

ВЛИЯНИЕ ФИКСАТОРА БОУЭНА НА МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК ВОЛОСКОВ ТЫЧИНОЧНЫХ НИТЕЙ ТРАДЕСКАНЦИИ (МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ)

© 2019 г. А. Ю. Буданцев*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290, Россия

*E-mail: budantsev@mail.ru

Поступила в редакцию 23.08.2018 г.

После доработки 15.09.2018 г.

Принята к публикации 17.09.2018 г.

Показано, что фиксация клеток волосков тычиночных нитей традесканции (ВТНТ) в фиксаторе Боуэна (ФБ) приводит к значительным морфологическим артефактам. Клетки каждого ВТНТ условно разделяли на три группы – апикальные, срединные и базальные. Во всех группах клеток наблюдали сжатие цитоплазмы, наиболее сильно выраженное в базальных клетках. Фиксация приводит к обесцвечиванию клеток и везикуляции цитоплазмы. Хроматин ядра хорошо сохраняется. После фиксации в ФБ кроме сжатия цитоплазмы происходит сжатие клеточной стенки. Площадь поверхности и объем фиксированных апикальных клеток уменьшаются на 33 и 43%, срединных клеток – на 28 и 36% и базальных клеток соответственно на 15 и 2%. Отмечена высокая вариабельность значений объемов клеток контрольных и фиксированных образцов, наиболее сильно выраженная в группе апикальных клеток.

Ключевые слова: пикриновая кислота, фиксатор Боуэна, клетки волосков тычиночных нитей, артефакты, морфометрический анализ

DOI: 10.1134/S0041377119020020

Клетки волосков тычиночных нитей традесканции (ВТНТ) широко используются в клеточных исследованиях, в связи с тем, что: 1) они представляют собой удобный объект для изучения динамики и биохимической регуляции митотической активности клеток меристемного типа (Sitte, 1962; Larsen et al., 1991; Wolniak, Larsen, 1995; Molchan et al., 2002; Valster et al., 2003, и др.); 2) клетки ВТНТ очень чувствительны к действию ионизирующих и неионизирующих физических факторов и широко используются как клеточный тест в радиобиологических и экологических исследованиях (Осипова, Шевченко, 1984; Евсеева, Гераськин, 2001; de Azevedo Gomes et al., 2002; Cesniene et al., 2017, и др.); 3) ВТНТ легко препарируются, клетки ВТНТ долго сохраняют нативные характеристики в условиях *in vitro* и поэтому могут служить удобным контролем при изучении артефактов при фиксации “малоклеточных” растительных систем; 4) клетки ВТНТ представляют собой популярный объект для демонстрации струйного движения цитоплазмы в живых клетках и широко используются в образовательных программах (Braune et al., 1967; Ченцов, 1988). В перечисленных исследованиях обычно используются нативные ВТНТ. Однако для

приготовления постоянных цитологических препаратов и использования методов цито- и гистохимии необходимо провести ВТНТ через процедуры гистологического процессинга, который начинается с фиксации клеточного материала. Хорошо известно, что химическая фиксация сопровождается появлением морфологических артефактов (сжатие, набухание, изменение формы клеток и др.) и нарушением биохимических характеристик клеток (экстракция, ингибирование ферментов, изменение рН и др.) (Хиллман, 1975).

В данной работе представлены результаты изучения морфологических артефактов вызванных в клетках ВТНТ фиксацией в фиксаторе Боуэна (ФБ). Считается, что этот фиксатор хорошо сохраняет ядра и цитоплазму клеток. В предыдущей работе мы провели морфометрический анализ нефиксированных ВТНТ, результаты которого использованы как “контроль” оценки влияния ФБ на морфологию ВТНТ (Буданцев и др., 2018).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на *Tradescantia pallida*, выращенной в обычном цветочном грунте в условиях естественного освещения (апрель 2018 г.). Были изучены волоски из полностью раскрытых цветков (204 клет-

Принятые сокращения: ВТНТ – волоски тычиночных нитей традесканции, ФБ – фиксатор Боуэна.



