинают прорастать и внедряться пыльцевыми трубками в ткани пестика, двигаясь по мере роста по каналам проводящей ткани, внутри тканей и по межклетникам других тканей пестика к семяпочке. Достигнув семяпочки, пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок через микропиле. В этот момент кончик пыльцевой трубки вскрывается и все содержимое изливается внутрь зародышевого мешка. При проникновении пыльцевая трубка задевает синергиду, а иногда и две и разрушает их. Освободившись из пыльцевой трубки, спермии направляются один к яйцеклетке, а второй к центральному ядру и сливаются с ними. Так осуществляется процесс двойного оплодотворения у покрытосеменных растений, открытый С. Г. Навашиным в 1898 г. (рис. 25).

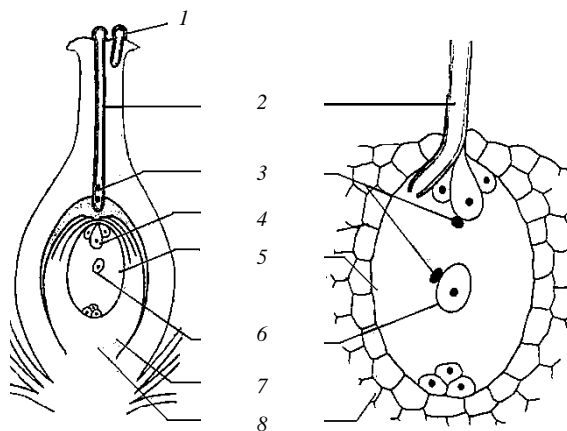


Рис. 25. Двойное оплодотворение у покрытосеменных растений:
1 – пыльцевые зерна на поверхности рыльца; 2 – пыльцевая трубка;
3 – спермии; 4 – яйцеклетка; 5 – зародышевый мешок; 6 – центральное
ядро зародышевого мешка; 7 – семяпочка; 8 – стенки завязи

В результате первого слияния образуется зигота, из которой формируется зародыш семени. Второе слияние дает первичную триплоидную клетку, из которой образуется эндосперм. Зародышевый мешок

после оплодотворения активизируется и начинает усиленно расти. Клетки при этом интенсивно делятся и дифференцируются, начинает формироваться зародыш и эндосперм. В зависимости от вида растений эндосперм получает различное развитие.

Возникшие в результате двойного оплодотворения зигота и первичная клетка эндосперма с первых этапов своего развития стимулируют физиолого-биохимическую деятельность окружающих тканей семяпочки завязи и оказывают влияние на весь организм растения.

Первое деление зиготы, как правило, идет в поперечном направлении, в результате него образуются апикальная (верхняя) и базальная (нижняя) клетки. Из апикальной клетки в дальнейшем формируются основные части зародыша, а из базальной – подвесок, который может быть различной формы и величины. Деление апикальной и базальной клеток может идти в различных направлениях. В зависимости от этого четырехклетник зародыша будет иметь форму линейной или Т-образной тетрады. Т-образная форма тетрады предзародыша характерна для однодольных и большинства двудольных видов растений (рис. 26).

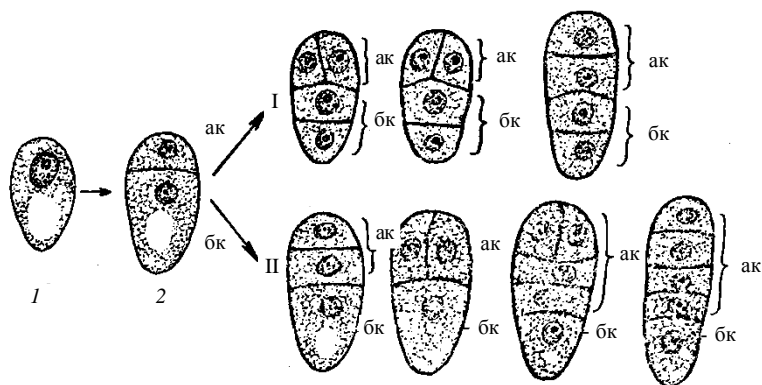


Рис. 26. Начальные этапы деления оплодотворенной яйцеклетки (по Р. Суэджу):
 1 – зигота перед делением; 2 – возникновение апикальной (ак) и базальной (бк) клеток после первого деления; I – образование тетрады за счет деления апикальной и базальной клеток; II – делится только апикальная клетка

Первый этап развития зародыша у двудольных и однодольных растений идет почти одинаково, но в процессе дальнейшей дифференциации появляются коренные отличия. Предзародыш двудольных растений имеет округлую форму, кроме подвеска, который в дальнейшем

отмирает. В процессе дифференциации появляются по бокам два бугорка, радиальная симметрия нарушается, возникшие бугорки увеличиваются за счет деления клеток. Так формируются будущие семядоли (рис. 27).

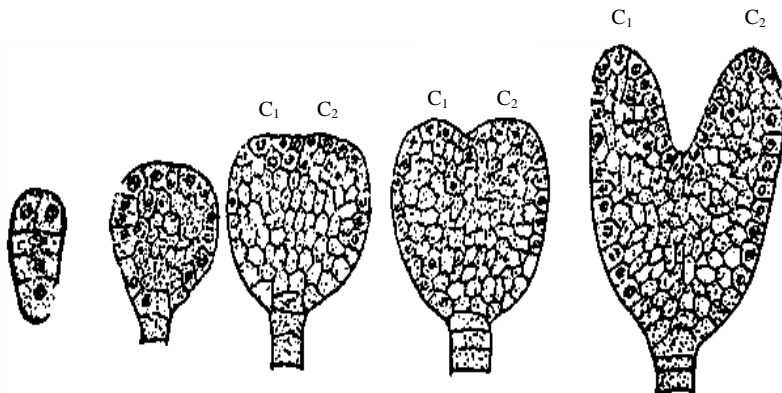


Рис. 27. Развитие зародыша у двудольного растения на примере пастушьей сумки:
 C_1 , C_2 – формирующиеся семядоли

Между двумя бугорками возникает бороздка, на дне которой образуется почечка, дающая начало будущему побегу. В дальнейшем семядольные бугорки быстро разрастаются и замыкают почечку с первичными листочками в глубокую щель между собой. На нижней стороне зародыша (от микропиле) закладывается подсемядольное колено, переходящее в корешок с чехликом.

У однодольных растений в начале дифференциации клеток зародыша на верхушке образуется бороздка, а по бокам появляются чуть заметные бугорки. Один из них в дальнейшем разрастается более энергично и смещает бороздку и второй бугорок набок (рис. 28).

Сдвинутый в сторону бугорок оказывается в подавленном положении, вторая семядоля по этой причине не развивается. Занявшая верхнее положение в зародыше семядоля развивается и превращается в так называемый щиток, отделяющий весь зародыш от эндосперма внутри семени. Рудиментация второй семядоли у однодольных произошла в результате недоразвития ее по причине отклонения в сторону под действием нормально развивающейся семядоли.

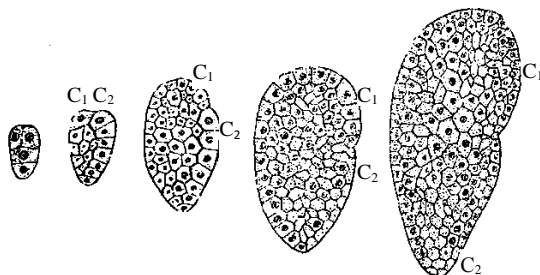


Рис. 28. Развитие зародыша у однодольного растения на примере мягкой пшеницы:
C₁, C₂ – формирующиеся семядоли

Весь период развития зародыша можно подразделить на фазу интенсивного деления клеток, фазу дифференциации и формирования всех его частей. После достижения зародышем нормальной величины начинается процесс его созревания, при котором накапливаются необходимые питательные вещества, ферментативные процессы резко снижаются, содержание воды уменьшается и доходит до нормы.

Кроме жиров, белков и углеводов, в зародышах многих растений накапливаются алкалоиды, глюкозиды, эфирные масла, различные витамины, большой набор ферментов (особенно в щитке однодольных и семядолях двудольных) и другие вещества. Из минеральных веществ в наибольшем количестве находится фосфор, который входит в состав фосфолипидов и липопротеидов, необходимых для строительства органоидов и других структур цитоплазмы и ядра, участвует в осуществлении дыхательных и ростовых процессов, процесса фотосинтеза. Он входит в состав основного энергетического вещества – аденазинтрифосфата (АТФ). По содержанию фосфора в семенах и его зародышах можно судить о состоянии и урожайных свойствах семенного материала. Определенную роль играют и другие минеральные вещества, но особое значение следует придавать присутствию магния, так как он участвует в образовании хлорофилла.

Эндосперм также является продуктом полового процесса. При слиянии второго спермия с центральным ядром образуется первичная клетка эндосперма с *триплоидным набором хромосом*. Роль эндосперма в развитии семени очень многогранна. Он оказывает существенное влияние на развитие зародыша. У большинства видов растений в начальный период развития семени образование эндосперма начинает-

ся раньше, чем зародыша. Рост эндосперма опережает рост зародыша, особенно при неблагоприятных условиях погоды. Причину одновременного развития эндосперма и зародыша можно объяснить более высокой генетической и физической активностью оплодотворенного вторичного ядра, полученного при слиянии полярных ядер и спермия, а также усиленным снабжением его питательными веществами со стороны халазы. Развитие эндосперма может происходить по ядерному, клеточному и промежуточному типу.

При ядерном типе развития эндосперма происходит многократное деление первичного ядра с образованием большого количества ядер, которые расходятся по цитоплазме зародышевого мешка с последующим образованием клеточных оболочек. Клеточные перегородки у пшеницы, например, формируются после образования всей ткани эндосперма.

При клеточном типе развития эндосперма сразу после первого деления эндоспермального ядра образуются две клетки, в результате дальнейшего деления которых возникает вся ткань эндосперма.

Промежуточный тип развития эндосперма характерен для большинства полевых злаков, лютиковых, розоцветных. При этом после первого деления оплодотворенного вторичного ядра кривой перегородкой зародышевый мешок разделяется на микропилярную и халазную части. В микропилярной части развивается зародыш и большая часть эндосперма, а в халазной – эндосперм, который извлекает питательные вещества из нуцеллуса.

В связи с различными типами формирования эндосперма и зародыша у покрытосеменных растений формируются семена, которые отличаются в значительной степени по морфологическим, физическим, биохимическим и хозяйственно полезным признакам (рис. 29).

Зерновки злаковых культур (пшеница) имеют хорошо развитый эндосперм, в котором откладываются запасные питательные вещества. Зародыш с полной генетической наследственной информацией отделен от эндосперма щитком, через который начинают поступать питательные вещества из эндосперма при прорастании семян после посева. В зрелых семенах бобовых культур (фасоль, горох, люпин, соя) эндосперм отсутствует, так как он полностью поглощается зародышем, запасные питательные вещества находятся в семядолях, которые выполняют функции эндосперма. Примером растений, у которых запасные питательные вещества накапливаются в зародыше и эндосперме, является гречиха. У свеклы в семенах, кроме эндосперма, в качестве запасной ткани имеется перисперм.

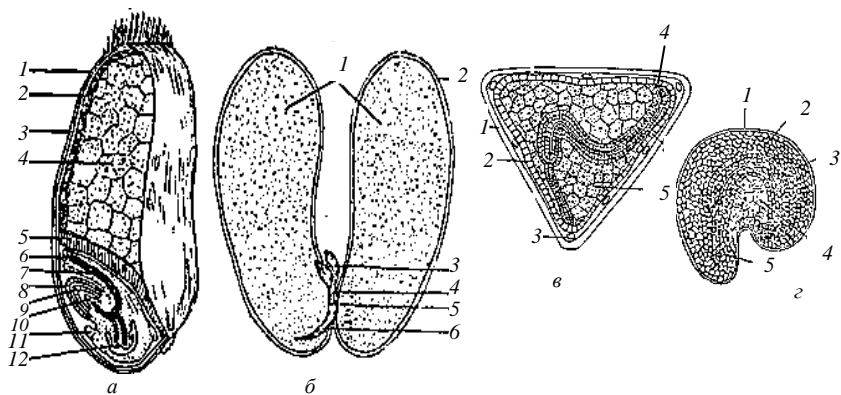


Рис. 29. Схемы строения семян различных культур (по Строне):
а – зерновка пшеницы: 1 – плодовая оболочка; 2 – семенная оболочка; 3 – алейроновый слой; 4 – эндосперм; 5 – эпителий щитка; 6 – щиток; 7 – проваскулярные тяжи; 8 – колеоптиль; 9 – первый листок; 10 – точка роста; 11 – эпибласт; 12 – зародышевые корешки; *б* – семя фасоли: 1 – семядоли; 2 – семенная оболочка; 3 – почечка с первичными листочками; 4 – эпикотиль; 5 – гипокотиль; 6 – корешок; *в* – орешек гречихи: 1 – плодовая оболочка; 2 – семенная оболочка; 3 – сосудистые пучки; 4 – семядоли; 5 – эндосперм; *г* – семя свеклы: 1 – семенная оболочка; 2 – эндосперм; 3 – семядоли; 4 – перисперм; 5 – корешок

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой клетка?
2. Назовите основные компоненты растительной клетки.
3. Каковы функции и значение ядра?
4. В чем состоит отличие соматических клеток от половых?
5. Дайте определение понятиям «хромосома», «кариотип», «гомологичные хромосомы», «ген».
6. Приведите классификацию генов.
7. Назовите основные типы деления клеток.
8. Охарактеризуйте периоды интерфазы.
9. Расскажите о фазах митоза.
10. Дайте определение понятию «мейоз».
11. В чем заключается отличие митоза от мейоза?
12. Что представляет собой редукционное деление мейоза?
13. Что такое эквационное деление мейоза?
14. В чем заключается механизм перекреста хромосом (кроссинговер)?

15. Что такое эндомиоз?

16. В чем заключается сущность передачи наследственной информации по отцовской линии в процессе микроспорогенеза и микрогаметогенеза?

17. В чем заключается сущность передачи наследственной информации по материнской линии в процессе макроспорогенеза и макрогаметогенеза?

18. В чем заключается сущность двойного оплодотворения у покрытосеменных растений при объединении наследственного материала обоих родителей при образовании зиготы?

3. МИКРОСКОПИЯ. МЕТОДЫ ЦИТОЛОГИИ

3.1. Работа с микроскопом и вспомогательными устройствами к нему

Для проведения цитологических исследований используются микроскопы МБР-1, МБР-3, Биолан, Биомед-5 и др. К микроскопам прилагаются в комплекте осветители, обеспечивающие оптимальное освещение препарата. Микроскоп либо соединяется с осветительным прибором (рис. 30), либо осветительный прибор встроен непосредственно в микроскоп (рис. 31).



