

менении буферных растворов красителей с рН 6,55 и ацетона можно окрашивать до 100—120 мазков гемолимфы (5—6 партий стекол), без замены красящей смеси. Получен хороший результат окрашивания мазков гемолимфы чешуекрылых через 24 часа после приготовления раствора краски.

Применение растворов краски с низкими значениями рН (рН 5,5) предотвращает выпадение осадка. Однако на мазках преобладают красные и розовые тона, которые часто не позволяют четко дифференцировать патологические и нормальные клетки.

Более четко окрашивается хроматин ядра и цитоплазмы гемоцитов при окраске мазков гемолимфы насекомых краской азур-эозина на фосфатном буфере с рН 6,55 в присутствии небольших количеств ацетона. Раствором краски азур-эозина на фосфатном буфере (рН 6,55) с добавлением ацетона мы пользовались в течении ряда лет для окрашиваний мазков гемолимфы и всегда получали хорошие результаты. При использовании такого раствора краски получается безукоризненная даже на мазках 5—6-й партии стекол, и, главное, всегда одинаковая окраска. Структура ядра гемоцитов проявляется чрезвычайно ясно, компактные хроматиновые зерна окрашиваются в темно-фиолетовый или фиолетово-красный цвет. Цитоплазма молодых клеток и энцитондов окрашивается в зависимости от возраста и физиологического состояния клеток в фиолетовый цвет различной плотности. Энцитонидная зернистость приобретает интенсивный фиолетовый цвет, эозинофильные гранулы — темно-красные.

Применение этого метода позволяет четко определить ранние некроботические изменения в гемоцитах, поскольку при этом обычный темно-фиолетовый цвет цитоплазмы азурофильных гемоцитов явно меняется на синий и четко выявляются вакуоли различных величин, а темно-красные хроматиновые зерна ядра становятся розовыми. Гранулы эозинофила, окруженные мембраной, распадаются на мелкие зерна («зернистое перерождение»), содержимое диффундируется из клетки и подвергаются вакуолизации. У таких гемоцитов, вслед за вакуолизацией цитоплазмы, обычно наблюдается цитоллиз или хроматинолизис.

Агростанция УСХА

Поступила в редакцию
19.II 1979 г.

УДК 631.652.111

В. С. Михайлюков

ОРГАНИЗАЦИЯ МАССОВОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТОТАЛЬНЫХ ГЛИЦЕРИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НЕМАТОД

При фаунистических исследованиях, испытании действия нематцидов на фитонематод различных видов приходится готовить сотни и даже тысячи тотальных препаратов нематод для определения в дальнейшем их видовой принадлежности, изучения морфологических особенностей.

Мы изготовляли глицериновые препараты нематод, взяв за основу метод Сайнхорста (Seinhorst, 1959). Он заключается в том, что предварительно зафиксированные нематоды помещаются на 12 часов при температуре 35—40° С на часовые или предметные стекла с углублением в смесь 96%-ного этилового спирта, глицерина и дистиллированной воды в соотношении 20:1:79 (смесь I). Стекла помещаются в плотно закрытые банки, на дно которых налито некоторое количество спирта. В атмосфере, насыщенной парами спирта, испарение его со стекол замедляется, что положительно влияет на качество препаратов. Затем на стекла с нематодами наносится капля новой смеси глицерина со спиртом в соотношении 5:95 (смесь II). На этот раз они помещаются в частично прикрытые чашки Петри при температуре 40°. При этой температуре спирт полностью испаряется за 3 часа, и нематоды готовы к заделыванию в глицерин на постоянное хранение.

При работе по описанной методике мы натолкнулись на ряд трудностей. На вылавливание 50 нематод (такое количество нематод мы помещали на препарате) из фиксирующей смеси под микроскопом МБС-2 и на перенос их на стекло затрачивается, обычно, в зависимости от квалификации лаборанта и количества нематод в пробе, от 10 мин до получаса. За это время спирт со стекла в значительной мере или полностью испаряется, что приводит к деформации нематод. Точно придерживаясь указанных в методике экспозиций в спирто-глицериновых смесях I и II и температур очень трудно, а при массовом материале практически невозможно. Кроме того, перенос нематод с часового или со стекла с углублением на обычное предметное стекло требует дополнительных больших затрат труда. Мы не отказались от этой методики, позволяющей получать хорошие одиночные препараты, но приспособили ее для массового приготовления препаратов.

Из фиксирующей смеси нематод переносили на обычное предметное стекло в каплю дистиллированной воды, следя за тем, чтобы она полностью не высыхала. После этого на предметное стекло с незначительным количеством воды и находящимися в ней нематодами наносили каплю спирто-глицериновой смеси I. Стекла по мере приготовления, помещали в обычный эксикатор, на дно которого наливали 250—300 мл этилового спирта. Первый десяток стекол клали на фарфоровый поддон эксикатора, в котором имеются довольно широкие отверстия. Затем на него же, вдоль стенок эксикатора помещали кольцевую прокладку из тонкого резинового шланга, а на шланг — металлическую сетку. На сетку снова можно класть предметные стекла. Размеры эксикатора позволяют «возводить» 5—6 «этажей».

Благодаря «многоэтажности», вместимость одного эксикатора составила 50—60 стандартных стекол, что на один рабочий день было вполне достаточно.

Стекла находились в эксикаторе до следующего дня при комнатной температуре. После этого на них наносили каплю спирто-глицериновой смеси II и стекла переносили в другой такой же эксикатор, а первый освобождался для вновь приготавливаемых препаратов. Нематоды в смеси II находились в эксикаторе 20—25 часов, затем препараты бегло просматривали под микроскопом МБС-2, расплывшихся на стекле нематод размещали более компактно и наносили каплю чистого глицерина такого размера, чтобы избыток его не вытеснялся из-под покровного стекла. Покровное стекло окантовывали канадским бальзамом или клеем БФ-6. После такой проводки нематод можно заключать и в глицерин-желатин.

Несколько позже мы усовершенствовали описанную методику. Перед чистым глицерином мы стали помещать нематод еще в одну смесь спирта с глицерином (1 : 1), а препараты нематод в чистом глицерине (без покровного стекла) помещали на сутки в четвертый эксикатор с хлористым кальцием для полного обезвоживания, что применял в своей работе де Грисс (Griss, 1969). У этого же автора мы заимствовали для приготовления препаратов метод «парафиновых колец». Нагретую металлическую трубку слегка погружали в парафиновый блок и быстро отпечатывали парафиновое кольцо на чистое предметное стекло. Кольцо не позволяет жидкости растекаться по стеклу. На кольцо кладут покровное стекло, и препарат осторожно подогревают на пламени спиртовки до расплавления парафина. Затвердевший затем парафин надежно удерживает покровное стекло и препараты не нуждаются в окантовке.

Описанный метод изготовления тотальных глицериновых препаратов нематод позволил наладить четкую ритмичную, не зависящую от жестких временных и температурных параметров, производительную работу при высоком качестве.

De Grisse A. T. Redescription on modifications de quelques techniques utilisees dans l'etude des Nematodes phitoparasiteires.— Mededl. Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen te Gent, 34, 1969, p. 351—369.

Seinhorst J. W. A rapid method for the transfer of nematoden from fixative to anhydrous glycerin.— Nematologica, 1959, 4, p. 67—69.

Украинский
н.-и. институт садоводства

Поступила в редакцию
29.III 1978 г.