Рис. 1. Общий вид контрольных (*a*) и фиксированных (*б*) клеток ВТНТ. 1 – апикальные клетки, 2 – срединные клетки, 3 – базальные клетки. Об. 40×.

ки). Волоски вместе с небольшим кусочком тычиночной нити помещали в **ФБ**: пикриновая кислота (насыщенный раствор) + формалин (40%) + ледяная уксусная кислота, 16 : 5 : 1 v/v (Sigma, США). Затем проводили инфильтрацию образцов (давление над фиксатором около 300 мм рт. ст.) в течение 10 мин. Фиксацию проводили при 8°C в течение 24 ч. После быстрой промывки в воде волоски переносили в микрокамеру и фотографировали на микроскопе Олимпус 71 цифровым фотоаппаратом Олимпус-330 (Япония). Для калибровки линейных и объемных характеристик использовали объект-микрометр ОМ-О. С помощью программы AnalySIS-Olympus измеряли и рассчитывали максимальную длину (L) и ширину (D) профиля клеток, отношение (L/D), площадь профиля клеток (SC) в контроле и после фиксации, а также площадь протопласта после фиксации (SP). Измерение объема (V) и площади поверхности клеток (S) проводили на объемных моделях клеток, построенных с использованием программы 3D-studio MAX (ver.5.0). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 (детали метода см.: Буданцев и др., 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитологические изменения клеток ВТНТ. Для анализа отбирали волоски, состоящие из 15–25 клеток. В каждом волоске клетки разделялись на три равные группы в среднем по 5–8 клеток – апикальные, срединные и базальные клетки. То, что прирост клеток в волоске происходит за счет митозов в 1–2 апикальных клетках (Ichikawa et al., 1969), позволяет считать, что апикальная группа состоит из “молодых клеток”, срединные клетки являются “зрелыми”, а базальные клетки представляют собой “старые клетки”. На рис. 1 представлены микрофотографии нативных (контрольных) и фиксированных клеток всех трех групп.

В клетках ВТНТ после фиксации наблюдается сжатие цитоплазмы, наиболее сильно выраженное в базальных клетках. Значения величины сжатия протопласта, рассчитанные как коэффициент сжатия $K2 = (SP/SC)$, приведены в табл. 1.

В фиксированных клетках сжатая цитоплазма имеет вид мелкой везикулярной сетки (рис. 2*a*), а в области контактной зоны между клетками наблюдаются тяжи, напоминающие нити Гехта (рис. 2*б*). Почти все контрольные клетки имеют интенсивный фиолетовый цвет (за счет присутствия антоцианов), а при фиксации клетки обесцвечиваются.

Морфометрический анализ. Микроморфометрические параметры нативных и фиксированных клеток ВТНТ приведены в табл. 1.

После фиксации в **ФБ** кроме отмеченного выше сжатия цитоплазмы наблюдается общее сжатие клеток, особенно в апикальной группе: площадь поверхности и объем клеток уменьшаются на 33 и 43% в отличие от срединных клеток (соответственно 28 и 36%) и базальных клеток (соответственно 15 и 2%). Величина коэффициента сжатия клеток – $K1$ ($K1 = SC_{\text{фиксатор}}/SC_{\text{контроль}}$) также показывает наиболее сильное сжатие апикальных клеток по сравнению со срединными и базальными клетками (соответственно 38, 29 и 11%). Сохраняется высокая вариабельность значений объемов клеток, так же как в контрольных клетках, наиболее сильно выраженная в группе апикальных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее полный обзор фиксирующего действия пикриновой кислоты на различные клетки приведен в монографии Дж. Бэйкера (Baker, 1958). Отмечается, что пикриновая кислота является коагулирующим кислым фиксатором, осаждающим нуклеопротеиды и не реагирующим с липидами и углеводами