ОИ-19



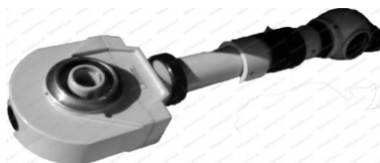
ОИ-35

Рис. 30. Осветительные приборы



Рис. 31. Микроскоп марки «Биомед-5»

При проведении различных генетических исследований (подсчет числа хромосом, изучение кариотипа, спорогенеза, гаметогенеза и др.) пользуются рисовальным аппаратом (рис. 32).



РА-7



РА-4

Рис. 32. Рисовальные аппараты

С помощью рисовального аппарата изображение отбрасывается на лист бумаги, что дает возможность обвести карандашом контуры изучаемого объекта.

Наряду с зарисовкой в цитологии и других науках широкое распространение получил метод микрофотографии.

Измерение микроскопических объектов (пыльцевых зерен, хромосом, тетрад микроспор и т. д.) проводят с помощью специальных линеек: окуляра-микрометра и объекта-микрометра (рис. 33).



Рис. 33. Микроскоп окулярный MOB 1-16 и объект-микроскометр

Материалы и оборудование: микроскоп, осветитель, рисовальный аппарат, объект-микроскометр, окуляр-микроскометр, постоянный препарат, карандаши, бумага.

Задание 1. Изучить устройство микроскопа.

Микроскоп – это оптический прибор, с помощью которого можно получить увеличение объекта и рассмотреть мелкие детали его строения.

В микроскопе выделяют две системы: оптическую и механическую.

Оптическую систему составляют конденсор, объектив и окуляр, которые используются для рассматривания объекта и увеличения его изображения.

Пучок света от источника освещения собирается в конденсоре и направляется на объект. Проходя через объект, лучи света попадают в систему линз объектива; они строят первичное изображение, которое увеличивается с помощью линз окуляра. Главной оптической частью микроскопа, определяющей его основные возможности, является объектив. Объективы и окуляры в современных микроскопах сменные, что позволяет изучать клетки при разных увеличениях.

Объектив представляет собой цилиндр с многолинзовой системой. Линзу, обращенную к препарату, называют фронтальной. Объектив дает увеличенное, действительное, обратное изображение объекта и выделяет тонкие детали его структуры.

Непосредственно от объектива зависит качество изображения объекта. Недостатки линз (абберации) приводят к тому, что изображение может быть окрашенным, размазанным, искривленным.

Различают следующие типы аббераций:

- 1) сферическая абберация (изображение точки передается в виде кружка рассеяния);
- 2) астигматизм (кружки рассеяния имеют эллипсоидную форму);
- 3) кома (в изображении точки наблюдается односторонняя деформация);

4) кривизна поля зрения (не позволяет одновременно видеть резко центр и края поля зрения);

5) дисторсия (нарушение подобия между объектом и его изображением).

В зависимости от аберраций различают оптику:

а) анастигматическую (свободную от астигматизма);

б) апланатическую (лишенную комы и сферической аберрации);

в) ортоскопическую (без дисторсии).

Различают два вида несовпадений: хроматизм положения и хроматизм увеличения. Хроматизм положения наблюдается в том случае, когда изображения различных цветов располагаются на неодинаковом расстоянии от оптической системы; хроматизм увеличения – когда изображения различных цветов находятся в одной плоскости, но имеют неодинаковые размеры.

Хроматизм положения может быть исправлен объективами: ахроматическими и апохроматическими. В зависимости от того, в какой степени исправлены аберрации, различают следующие объективы: ахроматы, апохроматы, планахроматы, планапохроматы.

Объективы ахроматы имеют исправленную сферическую аберрацию, кому и хроматическую аберрацию положения для двух длин волн (у микроскопов МБР-1, МБР-3, Биомед-5).

Объективы апохроматы – исправлены аберрации для трех длин волн.

Эти объективы входят в комплект исследовательских микроскопов МБИ-3, МБИ-6, МБИ-15 и др.

У объективов ахроматов и апохроматов имеется такой недостаток, как кривизна изображения. Для исправления его созданы объективы с плоским полем зрения – планахроматы и планапохроматы.

Объективы бывают сухие и иммерсионные. Сухие объективы применяются обычно при небольших увеличениях (от 56 до 600 раз). В этом случае между объективом и препаратом находится слой воздуха (показатель преломления его равен 1). Из-за разницы показателей преломления предметного стекла и воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Поэтому сухие объективы не позволяют рассматривать слишком мелкие объекты, для этого используют иммерсионные объективы, дающие увеличение в 900–1350 раз. Преимущество иммерсионной системы заключается в том, что между объектом на предметном стекле и объективом находится среда с одинаковым показателем преломления (кедровое масло имеет показатель преломления 1,515; вода – 1,33). Благодаря тому, что лучи не преломляются и попадают в объектив, достигается наилучшее освещение и хорошая видимость мельчайшего объекта.

Светособирающую силу объектива характеризует числовая или нумерическая апертура, которая зависит от показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом, и величины угла, расположенного между оптической осью объектива и крайнего выхода лучей из объектива, и определяется по формуле $A = n \cdot \sin \alpha$, где n – показатель преломления среды; $\sin \alpha$ – половинный угол входного отверстия объектива.

Нумерическая апертура указывается на объективе. Более сильные объективы соответственно имеют более высокую нумерическую апертуру. Так, для малого объектива с увеличением $9\times$ нумерическая апертура составляет 0,20; для сильного объектива с увеличением $90\times$ нумерическая апертура равна 1,25. Величина нумерической апертуры определяет разрешающую способность объектива, которая определяется по формуле $d = \lambda / A$, где λ – длина волны света, нм; A – нумерическая апертура.

Разрешающая способность микроскопа представляет собой величину наименьшего диаметра частиц, которые можно видеть в микроскоп, или наименьшее различимое расстояние между двумя точками. Она зависит от длины волны света и числовой апертуры. Разрешающая способность может быть улучшена только за счет увеличения нумерической апертуры и уменьшения длины волны света. Так, разрешающая способность светового микроскопа равна 2000 А (ангстрем), электронного – 10 А, в то время как глаз человека имеет разрешающую способность всего 0,15 мм.

Кроме разрешающей способности, объектив характеризуется определенным фокусным расстоянием и увеличением. Слабые объективы имеют большее фокусное расстояние (50–60 мм), сильные – меньшее (1–3 мм). Рабочее расстояние от объектива до препарата соответственно должно быть: для объектива с увеличением $9\times$ – 13,8 мм; $20\times$ – 0,6 мм; $90\times$ – 0,12 мм.

В связи с этим большое значение при работе с микроскопом имеет толщина покровного стекла (0,17 мм) и предметного (1,2 мм).

Окуляр состоит из 2–3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Подобно лупе, он дает прямое, мнимое, увеличенное изображение изучаемого объекта. С помощью окуляров исправляются остаточные aberrации. Окуляры Гюйгенса и ортоскопические окуляры предназначены для работы с ахроматами малых и средних увеличений, планахроматами малых увеличений; компенсационные окуляры – с объективами апохроматами, планахроматами и ахроматами больших увеличений.

Сочетание увеличения объектива ($V_{об}$) и окуляра ($V_{ок}$) позволяет определить общее увеличение микроскопа ($V_{м}$). Оно определяется по формуле $V_{м} = V_{об} \cdot V_{ок}$.

Однако нужно знать, что увеличение микроскопа находится в зависимости от длины тубуса. Нормальная длина тубуса 160 мм, но некоторые старые микроскопы имеют иную длину тубуса. При бинокулярной насадке увеличение микроскопа устанавливают по формуле $V = V_{об} \cdot V_{ок} \cdot V_n$, где n – собственное увеличение микроскопа, равное 1,5×.

Окуляр с нужным увеличением выбирают в зависимости от увеличения объектива: $V_{ок} = 500 \cdot A / V_{об}$.

Конденсор – специальный осветитель, расположенный под предметным (объектным) столиком микроскопа. Он состоит из двух или трех линз, собирающих от зеркала свет в пучок, направляемый в плоскость препарата. Имеет суживающуюся апертурную диафрагму. На качество изображения влияет местоположение конденсора (перемещая конденсор, можно изменить качество изображения), степень открытия диафрагмы (открывая и закрывая ее, можно изменить глубину резкости, освещенность). Диафрагма бывает дисковой, колпачковой, ирисовой (у биологических рабочих и биологических исследовательских микроскопов).

Зеркало (расположено под конденсором) отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор для освещения препарата. Зеркало имеет две поверхности – плоскую (используемую при любом источнике света и при любом увеличении) и вогнутую (используемую при искусственном освещении). Для лучшего освещения объекта в биологических микроскопах вместо зеркала используют различные типы осветителей.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометренным механизмом и микрометренным винтом, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Микрометренный винт служит для незначительного перемещения тубусодержателя и объектива на расстояния, измеряемые микрометрами.

Тубус – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Он подвижно соединяется с головкой тубусодержателя и фиксируется стопорным винтом в определенном положении.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер, предназначенный для быстрой смены объективов. Для передвижения тубусодержателя и объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении служит винт грубой наводки.

Предметный столик имеет в середине круглое отверстие. Предметный координатный столик обеспечивает перемещение препарата, установленного в препаратодержатель, в горизонтальной плоскости по

двум взаимно перпендикулярным направлениям с помощью рукояток, расположенных с левой стороны на препаратодателе.

Задание 2. Изучить принцип работы с микроскопом.

Микроскопы выпускаются в различных вариантах комплектации. В базовой комплектации микроскоп предназначен для наблюдения биологических и других прозрачных объектов в проходящем свете светового поля. С помощью микроскопа можно исследовать окрашенные и неокрашенные препараты в виде мазков и срезов, расположенных на предметном стекле без покровного и с покровным стеклом толщиной 0,17 мм.

Микроскоп «Биомед-5» имеет увеличение от 40 до 1600 крат, числовая апертура его составляет 1,25 МИ. В зависимости от степени исправления аберрации объектив микроскопа «Биомед-5» относится к ахроматам (4×/0,10; 10×/0,25; 40×/0,65; 100×/1,25 МИ). Освещение установлено по Келеру.

При работе с микроскопом его ставят у края стола так, чтобы окуляры находились напротив глаз, и в течение работы его не передвигают. Открывают полностью диафрагму, поднимают конденсор в крайнее верхнее положение. Столик центрируют. Ставят объектив 8× в рабочее положение – на расстояние 1 см от предметного столика, так как работу с микроскопом всегда начинают с малого увеличения. Глядя в окуляры, добиваются равномерного освещения. Кладут на предметный столик препарат и, глядя сбоку, опускают объектив с помощью винта грубой наводки так, чтобы между фронтальной линзой и препаратом было расстояние в 4–5 мм. Глядя в окуляр и вращая винт грубой наводки на себя, плавно поднимают объектив до положения, при котором хорошо видно изображение объекта. С помощью микрометрического винта добиваются хорошей видимости изображения препарата.

Для изучения какого-либо участка объекта при большем увеличении ставят этот участок в центр поля зрения, затем поворотом револьвера переводят объектив на большее увеличение (объектив не поднимать!). Затем с помощью микрометрического винта добиваются четкой видимости изображения объекта. После окончания работы с большим увеличением поворотом револьвера устанавливают малое увеличение и только после этого снимают препарат.

Задание 3. Установить микроскоп для работы с искусственным освещением по Келеру.

С помощью соединительной планки установить осветитель ОИ-19 перед микроскопом и через трансформатор включить его в сеть. Пово-

рачивая корпус осветителя, направить световой поток на плоское зеркало. С помощью зеркала направить свет в объектив (рис. 34).

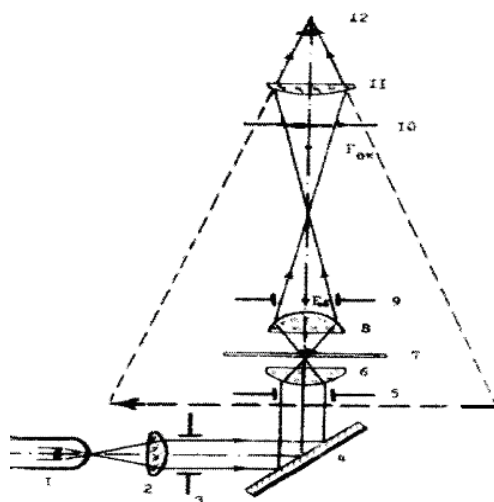


Рис. 34. Принципиальная схема микроскопа и осветительной системы: 1 – источник света; 2 – линза осветителя; 3 – полевая диафрагма; 4 – зеркало; 5 – апертурная диафрагма; 6 – линза конденсора; 7 – объект; 8 – линза объектива; 9 – выходной зрачок объектива; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – линза окуляра; 12 – глаз

Конденсор микроскопа поднять в верхнее положение и закрыть полевую диафрагму. Отверстие диафрагмы осветителя уменьшить до 1–2 мм. На плоское зеркало положить лист белой бумаги. Перемещая лампочку вдоль оси, добиться четкого изображения нити лампочки на бумаге. Снять бумагу с зеркала и, двигая корпус осветителя, переместить изображение нити лампочки в центр полевой диафрагмы.

Перемещая вверх и вниз конденсор, получить резкое изображение диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа (она должна иметь вид ярко освещенного кружка).

Слегка поворачивая зеркало, установить изображение диафрагмы осветителя в центре поля зрения микроскопа. После этого диафрагму осветителя следует немного открыть (диаметр около 1,5 см). Опустить конденсор, чтобы обеспечить равномерное освещение всего поля зрения.

Для определения оптимального диаметра отверстия полевой диафрагмы вначале ее нужно закрыть полностью, а затем, глядя в окуляр, слегка приоткрыть, чтобы края ее совпадали с краями задней линзы объектива. Проверить фокусировку объектива.

Задание 4. Освоить работу с рисовальным аппаратом.

Установить свет и сфокусировать препарат. Вынуть из тубуса окуляр и закрепить рисовальный аппарат РА-4 хомутиком. Окуляр вставить на место. Откидная оправа аппарата должна лечь на окуляр. Зеркало установить под углом 45° к штанге. При наклонном тубусе микроскопа для зарисовки следует использовать наклонный столик с таким расчетом, чтобы его поверхность была перпендикулярна оси тубуса. Чтобы увидеть одновременно изображение объекта, бумагу и конец карандаша, нужно уравнивать освещенность карандаша и изображения объекта. Для регулирования яркости изображения объекта необходимо пользоваться реостатом осветителя и набором сменных дудчатых светофильтров на секторе аппарата.