Таблица 1. Микрометрические параметры клеток в контроле и после фиксации в фиксаторе Боуэна

Параметр	Контроль				Фиксатор Боуэна			
	<i>n</i>	$M \pm m$	σ	Var, %	<i>n</i>	$M \pm m$	σ	Var, %
Апикальные клетки								
$S, \text{мкм}^2 \times 10^3$	61	11.79 ± 0.35	2.74	23	91	7.93 ± 0.28	2.73	34
$V, \text{мкм}^3 \times 10^3$	61	113.61 ± 4.87	38.05	33	91	64.78 ± 3.59	34.24	53
$L, \text{мкм}$	63	76.40 ± 1.79	14.18	18	91	56.21 ± 1.27	12.14	21
$D, \text{мкм}$	63	50.41 ± 0.73	5.76	11	91	43.43 ± 0.83	7.88	18
L/D	62	1.53 ± 0.03	0.26	17	91	1.31 ± 0.03	0.29	22
$SC, \text{мкм}^2 \times 10^3$	63	3.30 ± 0.11	0.86	26	87	2.06 ± 0.05 K1 = 0.62	0.51	25
$SP, \text{мкм}^2 \times 10^3$					87	1.56 ± 0.04 K2 = 0.75	0.41	26
Срединные клетки								
$S, \text{мкм}^2 \times 10^3$	58	16.02 ± 0.31	2.40	15	111	11.56 ± 0.23	2.36	20
$V, \text{мкм}^3 \times 10^3$	58	167.52 ± 4.84	36.87	22	111	107.65 ± 3.23	34.04	32
$L, \text{мкм}$	58	99.71 ± 1.51	11.49	11	111	76.71 ± 0.86	9.05	12
$D, \text{мкм}$	58	52.59 ± 0.66	5.02	9	111	48.88 ± 0.67	7.04	14
L/D	58	1.91 ± 0.04	0.29	15	111	1.60 ± 0.03	0.31	19
$SC, \text{мкм}^2 \times 10^3$	58	4.58 ± 0.09	0.65	14	102	3.25 ± 0.04 K1 = 0.71	0.05	14
$SP, \text{мкм}^2 \times 10^3$					102	2.32 ± 0.03 K2 = 0.71	0.03	15
Базальные клетки								
$S, \text{мкм}^2 \times 10^3$	83	18.08 ± 0.40	3.69	20	122	15.61 ± 0.33	3.65	23
$V, \text{мкм}^3 \times 10^3$	83	198.46 ± 6.60	60.15	30	122	161.77 ± 5.29	58.39	36
$L, \text{мкм}$	83	107.51 ± 1.68	15.28	14	122	91.52 ± 1.29	14.29	16
$D, \text{мкм}$	83	54.13 ± 0.59	5.40	10	122	53.19 ± 0.63	6.93	13
L/D	83	1.99 ± 0.038	0.26	13	122	1.73 ± 0.02	0.23	13
$SC, \text{мкм}^2 \times 10^3$	83	5.14 ± 0.12	1.06	21	91	4.56 ± 0.09 K1 = 0.88	0.90	20
$SP, \text{мкм}^2 \times 10^3$					91	3.02 ± 0.08 K2 = 0.66	0.77	24

Примечание. S – Площадь поверхности клеток, V – объем клеток, L – длина клеток, D – максимальная ширина клеток, SC – площадь клетки, SP – площадь протопласта клеток после фиксации, n – число измеренных клеток, $M \pm m$ – среднее значение \pm ошибка средней величины, σ – среднеквадратичное отклонение, Var – коэффициент вариальности ($\text{Var} = (\sigma/M) \times 100\%$), K1 – коэффициент сжатия клеток ($SC_{\text{фиксатор}}/SC_{\text{контроль}}$), K2 – коэффициент сжатия протопласта (SP/SC фиксатор).