С помощью рисовального аппарата обвести карандашом на бумаге контуры изображения деталей препарата.

Задание 5. Освоить работу с микрометром для измерения объектов и провести измерения пыльцевых зерен пшеницы, ржи и других культур.

Вставить окуляр-микрометр в соответствующий окуляр микроскопа и, вращая глазную линзу, получить резкое изображение его шкалы.

Поместить объект-микрометр на столик микроскопа и получить резкое изображение его шкалы.

Совместить изображение шкалы объекта-микрометра со шкалой окуляра-микрометра и установить, сколько делений объекта-микрометра приходится на определенное число делений окуляра-микрометра. Разделить первую величину (число делений объекта-микрометра) на вторую (число делений окуляра-микрометра) и умножить полученную величину на 10 (цена деления объекта-микрометра в микрометрах). Полученный результат будет являться ценой деления окуляра-микрометра для данного объектива и окуляра.

Определить размеры пыльцевого зерна пшеницы, а затем ржи в делениях окуляра-микрометра, передвигая препарат на столике и поворачивая вокруг оси окуляр-микрометр. Измерить 10 пыльцевых зерен пшеницы, большой диаметр 10 пыльцевых зерен ржи и занести полученные данные в табл. 2. Определить истинные размеры пыльцевых зерен ржи (пшеницы) путем умножения числа делений окуляра-микрометра на цену одного деления (объектив $40\times$, окуляр-микрометр $7\times$).

Таблица 2. Диаметр пыльцевых зерен пшеницы и ржи

| Культура, сорт | Номер пыльцевого зерна | Диаметр пыльцевого зерна | |
|-------------------|------------------------|-------------------------------|---------------|
| | | в делениях окуляра-микрометра | в микрометрах |
| | | | |

После заполнения таблицы проанализировать полученные данные и сделать заключение о значении величины пыльцевого зерна для способа опыления растения (самоопыление или перекрестное опыление).

3.2. Способы подготовки к исследованию и методы изучения клетки

Различные методы исследований способствуют накоплению данных о строении, функциях, химическом составе клетки и ее структурных компонентах. К таким методам относятся:

- 1) прижизненные наблюдения;
- 2) изучение фиксированных и окрашенных клеток тканей;
- 3) цитохимические исследования;
- 4) дифференциальное центрифугирование;
- 5) автордиография;
- 6) метод культуры клеток и тканей;
- 7) микрургия и др.

Материалы и оборудование: проросшие семена в растильнях, проросшие луковичы, почки, молодые листочки; пинцеты, препаровальные иглы, лезвия, пенициллиновые флаконы с пробками, этикетки.

Задание 1. Изучить методику подготовки материала к фиксации и виды фиксаторов.

Фиксация с последующим окрашиванием клеток и тканей является самым распространенным способом подготовки объектов к исследованию. Фиксация представляет собой быстрое умерщвление клетки с сохранением ее прижизненной структуры. Искажение структур клетки (в цитологии носит название артефакта) очень нежелательно. В цитологической и эмбриологической практике применяется большое число фиксирующих жидкостей в зависимости от цели и характера исследования. Наиболее часто применяемые в цитогенетической практике фиксаторы делятся на спиртовые и водные.

К спиртовым фиксаторам относят:

- 1) Карнуа (6:3:1) – спирт, хлороформ, уксусная кислота;

- 2) упрощенный Карнуа, или уксусный алкоголь (3:1);
- 3) Чемберлена (90:0,5:0,5) – спирт, формалин, уксусная кислота.

К водным фиксаторам относят:

- 1) Навашина (10:4:1) – 1 % хромовая кислота, 16 % формалин (от 40 % медицинского), ледяная уксусная кислота;
- 2) Левитского (1:10) – хромовая кислота, формалин.

При работе с фиксаторами следует запомнить три правила:

1. Фиксатор не должен быть теплым.
2. Водные фиксаторы смешивают перед их употреблением.
3. Количество фиксирующей жидкости должно превышать объект в 20–40 раз.

Исследуемый материал в водном фиксаторе выдерживают около 24 ч, а в спиртовом – от 30 мин до 12 ч.

Для изучения строения хромосом, подсчета их числа и определения кариотипа наиболее удобным объектом являются кончики быстро растущих корешков из проросших семян. Семена проращивают в растительных при соответствующих условиях влажности и температуры. Для фиксации лучше брать короткие корешки длиной 1,0–1,5 см. Перед заготовкой корешков для фиксации материал рекомендуется поместить в холодильник (температура 1–2 °С) на 6–12 ч или залить объект 0,1 % раствором колхицина на 2–4 ч. Под действием холода и колхицина хромосомы сокращаются и хорошо распределяются по всей клетке.

Для изучения мейоза, развития половых клеток и оплодотворения фиксируют бутоны, тычинки и пестики. У злаковых фиксируют целиком зачаточный колос или метелку в состоянии, когда вершина колоса или метелки прощупывается ниже последнего листа на 2–3 см. У представителей других семейств фиксируют отдельные соцветия, цветки, завязи, семена. У древесных культур для лучшей фиксации снимают верхние кроющие листочки и чешуйки. Эмбриологические объекты медленно пропитываются фиксирующими жидкостями, поэтому желательно пользоваться спиртовыми фиксаторами или использовать некоторые специальные приемы, например погрузить объект на 1–2 мин в 100 % спирт или уксусный алкоголь (фиксатор Карнуа упрощенный: 3 части уксусной кислоты и 1 часть спирта).

Задание 2. Провести фиксирование соответствующего материала.

1. Отрезать кончики корешков лука, пшеницы, ржи и других культур длиной 0,5–0,7 см и поместить их в пенициллиновый флакон с фиксирующей жидкостью. Желательно до нарезки корешков залить их водой для лучшего тургора клеток. Во флакон вложить этикетку.

2. Выдержка в фиксирующей жидкости зависит от объекта: нежные тонкие корешки фиксируют в течение 0,5–1,0 ч, грубые колосья и почки – до 24 ч, включая их предварительную обработку спиртом или уксусным алкоголем.

Фиксированный материал хранят в холодильнике в фиксаторе или промывают в 96 % растворе этилового спирта и хранят в 70 % растворе до окрашивания.

Задание 3. Провести окрашивание соответствующего материала.

Для окраски временных препаратов чаще всего используют кармин, лакмоид, орсеин, растворенные в уксусной кислоте. Для окраски постоянных препаратов используют гематоксилин, генциановый фиолетовый, фуксин, метиленовый синий.

При исследовании срезов и временных препаратов широко используют окрашивание их различными красителями. Чаще всего эти красители представляют собой сложные органические соединения, комплексные соли. Если в красителе красящим веществом является основание, то они называются основными, если остаток кислоты – кислыми.

К основным красителям относятся: сафранин, генциановый фиолетовый, метиленовый зеленый, синий и фиолетовый, фуксин основной и др.

К кислым красителям относятся: конго красный, эозин, кислый фуксин, пикриновая кислота и др.

Красители обычно применяют в виде водных или спиртовых растворов. Водные растворы чаще готовят в концентрации 1–2 %, спиртовые – на 50–70 % спирте, хранят в темном месте.

В зависимости от объекта и красителя окрашивание ведут двумя способами: прогрессивным и регрессивным. В первом случае срез помещают в слабый раствор красителя и окрашивают довольно продолжительное время. Вначале окраска бывает слабой, со временем она прогрессирует. При регрессивном способе окрашивания срез заведомо переокрашивают в концентрированном красителе, а избыток красителя в дальнейшем отмывают соответствующим растворителем (дифференцировка).

В цитологической и эмбриологической практике часто употребляют так называемую комбинированную окраску препаратов двумя или тремя красителями.

Способы приготовления красителей и методы окраски разработаны различными исследователями и поэтому носят сложные названия: окрашивание гематоксилином по Гейденгайну при приготовлении постоянных препаратов по Навашину; окрашивание реактивом Шиффа (кармином) по Фельгену и др.

4. МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВРЕМЕННЫХ И ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ

4.1. Строение растительной клетки

Клетка – структурная основная и физиологическая единица любого живого организма. Впервые клеточное строение у растений наблюдал и описал Роберт Гук (1665). Немецкие ученые зоолог Т. Шванн и ботаник М. Шлейден сформулировали клеточную теорию (1838–1839). Главный тезис клеточной теории – признание общего для всех организмов принципа клеточного строения и роста.

Известно два типа клеток: прокариотическая и эукариотическая. К прокариотическому типу относятся клетки бактерий, сине-зеленых водорослей, которые не имеют клеточного ядра; клетки всех остальных одноклеточных и многоклеточных растений, животных и человека относятся эукариотическому типу. Они содержат сложное ядро, отграниченное от цитоплазмы ядерной оболочкой.

Растительные клетки имеют различную форму, которая зависит главным образом от выполняемой клеткой функции. В основном клетки делятся на два типа: паренхимные и прозенхимные. Паренхимные клетки имеют примерно одинаковую длину, ширину и высоту; прозенхимные – сильно вытянуты в длину (рис. 35).

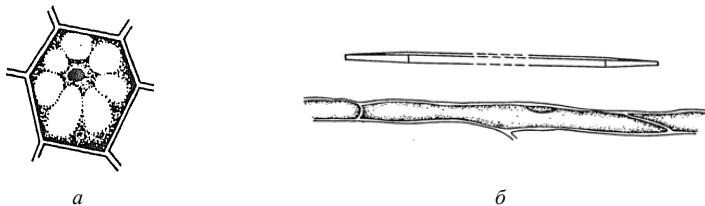


Рис. 35. Паренхимные (а) и прозенхимные (б) растительные клетки

Растительная клетка состоит из живого вещества – протопласта – и неживых внутриклеточных включений – производных протопласта, которые являются продуктами его жизнедеятельности и образуют парапласт клетки. Протопласт составляют: цитоплазма, эндоплазматическая сеть, рибосомы, митохондрии, ядро, пластиды, комплекс Гольджи, микрофиламенты, микротрубочки. Каждый органоид выполняет свою функцию. Парапласт включает в себя: вакуоль, клеточную стен-

ку, запасные питательные вещества и физиологически активные вещества (рис. 36).

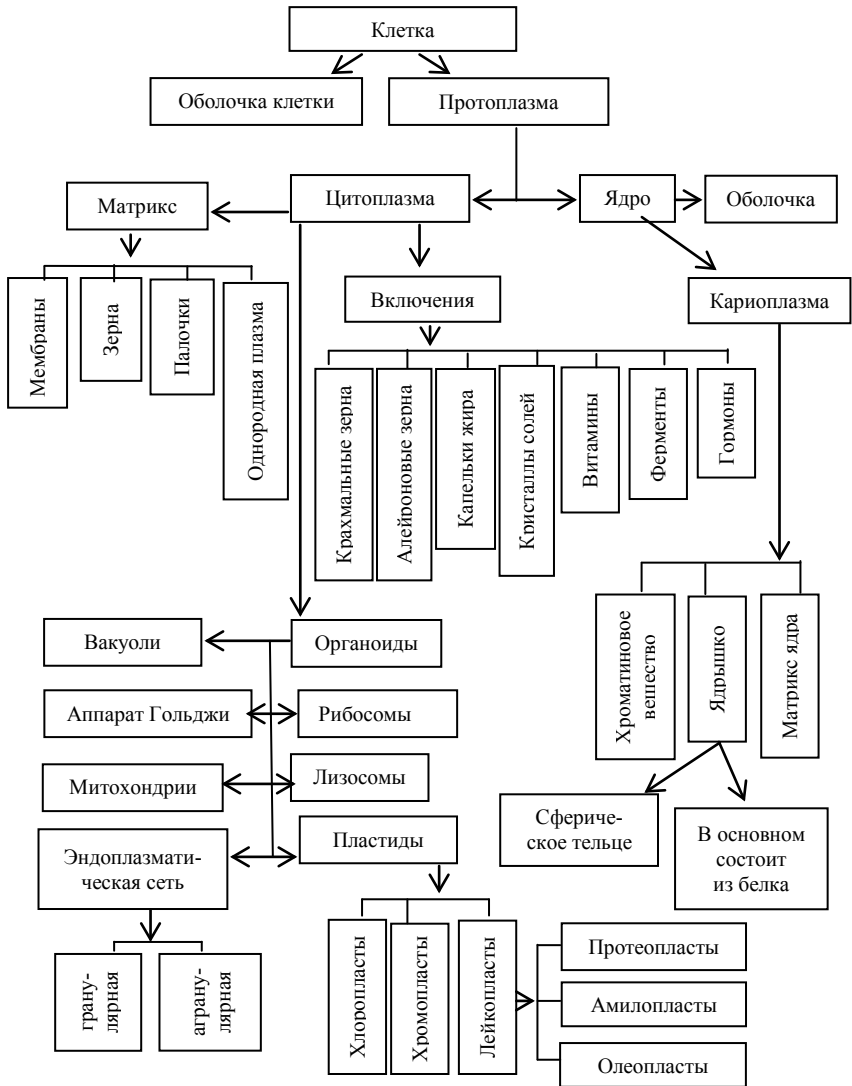


Рис. 36. Схема составных компонентов клетки

Материалы и оборудование: луковица лука, зрелые плоды рябины, листочки элодеи, семена бобовых (горох, фасоль), кусочки клубней картофеля; раствор йода; микроскоп, предметные и покровные стекла, пинцет, препаровальная игла.

Задание 1. Изготовить препарат эпидермы сочной чешуи луковицы лука, рассмотреть и зарисовать строение клетки в капле воды и в растворе йода.

Для изготовления препарата препаровальной иглой снимают эпидермис с выпуклой поверхности чешуи, помещают ее в каплю воды на предметное стекло и накрывают покровным стеклом.

Проделывают то же, но с добавлением раствора йода. Под действием йодистого калия белки цитоплазмы окрасятся в желтый цвет, а ядра – в темно-желтый. Вакуоли будут выделяться в виде более светлых мест. Оболочки клеток останутся бесцветными (рис. 37).

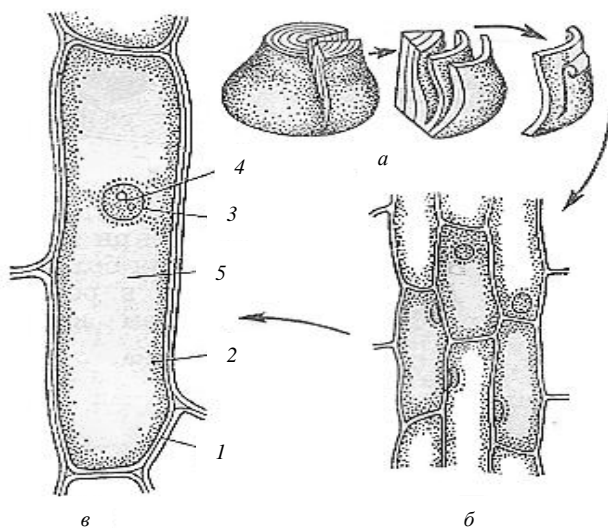


Рис. 37. Схема строения недифференцированной клетки сочной чешуи луковицы лука (*Allium cepa*):
a – луковица лука; *б, в* – клетки эпидермы;
 1 – стенка клетки; 2 – цитоплазма; 3 – ядро;
 4 – ядрышко; 5 – вакуоль

Под микроскопом при большом увеличении изучить строение паренхимной клетки. Зарисовать клетку и обозначить видимые компоненты (оболочку клетки, поры, цитоплазму, вакуоль, ядро).

Задание 2. Изучить органеллы клетки. Рассмотреть пластиды в клетках листа элодеи, движение цитоплазмы. Рассмотреть и зарисовать хромопласты в клетках плодов рябины.

В цитоплазме клеток растения находятся пластиды – двумембранные органоиды. В зависимости от окраски и функций их делят на три группы: хлоропласты (зеленые), хромопласты (желтые, оранжевые или красные) и лейкопласты (бесцветные).

Приготовить препарат клеток листа элодеи и плодов рябины. На предметное стекло в каплю воды положить лист элодеи и накрыть покровным стеклом. Сначала рассмотреть клетки листа при малом увеличении, а затем при большом найти хлоропласты, обратить внимание на окраску пластид. Зарисовать несколько клеток с хлоропластами и указать на рисунке стрелкой движение цитоплазмы (рис. 38).

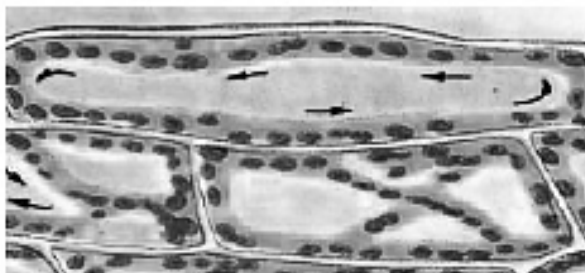


Рис. 38. Хлоропласты и движение цитоплазмы в клетках листа элодеи

Взять немного мякоти плода рябины, поместить в каплю воды на предметном стекле, осторожно разрыхляя, и накрыть покровным стеклом. Рассмотреть и зарисовать хромопласты.

Задание 3. Изучить явление тургора и плазмолиза.

Клеточный сок, находящийся в вакуолях, содержит различные растворенные вещества. Если клеточный сок имеет более высокую концентрацию, чем окружающий раствор, то он начинает притягивать жидкость, которая проникает в клетку через оболочку. После чего она увеличивается в объеме, становится упругой. Такое явление называется тургором. Тургор является нормальным физиологическим состоя-

нием растительной клетки. Если концентрация клеточного сока ниже, чем в окружающей среде, то вода начинает выходить из клетки, что вызывает падение тургора. Объем клетки снижается, а содержимое в ней сжимается в виде комочка в центре клетки. Данное явление называется плазмолизом. При таком состоянии растение находится в увядшем состоянии. Длительный плазмолиз может вызывать гибель клетки (рис. 39).

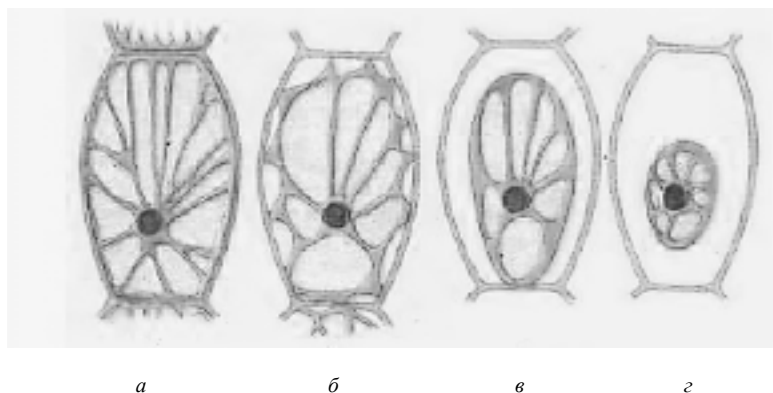


Рис. 39. Явления тургора и плазмолиза в растительной клетке:
a – клетка в состоянии тургора;
б – г – клетка в различных стадиях плазмолиза

На препарате с листом элодеи видны клетки, которые находятся в состоянии тургора, т. е. их оболочки испытывают давление постенного слоя цитоплазмы, на которую, в свою очередь, оказывает давление содержимое клеточного сока.

Снять покровное стекло, забрать фильтровальной бумагой воду и добавить каплю 1 М раствора NaCl. Высокая концентрация внешнего раствора вызывает отдачу воды из клетки в окружающую среду, содержимое ее уменьшается в объеме, и цитоплазма начинает отходить от оболочки клетки – плазмолиз, а способность клетки занимать исходное положение – деплазмолиз.

Под микроскопом при большом увеличении рассмотреть состояние клетки при тургоре и плазмолизе. Зарисовать и обозначить оболочку, протопласт, полость.

Задание 4. Изучить морфологическую структуру крахмальных и алейроновых зерен и определить локализацию их в органах растений.

Клетка является объектом для накопления питательных веществ. Так, вторичный крахмал откладывается в ней в виде крахмальных зерен, которые отличаются формой, строением и размерами (рис. 40).

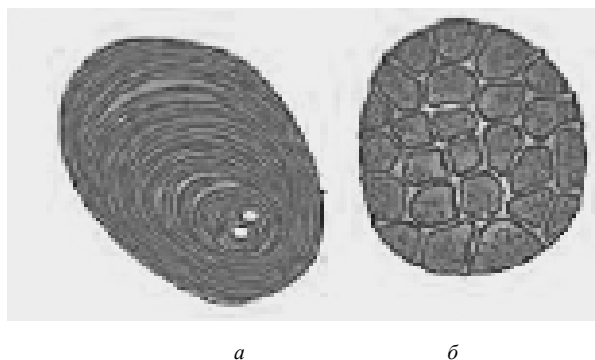


Рис. 40. Строение крахмальных зерен: *а* – картофель; *б* – овес

В каждом крахмальном зерне есть центр крахмалообразования, вокруг которого откладываются слои крахмала. Причем для каждого вида растений характерна определенная форма и величина крахмальных зерен. Различают простые, полусложные и сложные крахмальные зерна.

Приготовить препарат для изучения крахмальных зерен. Маленьким кусочком клубня картофеля сделать мазок на предметном стекле, затем нанести каплю воды и накрыть покровным стеклом. Под микроскопом при малом увеличении найти, а при большом рассмотреть простое, сложное и полусложное крахмальные зерна. Зарисовать их.

Для выявления наличия крахмала используется йод, растворенный в йодиде калия. Действие этого реактива вызывает окрашивание крахмальных зерен в синий цвет, что позволяет обнаружить следы крахмала в органах растения. С целью обнаружения содержания крахмала капнуть раствор йода в йодистом калии и посмотреть, какой цвет приобретают крахмальные зерна.

Приготовить препарат из предварительно замоченного семени гороха или фасоли, снять семенную кожуру, отделить одну семядолю, сделать с нее тонкие срезы и поместить на предметное стекло в каплю воды, смешанную с глицерином.

При малом увеличении микроскопа рассмотреть форму клеток семядолей, найти в них крупные зерна крахмала и более мелкие алейроно-

вые зерна. Нанести на препарат каплю йода и понаблюдать за изменением окраски крахмальных (станут фиолетовыми) и белковых (станут желтыми) зерен.

У гороха в семядолях полость клеток заполнена крупными крахмальными зернами и мелкими алейроновыми, равномерно рассеянными по цитоплазме. Крахмальные зерна гороха отличаются от зерен картофеля концентрической слоистостью и наличием трещин в центре их образования (рис. 41).

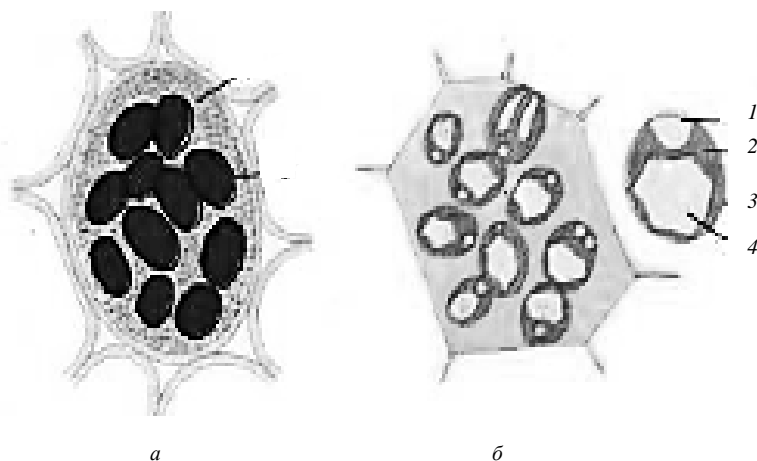


Рис. 41. Алейроновые зерна: *a* – простые; *б* – сложные:
 1 – глобуид; 2 – пространство, занимаемое аморфным белком;
 3 – оболочка зерна; 4 – белковый крахмал

Зарисовать несколько клеток и обозначить амилопласты картофеля (крахмальные зерна), алейроновые зерна гороха (зерна белка).

4.2. Техника изготовления временных ацетокарминовых препаратов для изучения митоза

Митоз – сложный тип деления, протекающий в соматических клетках и являющийся основным способом их размножения. В результате митоза из одной материнской клетки образуются две дочерние. Ядро каждой дочерней клетки имеет, как правило, такой же набор хромосом, какой был в исходной материнской клетке. В процессе митоза

различают четыре последовательно идущие фазы: профазу, метафазу, анафазу и телофазу.

Для изучения митоза и его отдельных фаз можно проводить прижизненные наблюдения на волосках тычиночных нитей традесканции с помощью фазово-контрастного устройства, а также в поляризованном или флуоресцентном свете. Чаще для этих целей используют меристематические клетки конуса нарастания корней или стебля после их фиксации и последующего изготовления препаратов.

Наиболее доступным объектом для изучения фаз митоза является репчатый лук (*Allium cepa*). Корешки должны быть длиной не более 1–2 см, с хорошо выраженной зоной деления клеток. Корешки фиксируют в упрощенном фиксаторе Карнуа (3:1) и хранят в 70 % спирте.

Материалы и оборудование: зафиксированные корешки лука, постоянные препараты и микрофотографии с продольными срезами корешков лука; ацетокармин, 45 % уксусная кислота; микроскоп, рисовальный аппарат, предметные и покровные стекла, лезвие, фильтровальная бумага, спиртовка, спички, препаровальная игла.

Задание 1. Приготовить временный препарат из корешков лука.

1. На дно фарфоровой чашечки налить раствор ацетокармина и перенести в него корешки лука.

2. С целью лучшего окрашивания объекта и одновременной мацерации раствор ацетокармина с корешками нагревать над пламенем спиртовки до появления паров.

3. Краситель слить из чашки и корешки 2–3 раза промыть 45 % уксусной кислотой. При слабом окрашивании уксусной кислотой можно не промывать.

4. На предметное стекло нанести каплю 45 % уксусной кислоты и поместить в нее окрашенный корешок.

5. Лезвием бритвы отделить кончик корешка (конус нарастания) и накрыть его покровным стеклом.

6. Кончиком спички или деревянной палочки легкими ударами по покровному стеклу осторожно раздавить препарат и распределить клетки равномерно в один слой. Покровное стекло не должно смещаться. Избыток уксусной кислоты удалить фильтровальной бумагой.

7. Приготовленный препарат поместить на предметный столик микроскопа.

Задание 2. Выявить все фазы митоза и зарисовать их.

1. На препарате найти хорошие метафазные пластинки.

2. Пользуясь рисовальным аппаратом, тщательно зарисовать каждую хромосому на подобранной метафазной пластинке.

3. После того как контуры каждой хромосомы будут нанесены на бумагу, рисунок необходимо сверить с препаратом.

Задание 3. Определить митотическую активность ткани и продолжительность отдельных фаз митотического цикла.

1. Установить зону деления клеток и подсчитать число клеток в каждой фазе митотического цикла.

2. Определить митотический индекс MI в промилле (‰):

$$MI = \frac{(\Pi + M + A + T)}{I + \Pi + M + A + T} 1000,$$

где Π – число клеток в профазе, M – в метафазе, A – в анафазе, T – в телофазе, I – в интерфазе.

3. Полученные данные занести в табл. 3 и произвести расчет относительной длительности каждой фазы митоза. Например, для профазы этот показатель (%) вычисляется следующим образом:

$$\Pi = \frac{\Pi \cdot 100}{\Pi + M + A + T}.$$

Таблица 3. **Определение митотического индекса в зоне деления корешков лука**

| Номер поля зрения под микроскопом | Число клеток | | | | | Митотический индекс, ‰ |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|------------------------|
| | Профаза (П) | Метафаза (М) | Анафаза (А) | Телофаза (Т) | Интерфаза (И) | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

4.3. Изготовление временных ацетокарминовых препаратов из колеоптиле проросших злаков

В настоящее время широко применяется метод подсчета хромосом на препаратах, приготовленных из колеоптиле проросших семян. Молодые проростки предварительно фиксируют в уксусном спирте (упрощенный раствор Карнуа) и после отмывки от фиксатора хранят в 70 % спирте.

Материалы и оборудование: зафиксированные колеоптиле пшеницы, ячменя, ржи, овса; ацетокармин, 45 % уксусная кислота; микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие, спиртовка, спички, фильтровальная бумага, препаровальная игла.

Задание 1. Приготовить временный препарат из колеоптиле проросших семян злаковых.

1. На дно фарфоровой чашки налить раствор ацетокармина и поместить в него зафиксированные колеоптиле.

2. Окрашивание и мацерацию объекта произвести путем 3–4-кратного подогрева до кипения в ацетокармине в течение 5–6 мин.

3. Краситель слить из чашки. Колеоптиле промыть 2 раза 45 % уксусной кислотой.

4. На предметном стекле в капле 45 % уксусной кислоты отделить конус нарастания.