(но некоторые авторы рекомендуют использовать пикринсодержащие фиксаторы для фиксации гликогена). Хорошо известно, что пикриновая кислота вызывает коагуляцию белков за счет образования пикратов – нерастворимых в воде солевых соединений с аминогруппами в нейтральной и кислой средах (Шлейкин и др., 2015).

Обработка пикриновой кислотой приводит к небольшому уплотнению клеток и тканей, их сморщиванию или незначительному набуханию. В связи с тем, что белки, коагулируемые пикриновой кислотой, растворяются в воде, рекомендуется промывка

фиксированного материала в спирте. Пикриновая кислота окрашивает ткань в желтый цвет, поэтому ее остатки вымываются из тканей водным раствором карбоната лития. В наших опытах мы проводили быструю промывку фиксированных клеток в дистиллированной воде и сразу же их фотографировали, чтобы исключить дополнительное действие спирта.

В ФБ пикриновая кислота находится в смеси с формальдегидом и уксусной кислотой. Формальдегид и уксусная кислота являются некоагулирующими фиксаторами, формальдегид сшивает аминокислоты бел-

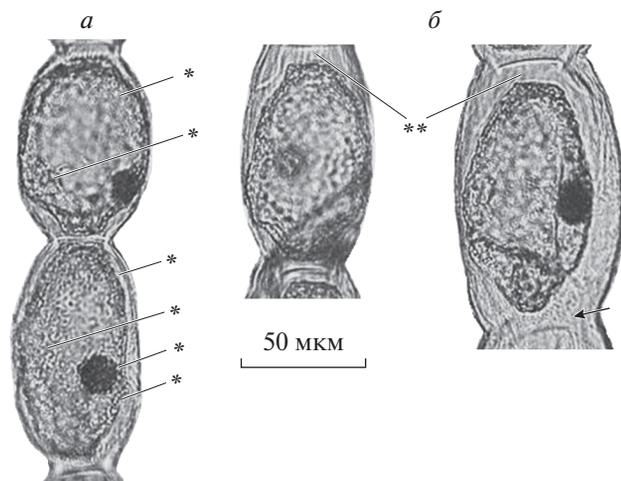


Рис. 2. Внутриклеточные структуры в срединных клетках ВТНТ после фиксации.

а – везикулярные структуры в цитоплазме (звездочки); *б* – нитевидные структуры, подобные нитям Гехта (звездочки), стрелкой отмечена срединная пластинка между соседними клетками волоска. Об. 40×.

ков метиленовыми мостиками (иммобилизация) и является сильным восстановителем. Химическое взаимодействие между компонентами ФБ не изучено.

Все три компонента ФБ с разной скоростью проникают в ткань: максимальная скорость у уксусной кислоты, средняя у формальдегида и наиболее низкая у пикриновой кислоты (Dempster, 1960; Буданцев, 2015). Струйное движение цитоплазмы в клетках ВТНТ прекращается в первые секунды фиксации, поэтому вряд ли разные скорости проникновения фиксирующих реагентов в клетки влияют на процесс их фиксации.

Везикуляция цитоплазмы после фиксации в ФБ, по-видимому, является общей реакцией на коагулирующие фиксаторы. При мониторинге действия разных коагулирующих фиксаторов на базальные клетки черешковых волосков томатов показано, что процесс фиксации сопровождается дезинтеграцией, везикуляцией цитоплазмы и остановкой ее движения (Mersey, McCully, 1978). К сожалению, артефакты, сопутствующие применению пикринсодержащих фиксаторов, в частности ФБ, на растительные клетки, практически не исследованы.