5. Отделенный конус нарастания накрыть покровным стеклом и деревянной палочкой раздавить объект.

6. Полученный препарат поместить на столик микроскопа и посмотреть его под микроскопом.

Задание 2. Выявить фазы митоза и подсчитать число хромосом в соматических клетках.

Найти клетки, которые находятся в метафазе, и подсчитать число хромосом, заполнить табл. 4.

Таблица 4. Число хромосом у некоторых культурных растений

| Культура | Число хромосом в клетках меристемы | Число пар гомологичных хромосом |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Рожь | | |
| Мягкая пшеница | | |
| Ячмень | | |
| Овес | | |
| Люпин желтый | | |
| Люпин белый | | |
| Люпин узколистный | | |
| Горох | | |
| Клевер луговой | | |
| и др. | | |

4.4. Кариотипы сельскохозяйственных культур. Кариограмма и идиограмма. Число хромосом

Каждому виду характерен свой кариотип – определенное постоянное число, форма и размеры хромосом. Хромосомы имеют свою морфологию, к которой относят: длину плеч, положение центромеры (кинетохора), наличие вторичной перетяжки, спутника и др. (рис. 42).

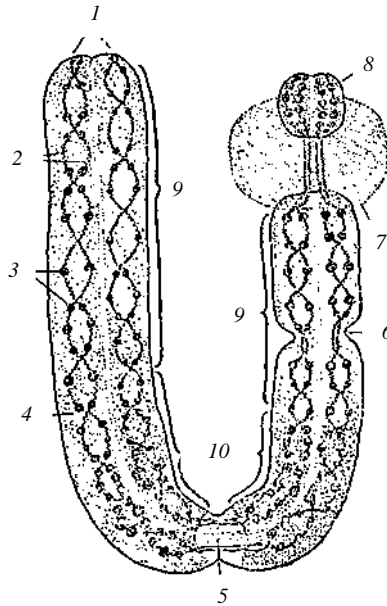


Рис. 42. Схема строения метафазной хромосомы:
 1 – хроматиды; 2 – хромонемы; 3 – хромомеры;
 4 – матрикс; 5 – первичная перетяжка с центромерой;
 6 – вторичная перетяжка; 7 – ядрышко;
 8 – спутник; 9 – эухроматиновые участки;
 10 – гетерохроматиновые участки

Для кариотипа постоянными являются нормальная длина каждой хромосомы и суммарная длина всех хромосом, а положение центромеры определяет морфологию хромосомы.

В зависимости от положения центромеры выделяют следующие типы хромосом:

1) метацентрические (*M*) – плечи примерно одинаковой длины, плечевой индекс 1,0–1,9;

2) субметацентрические (*S*) – плечи разной длины (2,0–4,9);

3) ацентрические (*A*) – центромера расположена вблизи одной из теломер (более 5);

4) головчатые (более 8) (рис. 43).

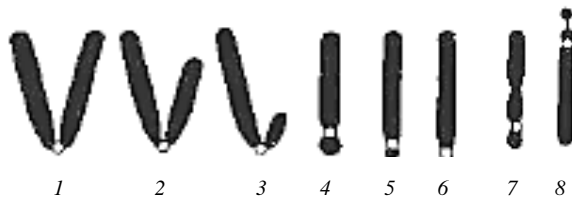


Рис. 43. Типы метафазных хромосом:
 1 – метацентрическая; 2 – субметацентрическая;
 3–5 – акроцентрические; 6 – телоцентрическая;
 6 – головчатая; 7 – акроцентрическая
 с вторичной перетяжкой; 8 – спутничная

Все хромосомы, входящие в кариотип, можно расположить в виде кариограммы – «раскладка» всех хромосом, входящих в кариотип тестируемого объекта, на бумаге путем подбора гомологичных пар и распределения по типам (в зависимости от положения центromеры) (рис. 44).

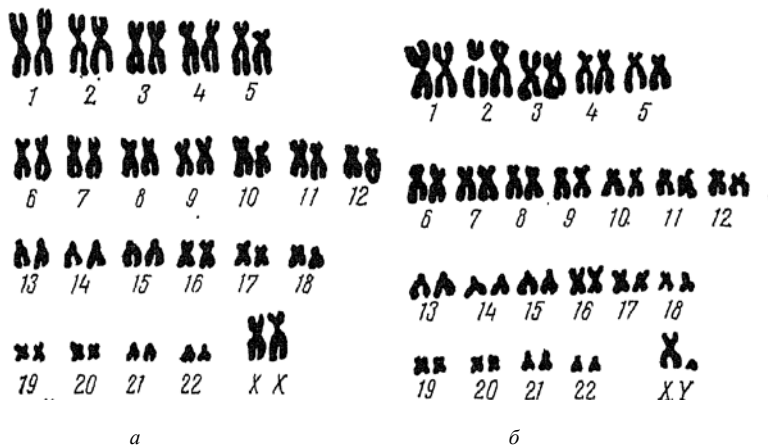


Рис. 44. Кариограмма хромосом человека ($2n = 46$):
 а – женские хромосомы; б – мужские хромосомы

Идиограмма – графическое изображение кариотипа с указанием размеров хромосом и особенностей их строения (систематизированный кариотип). Ее составление основано на измерении каждой хромо-

сомы, учете длин их плеч, положения центромер, вторичных перетяжек, спутников (рис. 45).



Рис. 45. Идиограмма сосны обыкновенной ($2n = 2x = 24$)

Материалы и оборудование: фотографии метафазных пластинок конских бобов (*Vicia faba*), ржи и других сельскохозяйственных культур; ножницы, клей, линейки, микрокалькуляторы.

Задание 1. Изучить число хромосом у растений.

Записать число хромосом основных видов культурных растений в табл. 5.

Таблица 5. Соматическое число хромосом у растений

| № п/п | Культура | Число хромосом |
|-------|------------------------------|----------------|
| 1 | Кукуруза (<i>Zea mays</i>) | 20 |
| 2 | и т. д. (более 20 культур) | |

Задание 2. Изучить кариотипы основных сельскохозяйственных культур, проидентифицировать хромосомы конских бобов (*Vicia faba*).

Порядок выполнения задания:

1. Рассмотреть фотографии хромосом основных сельскохозяйственных культур.

2. Вырезанные хромосомы наклеить на страницу тетради с расположением в один ряд путем подбора гомологичных пар и распределить их по типам (от больших к маленьким).

3. Выполнить замеры плеч с использованием миллиметровой бумаги или линейки.

4. Важнейшие показатели, установленные при замере хромосом, занести в табл. 6, 7.

5. Замерить абсолютную длину каждой хромосомы (L^A) в микрометрах.

Рассчитать следующие показатели:

1) относительную длину хромосомы, %:

$$L^F = \frac{\text{длина хромосомы}}{\text{длина всех хромосом ядра}};$$

2) плечевой индекс:

$$I^B = \frac{\text{длина длинного плеча хромосомы}}{\text{длина короткого плеча хромосомы}};$$

3) центромерный индекс, %:

$$I^C = \frac{\text{длина короткого плеча хромосомы}}{\text{длина всей хромосомы}};$$

4) индекс спирализации, %:

$$I^S = \frac{\text{суммарная длина двух коротких хромосом}}{\text{суммарная длина двух длинных хромосом}}.$$

Таблица 6. Показатели длин хромосом (культура)

| № пары гомологичных хромосом | № хромосомы | Длина хромосом, мкм | | |
|------------------------------|-------------|---------------------|---------------|----------------|
| | | общая | длинное плечо | короткое плечо |
| I | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| II | 3 | | | |
| | 4 | | | |
| III | 5 | | | |
| | 6 | | | |
| IV | 7 | | | |
| | 8 | | | |
| V | 9 | | | |
| | 10 | | | |
| VI | 11 | | | |
| | 12 | | | |
| и т. д. | | | | |

Таблица 7. Основные морфологические параметры хромосом (культура)

| № пары гомологичных хромосом | № хромосомы | Параметры | | | | |
|------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Абсолютная длина L^A , мкм | Относительная длина L^F , % | Плечевой индекс I^B | Центромерный индекс I^C , % | Форма хромосомы |
| I | 1 | | | | | |
| | 2 | | | | | |
| II | 3 | | | | | |
| | 4 | | | | | |
| III | 5 | | | | | |
| | 6 | | | | | |
| IV | 7 | | | | | |
| | 8 | | | | | |
| V | 9 | | | | | |
| | 10 | | | | | |
| VI | 11 | | | | | |
| | 12 | | | | | |
| и т. д. | | | | | | |

4.5. Изучение структурных изменений хромосом

Хромосомные перестройки, или хромосомные аберрации, возникают в результате одиночных или множественных разрывов хромосом или хроматид. Эти фрагменты способны соединяться друг с другом или с фрагментами других хромосом набора.

При восстановлении фрагментов одной и той же хромосомы порядок их расположения не нарушается, хромосома остается интактной и ее структура не меняется. Если воссоединения не происходит или первоначальный порядок расположения участков нарушается, то возникают хромосомные перестройки – делеции (потеря участка хромосомы), инверсии (поворот участка хромосомы на 180°), транслокации (соединение фрагментов двух разных хромосом), дупликации (удвоение участка хромосомы) (рис. 46).

В результате хромосомных перестроек могут возникать хромосомы с двумя центромерами (дидцентрические) и бесцентромерные (ацентрические) (рис. 47).

Однако не все типы хромосомных аберраций хорошо заметны морфологически, чаще всего наблюдаются так называемые мосты, бесформенные фрагменты (один-два).

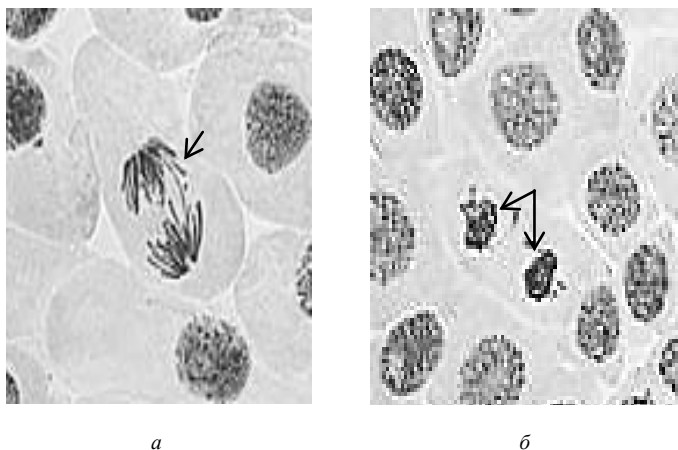


Рис. 46. Хромосомные перестройки: *а* – в центре клеточного поля видна делящаяся клетка в стадии анафазы (хроматидный мост и одиночный фрагмент хромосомы); *б* – в центральной делящейся клетке, находящейся в стадии телофазы, наблюдается парный фрагмент (*Allium cepa*)

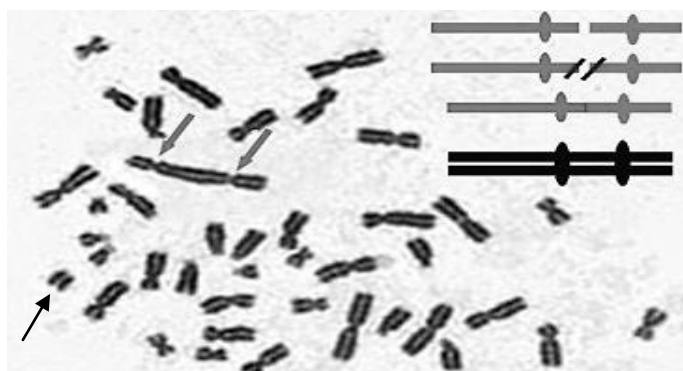


Рис. 47. Дидцентрические и ацентрические хромосомы

Материалы и оборудование: корешки лука (контрольные и после обработки мутагенами); микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие, препаровальная игла.

Задание 1. Ознакомиться со структурными изменениями хромосом, установить их тип и процент aberrаций у мутантов.

1. Семена лука замочить на двое суток при температуре 22–25 °С. При достижении корешками длины 5 мм обрабатывать их 0,1 % раствором колхицина в течение 6 ч (контроль оставить в воде) или 0,02 % раствором этиленimina.

2. После выдержки в мутагенах корешки зафиксировать фиксатором Карнуа (упрощенным), окрасить ацетокармином и приготовить давленные (временные) препараты.

3. В трех полях зрения у контрольных и обработанных мутагеном препаратов определить число хромосомных aberrаций, данные записать в табл. 8.

Таблица 8. Частота и тип aberrаций хромосом

| Вариант | Число клеток | | | | |
|------------------|---------------------------|---------------|----------|-----------|-----------------------|
| | с нормальными хромосомами | с фрагментами | | с мостами | с другими нарушениями |
| | | одиночными | двойными | | |
| Контроль | | | | | |
| Колхицин (0,1 %) | | | | | |

Задание 2. Определить количество aberrантных клеток (Ч, %), спектр aberrаций (К).

$$\text{Ч} = \frac{A \cdot 100}{B},$$

где А – число клеток с нарушениями;

В – общее число просмотренных клеток.

Если в одной клетке обнаружено несколько типов нарушений, то число клеток с нарушениями будет меньше общего числа aberrаций. Число aberrаций на клетку (или 100 клеток) устанавливают, разделив общее число aberrаций (С) на число просмотренных клеток (В).

Спектр aberrаций определяют в расчете на 100 клеток.

$$K = \frac{D \cdot 100}{B},$$

где Д – число aberrаций определенного типа (например, одиночных мостов).

4.6. Приготовление ацетокарминовых препаратов для изучения гигантских хромосом из слюнных желез личинок дрозофилы и хирономуса

Для изучения строения хромосом целесообразно использовать препараты гигантских хромосом из слюнных желез двукрылых; их можно изготовить из слюнных желез личинок дрозофилы, хирономуса (мотыля). Слюнные железы личинок дрозофилы или мотыля представляют собой парное мешковидное образование с общим выводным протоком. Характерной особенностью клеток слюнных желез является то, что в них происходит эндомитоз, т. е. деление клетки завершается на стадии умножения хромосомных нитей, а деления ядра (кариокинез) и цитоплазмы (цитокнез) – образования двух дочерних клеток, как при обычном митозе, – не происходит. В результате неоднократно повторяющихся эндомитозов в процессе развития личинки рост слюнных желез обеспечивается только за счет увеличения размеров ядер и самих клеток, число же их не меняется. Таким образом возникают так называемые гигантские – политенные (многонитчатые) хромосомы.

Материалы и оборудование: живой материал – культивируемые личинки дрозофилы или мотыля (личинка комара *chironomus*), постоянные препараты политенных хромосом личинки дрозофилы; физиологический раствор, 45 % уксусная кислота, краска (ацетокармин или ацетоорсеин); микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, препаровальные иглы, бинокулярная лупа (может быть заменена микроскопом с малым увеличением), фильтровальная бумага.

Задание. Рассмотреть на препарате (под микроскопом) строение гигантских хромосом слюнных желез мотыля, зарисовать набор гигантских хромосом.

Для того чтобы приготовить препарат гигантских хромосом, прежде всего следует извлечь сами слюнные железы.

1. На чистое предметное стекло в капельку физиологического раствора поместить самую крупную личинку. По движению определить головной отдел ее (личинка движется головой вперед).

2. Одну препаровальную иглу наложить на переднюю часть личинки, а другую – на середину ее (рис. 48, а).

3. Придерживая второй иглой личинку, первую иглу потянуть вперед и разорвать личинку. Вместе с оторванной головной частью личинки вытягивается пара прозрачных мешковидных образований (рис. 48, б).

Это и есть ее слюнные железы. Если с оторванной головной частью личинки мешки не вытягиваются, то приходится вынимать все органы передней части ее и в этой «кашице» искать слюнные железы.

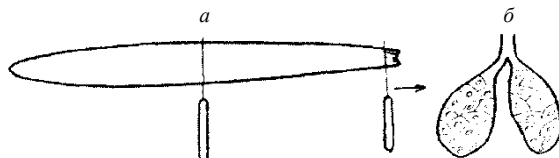


Рис. 48. Слюнные железы и их извлечение:
a – извлечение слюнных желез из личинки дрозофилы;
б – выделенные слюнные железы

4. Под предметное стекло подложить однотонную темную пластинку для того, чтобы прозрачные мешки слюнных желез были видны более отчетливо. От других структур железы можно отличить по наличию в них клеток с крупными ядрами, контуры которых хорошо заметны без всякой окраски.

5. Выделенные слюнные железы освободить от посторонней ткани и капнуть каплю красителя. Прикрыть чашкой Петри и оставить на 15–20 мин при температуре 37 °С (если работа проводится при комнатной температуре, то время окраски придется увеличить до 30 мин).

6. Окрашенные слюнные железы препаратальной иглой перенести на чистое обезжиренное предметное стекло в капельку 45 % уксусной кислоты, фильтровальной бумагой отсосать кислоту, затем капнуть несколько капель свежей уксусной кислоты (удалить лишнюю окраску).

7. Объект осторожно накрыть покровным стеклом. Фильтровальной бумагой осушить жидкость, выступающую за края покровного стекла. Затем накрыть препарат новой полоской фильтровальной бумаги, зафиксировать положение покровного стекла и тупым концом препаратальной иглы надавить на слюнные железы. Давить нужно довольно сильно, но так, чтобы не разбить стекло.

8. Изучить препарат под микроскопом. Должны быть видны длинные, окрашенные в розовый цвет клубки нитей гигантской хромосомы (рис. 49).

На рисунке видно, что центромерные (гетерохроматические) области всех хромосом объединены и образуют общий хромоцентр. От хро-

моцентра отходят четыре длинные нити (приблизительно равной длины). Это вторая и третья пары хромосом дрозофилы. От хромоцентра отходит также одна непарная хромосома (X-хромосома). Четвертую пару мелких, так называемых микрохромосом обычно не видно. Отчетливо прослеживается, что по всей своей длине хромосомы не однородны. Они состоят из светлоокрашенных и темноокрашенных дисков. Диски представляют собой эухроматические и гетерохроматические области гигантских полигенных хромосом.

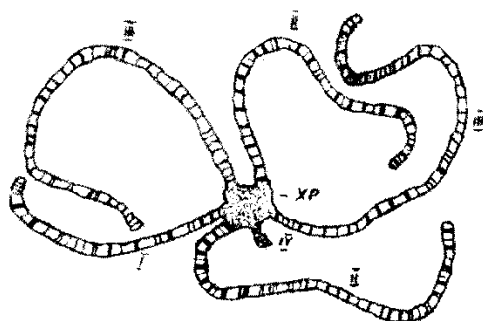


Рис. 49. Гигантские хромосомы слюнных желез дрозофилы: XP – хромоцентр; I, II, III, IV – соответствующие пары хромосом

Пользуясь фотографиями цитологических карт, можно идентифицировать все три пары хромосом. Следует отметить, что вместо восьми (четырех пар) хромосом мы видим только четыре. Это является результатом того, что в слюнных железах гомологичные хромосомы находятся на стадии сильной конъюгации, поэтому вместо пары гомологичных хромосом мы видим только одну хромосому.

Приготовленный препарат рассматривают при малом увеличении микроскопа (7×8).

В центре клетки, где хромосомы расправлены, легче обнаружить центромеру (хромоцентр) в виде более ярко окрашенного узла. От него отходят хромосомы. Следует рассмотреть детали строения при больших увеличениях (рис. 50).



Рис. 50. Часть гигантской политенной хромосомы слюнной железы мотыля (пуф отмечен стрелкой)

4.7. Изготовление временных ацетокарминовых препаратов для изучения мейоза

Мейоз – особый вид деления клетки, протекающего в материнских клетках микроспор и мегаспор. При мейозе число хромосом уменьшается вдвое, диплоидное ядро превращается в гаплоидное; в результате комбинаторики гомологов из разных пар и кроссинговера резко увеличивается комбинационная наследственная изменчивость организмов. Путем мейоза образуются споры, которые в дальнейшем дают начало мужскому гаметофиту (пыльце) и женскому гаметофиту (зародышевому мешку).

Мейоз состоит из двух циклов клеточного деления: первый приводит к уменьшению числа хромосом вдвое, второй идет по типу обычного митоза. Первое мейотическое деление включает профазу I, состоящую из лептономы, зигонемы, пахиномы, диплонемы. За профазой I наступает метафаза I, анафаза I и телофаза I. В результате образуются две клетки, ядра которых имеют гаплоидный набор хромосом. Затем две клетки после недолгой подготовки почти синхронно приступают к следующему делению. Второе деление включает профазу II, метафазу II, анафазу II и телофазу II. После двух делений из одной клетки с диплоидным набором хромосом образуются четыре клетки с гаплоидным набором.

Для приготовления временных препаратов используют специально зафиксированные в период микроспорогенеза соцветия пшеницы, ржи,

тритикале и других растений. Соцветия фиксируют целиком в упрощенном фиксаторе Карнуа (3:1) в течение 6 ч. После отмывки соцветий от фиксатора хранят их в 70 % спирте.

Материалы и оборудование: зафиксированные колосья пшеницы; ацетокармин, 45 % уксусная кислота; микроскоп, рисовальный аппарат, предметные и покровные стекла, препаровальная игла, фильтровальная бумага, спиртовка, спички, пинцет.

Задание. Приготовить временные препараты по мейозу и зарисовать все его фазы и стадии.

1. Из цветков соцветий пшеницы, ржи, овса пинцетом извлечь 2–3 пыльника.

2. Пыльники поместить на предметное стекло в каплю ацетокармина, раздавить препаровальной иглой, тщательно распределив по стеклу содержимое пыльника, стенки пыльника удалить со стекла.

3. Для лучшего окрашивания препарат подогреть на спиртовке два раза по 2 с.

4. С целью удаления избытка красителя на содержимое нанести каплю 45 % уксусной кислоты и накрыть покровным стеклом.

5. Препарат рассмотреть под микроскопом, найти соответствующие фазы мейоза и зарисовать их. Подсчитать число бивалентов в метафазе I мейоза.

6. Приготовить соответствующим образом препараты из средней и верхней части колоса пшеницы.

4.8. Изучение различных нарушений мейоза у отдаленных гибридов и амфидиплоидов

Наиболее часто встречаемыми нарушениями микроспорогенеза являются:

в интерфазе – двух- и многоядерность микроспороцитов; цитомиксис – миграция участка цитоплазмы с частью хромосом одного микроспороцита в другой;

в метафазе I – наличие истинных (одиночных), а также ложных (асинаптических и десинаптических) парных унивалентов вне экваториальной плоскости микроспороцита; расположение бивалентов вне экватора; обособление метафазных пластинок;

в анафазе I – истинные и ложные униваленты; лаггарды – неразделившиеся биваленты; обособление веретен деления; расщепление веретена деления; задержка расхождения хромосом к полюсам клетки, ведущая к образованию полиплоидных ядер;

в телофазе I – истинные униваленты; обособление чужеродных хромосом; образование микроклеток; цитокинез при незавершенном кариокинезе;

в профазе II – обособление микроядра; П II – М II – гетероцикличность, т. е. несовпадение ритмов деления в сестринских клетках диады микроспор;

в метафазе II – униваленты; М II – А II – гетероцикличность; метафаза и анафаза II; микроядра;

в анафазе II – униваленты; образование микроклеток полиад; расщепление веретена деления; А II – Т II – гетероцикличность;

в телофазе II – микроядра; образование полиад; гибель одной или нескольких клеток тетрады или полиады;

в тетраде микроспор – микроядра; триады; полиады и гибель клеток.

Материалы и оборудование: зафиксированные и окрашенные колосья гекса- и октаплоидных тритикале; 45 % уксусная кислота в капельницах; микроскопы с осветителями и трансформаторами, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, пинцеты, фильтровальная бумага.

Задание 1. Изучить особенности конъюгации хромосом у отдаленных гибридов и амфидиплоидов и научиться идентифицировать различные типы нарушений при микроспорегенезе.

В результате выполнения задания необходимо научиться идентифицировать:

1) изменение динамики синтеза ДНК и гистонов в клетках микроспорозитов;

2) нарушение премейотических митозов в археспории;

3) несовпадение ритмов деления хромосом у исходных видов;

4) несовместимость хромосом одного вида в цитоплазме другого вида;

5) инбредную депрессию мейотического деления хромосом перекрестника в клетке самоопылителя;

6) асинопсис и десинапсис бивалентов вследствие полного или частичного отсутствия гомологии между хромосомами;

7) нарушение действия генов, осуществляющих контроль за стабильностью мейоза.

Задание 2. Приготовить временные давленные препараты пыльников гекса- и октаплоидных тритикале.

1. Изучить особенности нарушений в разных фазах мейоза и подсчитать их частоту.

2. Оценить влияние набора хромосом на мейотическую стабильность тритикале.

3. Результаты занести в табл. 9.

Таблица 9. Анализ стабильности мейоза

| Образец | Фаза мейоза | Изучено клеток | Клетки с нарушениями | Процент нарушений |
|---------|-------------|----------------|----------------------|-------------------|
| | | | | |

4.9. Определение фертильности пыльцевых зерен

Пыльца, цветень – скопление пыльцевых зерен семенных растений. Пыльцевое зерно представляет собой мужской гаметофит, развивающийся в микроспорангии из микроспоры и выполняющий функцию опыления, т. е. оплодотворения женского гаметофита, находящегося в семязачатке. Пыльца развивается в пыльниках тычинок и может иметь различную форму (рис. 51).

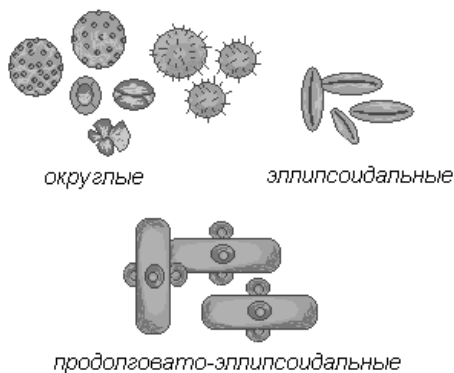


Рис. 51. Форма пыльцевых зерен

Нормально развитая пыльца имеет все необходимые компоненты (рис. 52).

Фертильной пыльцой считается такая пыльца, которая способна к оплодотворению, т. е. имеет мужские гаметы (спермии). Стерильная пыльца не имеет спермиев и не способна оплодотворить семязпочку.

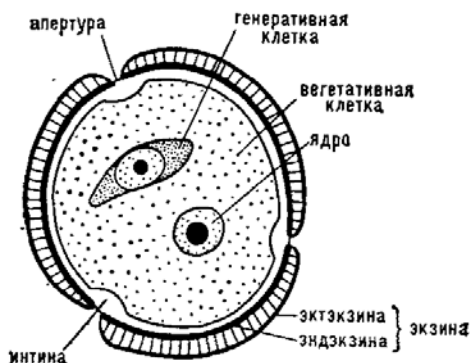


Рис. 52. Строение пыльца

Поэтому фертильность – это оплодотворяющая способность пыльцы или зиготический потенциал пыльцевого зерна, способного вызывать полное оплодотворение. Для определения фертильности пыльцы используют два метода: ацетокарминовый и йодный.

Материалы и оборудование: зрелые пыльники различных культур, фиксированные соцветия со зрелой пыльцой; ацетокармин, йодный раствор, 45 % уксусная кислота; микроскоп, предметные и покровные стекла, препаровальная игла, фильтровальная бумага.

Задание 1. Определить фертильность пыльцы различных культур ацетокарминовым методом.

1. Пыльники со зрелой пыльцой фиксировать от 30 минут до нескольких часов в упрощенном фиксаторе Карнуа (3:1), промыть и хранить в 80 % спирте.

2. Из спирта пыльник перенести на предметное стекло и раздавить в капле ацетокармина. Убрать лишние ткани, препарат накрыть покровным стеклом и осторожно подогреть на спиртовке.

3. Рассмотреть под микроскопом и подсчитать количество фертильных и стерильных пыльцевых зерен. У фертильных пыльцевых зерен зернистая цитоплазма и спермии окрашены в густой карминовокрасный цвет. Стерильные пыльцевые зерна почти не окрашиваются кармином или окрашиваются неравномерно. Их содержимое часто отходит от оболочки и находится на разных этапах гибели. Спермиев в таких пыльцевых зернах нет (рис. 53).