Представляют интерес результаты морфометрических характеристик трех групп клеток волосков. Из данных таблицы видно, что объем клеток апикальной группы сильно уменьшается в ФБ одновременно со сжатием цитоплазмы. Противоположная картина видна в срединных и базальных клетках: в них сильно выражено сжатие цитоплазмы на фоне небольшого уменьшения объема клеток. Для объяснения этого различия можно предположить, что пикриновая кислота и формальдегид приводят к изменению структуры клеточной стенки, увеличению

ее проницаемости (“утечки”) для воды, причем клеточная стенка “молодых” апикальных клеток более пластична по сравнению с клеточными стенками “старых” – срединных и базальных – клеток. Поэтому “утечка” воды из клеток при фиксации апикальных клеток приводит к одновременному сжатию клеточной стенки и цитоплазмы. В срединных и базальных клетках с более “жесткими” клеточными стенками, утечка воды приводит к небольшой деформации клеточной стенки и сильному сжатию и отслаиванию цитоплазмы от клеточной стенки. Изменение состава первичных клеточных стенок клеток в апикальной части корней отмечалось во многих работах. Например, Вайли и соавторы (Whaley et al., 1952) показали изменение содержания целлюлозы в клеточных стенках по мере “старения” апикальных клеток корешков кукурузы. Нами показано, что при фиксации апикальной части корешков лука в ФБ наблюдаются некоторое набухание апекса и мацерация внешних структур, но сжатие было незначительным (Буданцев, Демьянов, 2017).

Результаты данной работы показали, что фиксация малоклеточных систем в ФБ приводит к значительным морфологическим артефактам. Для фиксации растительных объектов типа волосков (также как одноклеточных и нитчатых водорослей и др.) необходима модификация как состава ФБ, так и протокола его использования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буданцев А.Ю. 2015. Гистологический процессинг. М.: Наука. 132 с. (*Budantsev A. Yu.* 2015. The histological processing. Moscow: Nauka. 132 p.)
- Буданцев А.Ю., Демьянов А.Ю. 2017. Деформация тканей в ходе химической фиксации. II. Действие формальдегида и спиртсодержащих фиксаторов на апикальную часть корней лука. Цитология. 59 (6): 447–454. (*Budantsev A. Yu., Demyanov A. Yu.* 2017. Deformations of tissue at chemical fixation. II. Action of formaldehyde and spirit-fixative on anion roots apexes. *Tsitologiya.* 59 (6): 447–454.)
- Буданцев А.Ю., Демьянов А.Ю., Погорелова М.А. 2018. Микрометрический анализ клеток волосков тычиночных нитей традесканции. Цитология. 60 (8): 653–658. (*Budantsev A. Yu., Demyanov A. Yu., Pogorelova M. A.* 2017. Micrometric analysis of stamen hair cells of *Tradescantia*. *Tsitologiya.* 60 (8): 653–658.)
- Евсеева Т.И., Гераськин С.А. 2001. Сочетанное действие факторов радиационной и нерадиационной природы на традесканцию. Екатеринбург: УрО РАН. 156 с. (*Evsheeva T. I., Geraskin S. A.* 2001. Combined action of factors of radiation and nonradiation nature on *Tradescantia*. Ekaterinburg: Ural Department RAS. 156 p.)
- Осипова Р.Г., Шевченко В.А. 1984. Использование традесканции (клоны 02 и 4430) в исследованиях по радиационному и химическому мутагенезу. Журнал общей биологии. 45 (2): 226–232. (*Osipova R. G., Schevchenko V. A.* 1984. Using of *Tradescantia* (02 and 4430 clones) in radioactivity and chemical mutagenese. *Biological J.* 45 (2): 226–232.)