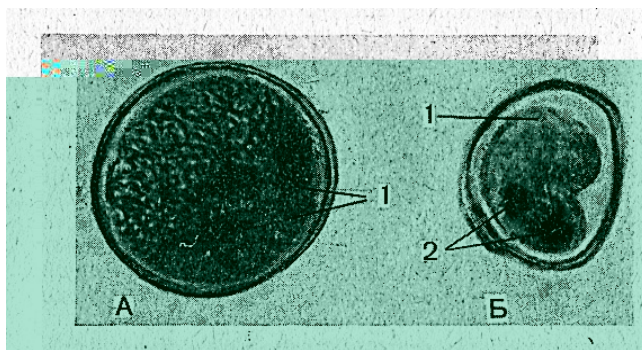


Рис. 53. Пыльцевые зерна пшеницы после окраски ацетокармином:
 А – фертильная пыльца (1 – спермии); Б – стерильная пыльца
 (1 – содержимое отошло от оболочки, 2 – погибшие вегетативное
 и генеративное ядра)

Указанные различия между фертильными и стерильными пыльцевыми зернами легко установить, если пыльца имеет тонкую экзину. Толстая экзина маскирует содержимое пыльцы. У многих видов растений спермии образуются не в пыльце, а в пыльцевых трубках во время их прорастания в столбике, и судить о фертильности приходится по относительному окрашиванию их содержимого. Кроме того, необходимо учитывать степень развития пыльцы. Так, например, в колосе пшеницы в одних цветках пыльцевые зерна несут спермии, а в других – незрелые пыльцевые зерна с одним-двумя ядрами. У отдаленных гибридов выделяют пять типов пыльцевых зерен: 1 – нормальные с одним ядром и двумя эллиптическими ядрами спермиев; 2 – почти нормальные с одним ядром и двумя эллиптическими ядрами спермиев; 3 – двухъядерные; 4 – одноядерные; 5 – abortивные или стерильные. Это еще больше усложняет анализ на определение фертильности, так как только первый тип обладает способностью к функционированию.

4. Результаты исследования пыльцевых зерен занести в табл. 10.

Таблица 10. **Определение фертильности и стерильности пыльцы различными методами**

| Объект исследования | Номер поля зрениа | Число пыльцевых зерен | |
|------------------------------|-------------------|-----------------------|------------|
| | | фертильных | стерильных |
| Ацетокарминовый метод | | | |
| | | | |
| Йодный метод | | | |
| | | | |

Задание 2. Определить фертильность пыльцы различных культур йодным методом.

В основе йодного метода лежит определение крахмала с помощью йодной реакции. Фертильные и стерильные пыльцевые зерна отличаются по содержанию крахмала: обычно фертильное пыльцевое зерно полностью заполнено крахмалом, а стерильное не имеет его совсем или содержит следы (рис. 54).



Рис. 54. Фертильные и стерильные пыльцевые зерна после окраски йодным методом (люцерна посевная)

1. Реактив приготовить следующим образом: в 5 мл дистиллированной воды растворить 2 г йодистого калия при нагревании, а затем добавить 1 г чистого йода и долить дистиллированной водой до 300 мл.

2. Зрелые пыльники вскрыть двумя иглами на предметном стекле, смочить йодным раствором и, удалив лишние ткани, накрыть покровным стеклом.

3. Под микроскопом рассмотреть их и определить фертильные пыльцевые зерна по темно-фиолетовому (почти черному) цвету, а стерильные – по отсутствию окраски (нет реакции с йодом, так как эти зерна не содержат крахмала или имеют следы его). Неокрашенными оказываются и оболочки пыльцевых зерен.

4. Подсчитать количество фертильных и стерильных пыльцевых зерен и результаты занести в табл. 10.

4.10. Определение жизнеспособности пыльцы

Жизнеспособность пыльцы – это свойство пыльцевых зерен сохранять способность к прорастанию.

Известно несколько методов определения жизнеспособности пыльцы в лабораторных условиях. Пыльцу либо проращивают на искусственной среде во влажной камере, либо определяют наличие в ней ферментов, связанных с жизненными процессами. Рассмотрим некоторые из них.

Определение жизнеспособности пыльцы методом П. И. Диакону.

О жизнеспособности пыльцы судят по наличию активных дыхательных ферментов дегидрогеназ, в присутствии которых бесцветный раствор 2,3,5-трифенилтетразола хлористого восстанавливается в формазан ярко-красного цвета. Погибшие пыльцевые зерна остаются бесцветными. Необходимы следующие препараты:

1) $1/15$ М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

2) $1/15$ М раствор KH_2PO_4 ;

3) фосфатный буфер Сёрнсена (рН 7,17); для его получения соединяют 70 мл $1/15$ М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 30 мл $1/15$ М раствора KH_2PO_4 ;

4) 0,5–0,1 % раствор 2,3,5-трифенилтетразола хлористого в $1/15$ М фосфатном буфере Сёрнсена с рН 7,17 (в качестве буфера используют раствор 3).

Пыльцу поместить в 1–2 капли 0,5–0,1 % раствора 2,3,5-трифенилтетразола хлористого в $1/15$ М фосфатного буфера Сёрнсена с рН 7,17, накрыть покровным стеклом и поставить в термостат при температуре 37°C на 20–30 мин. Под микроскопом просмотреть пять полей зрения в каждом из 3–5 препаратов. Окрашенные в красный цвет пыльцевые зерна отнести к жизнеспособным.

Метод дает четкие результаты при работе с многими сельскохозяйственными культурами.

Определение жизнеспособности пыльцы методом В. С. Шардакова основано на выявлении фермента пероксидазы в жизнеспособных пыльцевых зернах. В данном случае в присутствии бензидина живая пыльца (содержащая пероксидазу) окрашивается в ярко-розовый или темно-красный цвет. Погибшая пыльца не окрашивается. Недостаток данного метода заключается в том, что он дает завышенные результаты при исследовании хранившейся пыльцы.

Проращивание пылицы в камере Ван-Тигема основано на проращении жизнеспособной пылицы на питательной среде во влажной камере. Камера Ван-Тигема состоит из кольца длиной 5–7 мм, диаметром 10–12 мм. Кольцо с отшлифованными краями приклеивают парафином в центр предметного стекла. Верхний край смазывают вазелином, а внутрь него на дно наносят каплю воды. Сверху кольцо закрывают покровным стеклом, в центре которого помещена капля питательной среды с пылью (рис. 55).

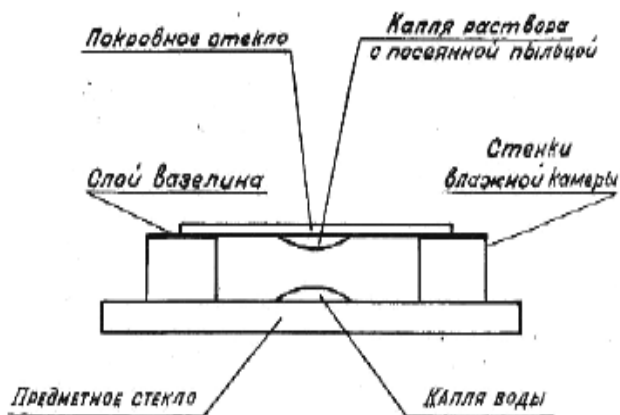


Рис. 55. Камера Ван-Тигема для проращивания пылицы

Определение жизнеспособности пылицы методом Д. А. Транковского. Для определения жизнеспособности пылицы широко применяют метод проращивания ее в искусственной среде, разработанный в 1929 г. профессором С. А. Транковским.

Пыльцу проращивают в 1 % растворе агар-агара с добавлением 10–15 % раствора сахарозы при комнатной температуре (20–25 °С). В этой среде хорошо прорастает пыльца гороха, вики, бобов, картофеля, томатов, лука, конопли, яблони и других культур (рис. 56).

Материалы и оборудование: цветущие растения; сахароагаровый раствор, дистиллированная вода; микроскоп, предметные и покровные стекла, чашки Петри, фильтровальная бумага, препаровальная игла.

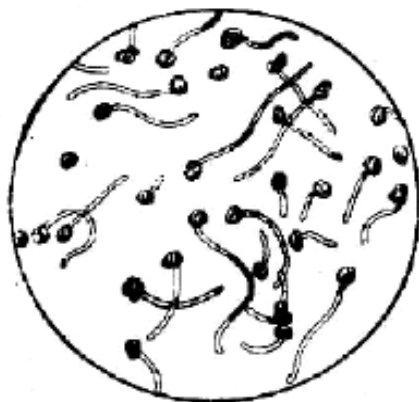


Рис. 56. Проросшая пыльца яблоки

Задание 1. Познакомиться с методикой приготовления раствора агар-агара с сахарозой.

Для приготовления 1 % агар-агара с сахарозой мелко нарезают сухой агар-агар, отвешивают 1 г, высыпают в колбу с 50 мл дистиллированной воды и ставят в термостат при температуре 40–60 °С на несколько часов для набухания. Затем готовят раствор сахарозы, для чего растворяют в 50 мл дистиллированной воды 10–15 г сахара. Растворы объединяют, ставят на водяную баню и доводят до кипения. Иногда добавляют раствор марганцовокислого калия или бромистого калия. В этом случае у некоторых культур (горох, кормовые бобы и др.) повышается процент проросшей пыльцы.

Готовый раствор наливают в чистую стерильную пробирку, закрытую пробкой, через которую пропущена стеклянная палочка. Пробирку помещают в сосуд с горячей водой.

Задание 2. Произвести посев и прорастить пыльцу на искусственной среде.

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю агар-агара с сахарозой. На эту каплю высевают пыльцу из зрелых пыльников изучаемого растения. Предметное стекло помещают во влажную камеру (чашку Петри, дно и крышка которой выложены смоченной фильтровальной бумагой). Чашку Петри для быстрого прорастания пыльцы помещают в термостат с температурой 20–25 °С на 30–60 мин.

Задание 3. Рассмотреть под микроскопом и сосчитать пыльцевые зерна проросшие, не проросшие и лопнувшие.

Чашку Петри по истечении указанного времени вынимают из термостата, достают покровное стекло, просматривают проросшую пыльцу под микроскопом и зарисовывают. В 3–5 полях зрения подсчитывают пыльцевые зерна, образовавшие пыльцевые трубки, а также непроросшие и лопнувшие зерна. Данные, полученные при подсчете, заносят в табл. 11.

Таблица 11. **Определение жизнеспособности пыльцы методом Д. А. Транковского**

| Культура, сорт | Число пыльцевых зерен | | |
|----------------|-----------------------|-----------|-------------|
| | всего | проросших | непроросших |
| | | | |
| | | | |

Вычислить процент жизнеспособной пыльцы по исследуемым культурам.

4.11. Спорогенез и гаметогенез

Образование половых клеток у высших растений происходит в два этапа: спорогенеза и гаметогенеза.

Спорогенез – процесс образования гаплоидных спор, в основе которого лежит мейоз. Спорогенез происходит в пыльниках и состоит из двух процессов: микроспорогенеза и микрогаметогенеза. Микроспорогенез – процесс образования микроспор в микроспорангиях (пыльцевых гнездах). Микрогаметогенез – развитие из микроспор мужского гаметофита, или пыльцевого зерна (рис. 57).

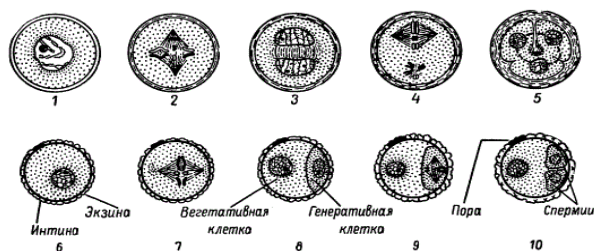


Рис. 57. Схема микроспорогенеза (1–6) и микрогаметогенеза (5–10) у растений: 1 – материнская клетка пыльцы; 2 – метафаза I; 3 – телофаза; 4 – метафаза II; 5 – тетрада микроспор; 6 – микроспора; 7–8 – деление микроспоры и образование вегетативной и генеративной клеток; 9–10 – деление генеративной клетки и образование двух спермиев

Гаметогенез, или предзародышевое развитие, – процесс созревания половых клеток, или гамет, который происходит в семязпочке, развивающейся в завязи. Гаметогенез состоит из двух процессов: мегаспорогенеза и мегагаметогенеза. Процесс образования в нуцеллусе семязчатка называется мегаспорогенезом, а процесс формирования женского гаметофита (зародышевого мешка) – мегагаметогенезом (рис. 58).



Рис. 58. Развитие мужского и женского гаметофитов у покрытосеменных растений

Материалы и оборудование: постоянные препараты, схемы, микрофотографии мужского гаметофита, женского гаметофита, зародышевых мешков; микроскоп.

Задание 1. Используя готовые микропрепараты, микрофотографии и схемы, изучить особенности процесса формирования мужского гаметофита различных представителей цветковых. Зарисовать разные стадии микрогаметогенеза у изученных цветковых растений.

Перед фиксацией пыльников (ржи, пшеницы и других культур) необходимо убедиться в том, что в данном соцветии идет микроспорогенез или микрогаметогенез, после чего фиксировать материал. Обычно у злаковых культур микроспорогенез протекает за 3–7 дней до

колошения, а микрогаметогеиз – через 2–5 дней после колошения. Проводят фиксацию по Навашину или Карнуа. Окрашивать препараты лучше всего гематоксилином по Гейденгайну или Феленгу.

Препараты необходимо тщательно рассмотреть под микроскопом и зарисовать этапы микроспорогенеза, протекающие по сукцессивному и симультанному типам. Затем рассмотреть под микроскопом и зарисовать препараты, в которых протекает мегаспорогенез.

Задание 2. Используя микрофотографии и схемы, ознакомиться с особенностями формирования женского гаметофита (макрогаметогенеза) у покрытосеменных растений, типами зародышевых мешков у цветковых растений. Зарисовать этапы формирования женского гаметофита у изученных растений.

Для изучения развития зародышевого мешка следует фиксировать пестики, взятые из цветков, которые находятся в разной степени развития: в бутонах, перед цветением, во время цветения и т. д. У пшеницы формирование зародышевого мешка начинается за 1–3 дня до колошения и заканчивается спустя 1–3 дня после колошения. Созревает он за 2–3 дня до цветения. У ячменя формирование зародышевого мешка заканчивается до колошения, у гороха – в бутонах.

Постоянные препараты рассмотреть внимательно под микроскопом и зарисовать этапы макроспорогенеза и сформировавшийся зародышевый мешок.

Особое внимание следует обратить на расположение и строение яйцеклетки, полярных ядер, клеток антипод.

4.12. Двойное оплодотворение у покрытосеменных растений

Процесс оплодотворения у покрытосеменных растений отличается от такового у всех других организмов наличием двойного оплодотворения, открытого в 1898 г. С. Г. Навашиным. Он впервые показал, что у покрытосеменных растений в пыльцевом зерне содержатся два спермия. При оплодотворении один из спермиев сливается с ядром яйцеклетки, другой – с ядром центральной клетки (или с полярными ядрами) (рис. 59).

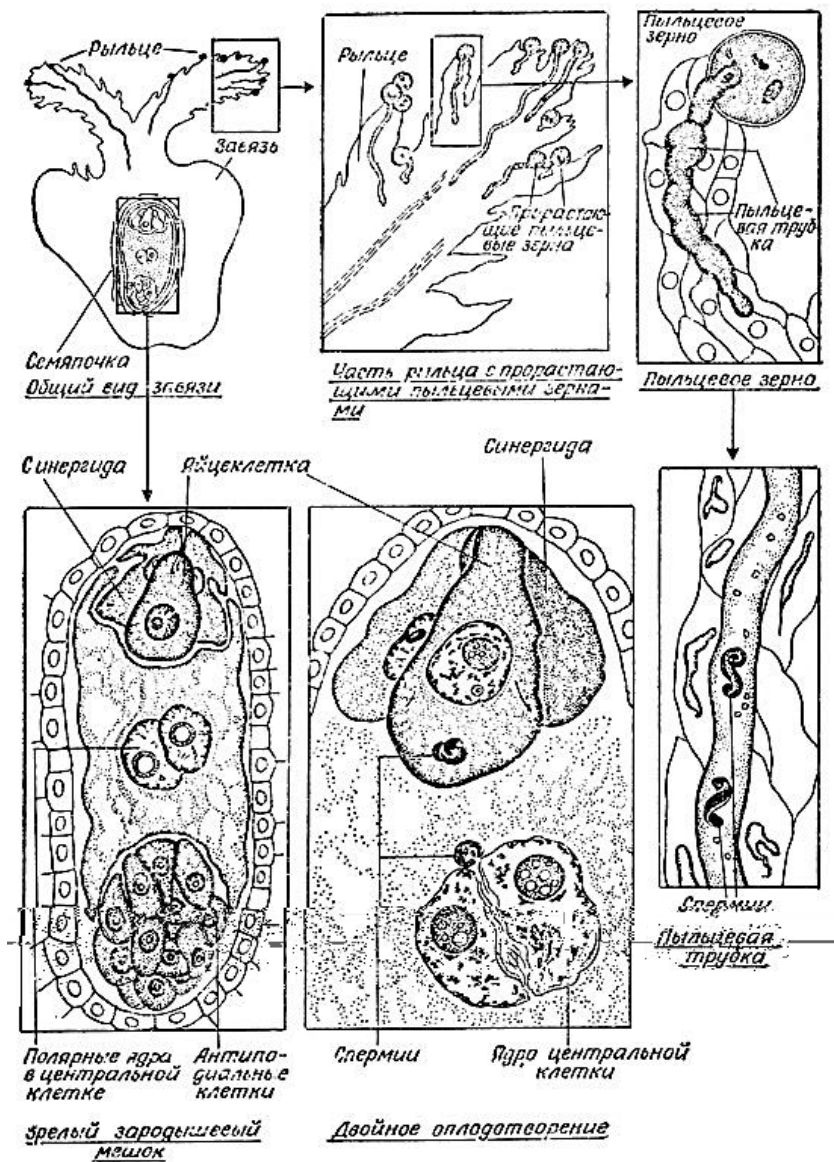


Рис. 59. Двойное оплодотворение у пшеницы

Процесс оплодотворения у покрытосеменных растений протекает следующим образом. На рыльце пестика прорастает довольно много пыльцевых зерен. Они образуют длинные пыльцевые трубки, которые вырастают в ткань рыльца пестика за счет вегетативной клетки. Однако не все из них продолжают расти дальше и достигают завязи. Проникая в зародышевый мешок через микропиле (у большинства растений), пыльцевая трубка изливает свое содержимое в одну из синергид. Высвобождается пара спермиев, и один спермий сливается с ядром яйцеклетки с образованием зиготы. В зиготе объединяется наследственная информация материнского и отцовского организмов и восстанавливается парность гомологичных хромосом. Путем митотических делений зигота превращается в зародыш семени, все клетки которого имеют диплоидный набор хромосом ($2n$). Второй спермий сливается с диплоидным ядром центральной клетки зародышевого мешка. От слияния этих ядер образуется первичное ядро эндосперма с триплоидным набором хромосом ($3n$). Процесс двойного оплодотворения у различных растений характеризуется своими особенностями.

Материалы и оборудование: постоянные препараты, микрофотографии и схемы процесса двойного оплодотворения; микроскоп.

Задание. Ознакомиться с методикой приготовления препаратов прорастающих пыльцевых трубок. Рассмотреть постоянные препараты и зарисовать зародышевые мешки во время оплодотворения.

Опыленное рыльце фиксируют в течение 1 ч в уксусном спирте (3:1). Для мацерации его помещают в горячий 45 % раствор уксусной кислоты при температуре 60 °С на 10–60 мин. Окрашивание проводят раствором, состоящим из 7,5 мл 2 % раствора сафранина, 1 мл 45 % раствора уксусной кислоты. Раствор нагревают до 75 °С и перед использованием фильтруют его. Рыльце перед окрашиванием осторожно расщепляют иглой. Окрашивают в течение 5–15 мин. Затем препарат раздавливают и изучают под микроскопом.

Прорастающие пыльцевые зерна на рыльце и в столбике хорошо наблюдать после окраски ацетокармином. Для этого готовят 45 % раствор ацетокармина с глицерином или молочной кислотой (1:1).

Опыленные столбики помещают в данный раствор, подогревают и изучают под микроскопом. Пыльцевые трубки хорошо выявляются раствором йода в йодистом калии.

4.13. Определение реальной и потенциальной продуктивности в ходе онтогенеза

Онтогенез (от др.-греч. *ontos* – сущий и *genesis* – зарождение) – индивидуальное развитие организма, совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований, претерпеваемых организмом, от оплодотворения (при половом размножении) или от момента отделения от материнской особи (при бесполом размножении) до естественной смерти.

Рассмотрим фазы развития и этапы органогенеза на примере пшеницы. Необходимо отметить, что озимая и яровая пшеницы имеют различия по биологии развития. У озимой пшеницы более длительный вегетационный период, поэтому она формирует более развитую вегетативную и генеративную сферы. Благодаря этому озимая пшеница более полно реализует свой потенциал урожайности. У пшеницы, как и у других зерновых, выделяют следующие фазы развития и этапы органогенеза:

1. Прорастание семян, всходы (1-й этап – дифференциация и рост зародышевых органов).

2. Третий лист, кущение (2-й этап – дифференциация основания конуса на зачаточные узлы, междоузлия и стеблевые листья; 3-й этап – дифференциация главной оси зачаточного соцветия и брактей – листьев верховой формации в зоне соцветия).

3. Начало выхода в трубку (4-й этап – образование конусов нарастания второго порядка).

4. Выход в трубку – начало стеблевания (5-й этап – закладка покровных органов цветка, тычинок и пестика; 6-й этап – формирование соцветия и цветка (микро- и макроспорогенез); 7-й этап – гаметогенез, рост покровных органов, удлинение члеников колосового стержня).

5. Колошение (8-й этап – завершение процессов формирования всех органов соцветия и цветков).

6. Цветение (9-й этап – оплодотворение и образование зиготы; 10-й этап – рост и формирование зерновки).

7. Налив семени, молочная спелость (11-й этап – накопление питательных веществ в зерновке).

8–9. Восковая и полная спелость (12-й этап – превращение питательных веществ в запасные).

Подсчет цветковых бугорков проводят на 4–6-м этапах органогенеза. На 6-м этапе идет усыхание, гибель цветков из-за недостатка питательных веществ, в результате часть зачаточных цветков рассасывается и эти вещества идут на рост и развитие растения.

Материалы и оборудование: фиксированные зачаточные колоски, зрелые колоски; микроскоп, препаровальная игла, пинцет, предметные стекла.

Задание 1. Изучить методику подготовки материала к фиксации.

Фиксация колосков проводится в фазе начала выхода в трубку – выхода в трубку (4–6-й этапы органогенеза), когда формирующийся колосок отошел от узла на 1,5–2,0 см. Фиксацию производят в 60 % растворе спирта и 4 % растворе формалина в соотношении 1:1.

Задание 2. Рассмотреть колоски под микроскопом. Подсчитать и зарисовать цветковые бугорки. Подсчитать количество колосков и зерен на созревших колосьях. Определить процент реализации потенциала продуктивности.

Освободить колосок от покровов. Поместить его на предметное стекло и рассмотреть под микроскопом. Подсчитать количество колосков и цветковых бугорков на каждом колоске. Составить схему (рис. 60).

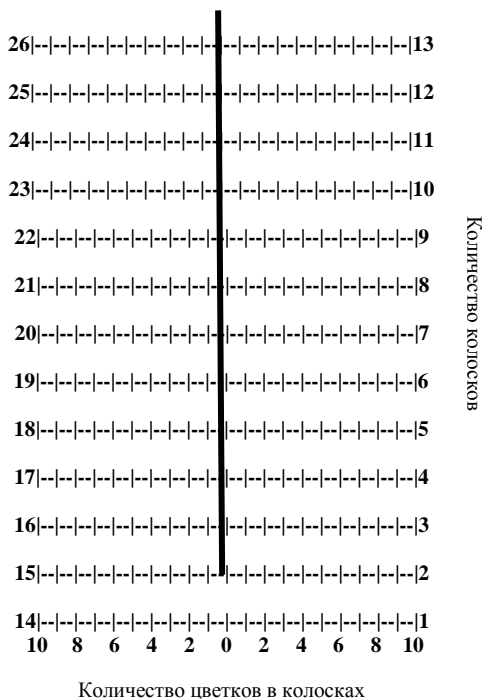


Рис. 60. Схема построения модели формирования продуктивности колосков

Полученные результаты занести в табл. 12.

Таблица 12. Результаты исследования по реализации потенциала продуктивности

| Культура, сорт | Номер колоса | Этапы органогеза | | | | Процент реализа- ции потенциала продуктивности | |
|-------------------|-----------------|------------------|------------------------------|---------------|-------------------------|--|--------------|
| | | 4–6-й этапы | | 12-й этап | | колос- ков | цвет- ков |
| | | колос- ков | цветко- вых бу- горков | колос- ков | цвет- ков (зерен) | | |
| 1 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| <i>n</i> | | | | | | | |
| Среднее | | | | | | | |

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абрамова, З. В. Практикум по генетике: учеб. пособие / З. В. Абрамова, О. А. Карлинский. – 3-е изд., доп. – Ленинград: Колос, 1979. – 192 с.
2. Абрамова, Л. И. Определение числа хромосом и описание их морфологии в мериостеме и пыльцевых зернах культурных растений: метод. указания / Л. И. Абрамова. – Ленинград: ВИР, 1988. – 62 с.
3. Атабекова, А. И. Цитология растений / А. И. Атабекова, Е. И. Устинова. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 246 с.
4. Генетика и селекция сельскохозяйственных культур: курс лекций / Г. И. Витко [и др.]. – Горки, 2015. – 210 с.
5. Генетика и селекция сельскохозяйственных культур: лаб. практикум: в 2 ч. / Г. И. Витко [и др.]. – Горки, 2015. – Ч. 1: Генетика. – 244 с.
6. Кабаян, Н. В. Биология клетки. Модуль 1 дисциплины «Общая биология»: учеб. пособие / Н. В. Кабаян, О. С. Кабаян. – Майкоп: Адыгейский гос. ун-т, 2011. – 51 с.
7. Кормопроизводство с основами ботаники: учеб. пособие / Н. П. Лукашевич [и др.]; под ред. Н. П. Разумовского. – Витебск: ВГАВМ, 2009. – 71 с.
8. Латыпов, А. З. Основы цитологии и цитологические методы: учеб. пособие / А. З. Латыпов, Г. И. Тарануха. – Горки, 1969. – 142 с.
9. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
10. Петрова, Н. Н. Цитология: метод. указания / Н. Н. Петрова, В. А. Двойнишников; Беларус. гос. с.-х. акад. – Горки, 2005. – 24 с.
11. Чухлебова, Н. С. Ботаника (цитология, гистология, анатомия): учеб. пособие / Н. С. Чухлебова, Л. М. Бугинова, Н. В. Ледовская. – Москва: Колос, 2007. – 148 с.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|-----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 3 |
| 1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И МЕТОДЫ ЦИТОЛОГИИ..... | 4 |
| 1.1. Основные этапы развития цитологии..... | 4 |
| 1.2. Клеточная теория и ее суть..... | 7 |
| 1.3. Классификация методов исследования..... | 9 |
| 2. СТРОЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ..... | 16 |
| 2.1. Отличительные особенности растительной клетки, ее строение, размер и форма..... | 16 |
| 2.2. Клеточная оболочка, ее строение, состав, функции..... | 19 |
| 2.3. Цитоплазма и органоиды клетки, их строение и функции..... | 22 |
| 2.4. Хромосомы..... | 33 |
| 2.5. Типы деления соматических и половых клеток..... | 37 |
| 2.6. Спорогенез и гаметогенез у растений..... | 47 |
| 2.7. Оплодотворение у растений и формирование семян..... | 50 |
| 3. МИКРОСКОПИЯ. МЕТОДЫ ЦИТОЛОГИИ..... | 57 |
| 3.1. Работа с микроскопом и вспомогательными устройствами к нему..... | 57 |
| 3.2. Способы подготовки к исследованию и методы изучения клетки..... | 66 |
| 4. МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВРЕМЕННЫХ И ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ..... | 69 |
| 4.1. Строение растительной клетки..... | 69 |
| 4.2. Техника изготовления временных ацетокарминовых препаратов для изучения митоза..... | 75 |
| 4.3. Изготовление временных ацетокарминовых препаратов из колеоптиле проросших злаков..... | 77 |
| 4.4. Кариотипы сельскохозяйственных культур. Кариограмма и идиограмма. Число хромосом..... | 78 |
| 4.5. Изучение структурных изменений хромосом..... | 83 |
| 4.6. Приготовление ацетокарминовых препаратов для изучения гигантских хромосом из слюнных желез личинок дрозофилы и хирономуса..... | 86 |
| 4.7. Изготовление временных ацетокарминовых препаратов для изучения мейоза.. | 89 |
| 4.8. Изучение различных нарушений мейоза у отдаленных гибридов и амфидиплоидов..... | 90 |
| 4.9. Определение фертильности пыльцевых зерен..... | 92 |
| 4.10. Определение жизнеспособности пыльцы..... | 96 |
| 4.11. Спорогенез и гаметогенез..... | 99 |
| 4.12. Двойное оплодотворение у покрытосеменных растений..... | 101 |
| 4.13. Определение реальной и потенциальной продуктивности в ходе онтогенеза... | 104 |
| БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК..... | 107 |