- Хиллман Г. 1975. Определенность и неопределенность в биохимических методах. М.: Мир. 156 с. (Hillman H. 1972. Certainty and uncertainty in biochemical techniques. New York: Ann Arbor Sci. Publ. Inc. 156 p.)
- Ченцов Ю.С. (Ред.). 1988. Практикум по цитологии. М.: Изд-во МГУ. 293 с. (Chencov Yu.S. (Ed.) 1988. Cytological practicum. Moscow: Moscow State Univ. 293 p.)
- Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. 2015. Биохимия. Лабораторный практикум. Ч. 2. СПб.: Изд-во УН-та ИТМО. 106 с. (Schleykin A.G., Skvorcova N.N., Blandov A.N. Biochemistry. Laboratory handbook. Part 2. St. Petersburg: University ITMO Press. 106 p.)
- Baker J. 1958. Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. London: Methuen. 61–65.
- Braune W., Leman A., Taubert H. 1967. Pflanzenanatomisches Praktikum. Jena: Veb G. Fiascher Verlag. 331 p.
- Cesniene T., Kleizaite V., Bondzinskaite S., Taraskevicius R., Zvingila D., Siuksta R., Rancelis V. 2017. Metal bioaccumulation and mutagenesis in a *Tradescantia* clone following long-term exposure to soils from urban industrial areas and closed landfills. Mutat. Res. Gen. Tox. En. 823: 65–72.
- de Azevedo Gomes H.A., Nouailhetas Y., Carlos de Silva N., Mezrahi A., Bonacossa de Almeida C.E., Rodroques G.S. 2002. Biological response of *Tradescantia* stamen hair to high levels of natural radiation in the Pocos de Caldas Plateau. Brazilian Arch. of Biol. and Technol. 45: 301–307.
- Dempster W.T. 1960. Rates of penetration of fixing fluids. Amer. J. Anat. 107: 59–72.
- Ichikawa S., Sparrow A.H., Thompson K.H. 1969. Morphologically abnormal cells, somatic mutations and loss of reproductive integrity in irradiated *Tradescantia* stomaten hairs. Radiat. Botany. 9: 195–211.
- Larsen P.M., Chen T.-L.L., Wolniak S.M. 1991. Neomycin reversibly disrupts mitotic progression in stamen hair cells of *Tradescantia*. J. Cell Sci. 98: 159–168.
- Mersey B., McCully M.E. 1978. Monitoring of the course of fixation of plant cells. J. Microscopy. 114: 49–76.
- Molchan T.M., Valster A.H., Hepler P.K. 2002. Actomiosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. Planta. 214: 683–693.
- Sitte P. 1962. Polarisationsmikroskopie der Mitose *in vivo* bei Staminalhaarzellen von *Tradescantia*. Protoplasma. 54: 560–572.
- Valster A.H., Vidali L., Hepler P.K. 2003. Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. Protoplasma. 222: 85–95.
- Whaley W.G., Mericle L.W., Heimsch C. 1952. The wall of the meristematic cell. Amer. J. Botany. 39: 20–26.
- Wolniak S.M., Larsen P.M. 1995. The timing of protein kinase activation events in the cascade that regulates mitotic progression in *Tradescantia* stamen hair cells. Plant Cell. 7: 431–445.

THE MORPHOLOGY OF HAIR STAMEN CELLS OF *TRADESCANTIA* AFTER BOUIN'S FIXATIVE (MORPHOMETRIC ANALYSIS)

A. Yu. Budantsev*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino, 142290, Russia

*e-mail: budantsev@mail.ru

It is shown that the fixation of the hair cells of the stamens of *Tradescantia* using Bouin fixative leads to significant morphological artifacts. The cells of each stamen filament were conventionally divided into three groups: apical, median and basal cells. In all groups of cells, compression of the cytoplasm occurs, most strongly in the basal cells. Fixation leads to discoloration of cells and cytoplasmic vesiculation. The chromatin of the nucleus is well preserved. After fixation in Bouin fixative, in addition to compression of the cytoplasm, the cell wall is compressed. In the apical group, the surface area and cell volume decreases by 33 and 43%, in median cells by 28 and 36% and in basal cells by 15 and 2%, respectively. A high variability in the volumes of and fixed samples, the most pronounced in the group of apical cells, was noted.

Keywords: picric acid, Bouin fixative, cells of hairs of stamen filaments, artifacts, morphometric analysis