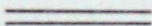


С. В. Лебедев и В. П. Чехов.

**ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ КОРНЕЙ
САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ.**



Изменения структуры корней сахарной свеклы при замораживании.

Широкое распространение культуры сахарной свеклы, как на Запад—в Сев. Америку, так и на Восток—в Сибирь, и стремление к организации здесь сахарной промышленности ставят перед последней ряд новых задач и вопросов. При этом те и другие возникают как в области свеклосеяния и связанного с ним сельского хозяйства, так и в отношении производственном, т. е. в смысле условий переработки сахарной свеклы. В том и другом случае в Сибири приходится считаться с характерными особенностями ее климата и в частности с резко выраженной континентальностью его. Причем для свеклосеяния Сибири в этом случае главным фактором оказывается краткость вегетационного периода, тогда как в отношении заводской переработки наибольшее значение здесь должны, видимо, иметь большая длительность Сибирской зимы и необычные для сахарных районов низкие температуры.

До настоящего времени в долгий период лет шла упорная борьба за самую идею Сибирской сахарной промышленности, сосредоточиваясь, главным образом, на вопросе о возможности в Сибири промышленной культуры сахарной свеклы. Теперь этот вопрос уже решен, при том положительно, но вместо него выдвигаются новые вопросы иного производственного порядка. При этом прежде всего привлекает к себе внимание выбор способа хранения свеклы, пригодного для Сибири. Очевидно, что в условиях Сибирской зимы с температурами, доходящими до $-30, -40^{\circ}$, обычные способы хранения свеклы в закрытых кагатах с обязательными заботами о поддержании в них определенной температуры выше 0° мало применимы, так как случайные в условиях современных европейских свеклосахарных районов нежелательные эпизоды замораживания свеклы в таких кагатах, для Сибирских сахарных заводов делаются обычными и даже неизбежными в наиболее холодные месяцы зимы. Смысл и значение этого обстоятельства определяется общеизвестным положением о том, что мерзлая свекла представляет собою в условиях сахарной промышленности глубоко руинированное сырье, чрезвычайно затрудняющее заводскую работу вообще и особенно при сокодобывании. При таких условиях для сибирской сахарной промышленности выдвигается задача или выработать новые методы хранения с отоплением хранимой свеклы или же следовать предложению проф. Лебедева, выдвинутому им для Алтайского сахарного завода еще в 1916 году—хранить свеклу в замороженном состоянии в открытых кагатах.

Эта идея исходила из следующих соображений:

- 1) Из технической и экономической трудности в условиях сибирских холодов поддерживать миллионы пудов перерабатываемой заводом свеклы при температурах выше 0° .
- 2) Из отсутствия в Сибири зимних оттепелей и, наконец,

3) Из того, что замораживание свеклы по общеизвестному положению о связи дыхания, потерь сахара и температуры свеклы позволит траты сахара последней свести до минимума, одновременно устраняя различные неблагоприятные изменения несахаров свеклы, неизбежные при хранении ее с температурой выше нуля.

Хотя приведенная идея замораживания свеклы логически вполне правильна для Сибири, однако, для ее проведения в жизнь сахарной промышленности необходимо выяснение еще ряда вопросов, касающихся возможных биологических, химических, структурных и других изменений, какие может претерпеть корень сахарной свеклы при хранении его в замороженном виде за время сибирской зимы. Значение этих вопросов очень существенно как со стороны задач производства, которому придется иметь дело с такого рода сырьем, так и в отношении хранения самой мороженой свеклы не столько во время зимних устойчивых морозов, сколько в период конца зимы и начала весны, когда оттепели становятся уже вполне закономерным явлением и при сибирском климате, и когда вполне нормально даже не подвергавшаяся замораживанию свекла начинает испытывать на себе напор, как внутренних, так и внешних разрушающих ее сил. Очевидно, что влияние последних на свеклу, промерзшую зимою, должно быть иным, чем на свежую. Притом эффект нового воздействия будет определяться степенью и характером тех изменений, которые явились результатом зимнего промерзания свеклы.

В связи с этим следует ожидать, что в условиях сибирской зимы влияние холода на хранимую свеклу будет резко отличным от того, что обычно имеет место в этом отношении в условиях наших и западно-европейских старых свеклосахарных районов в более мягком, чем Сибирь климате. Это говорит за то, что мерзлая свекла будущих Сибирских сахарных заводов будет по своим свойствам совершенно новым, неизвестным сахарной промышленности сырьем.

Очевидно, что успех заводской переработки такого сырья потребует знания его свойств и особенностей. Таким образом, изучение тех изменений, какие претерпевает корень сахарной свеклы при его замораживании в зимний период в условиях сибирского климата является одной из существенных и ответственных задач организации сибирской сахарной промышленности, срочность которой определяется идущей уже постройкой сахарного завода на Алтае, и тем, что до сего времени вопрос этот остается совершенно незатронутым, и настоящая работа является в этом направлении первым шагом.

Один из основных вопросов в данном случае лежит в выяснении того—оказываются ли клетки ткани свекловичного корня после его промораживания живым или же мертвыми, а кроме того—целы ли они или разрушены. Это должно интересовать с различных сторон: во первых, в отношении условий хранения мерзлой свеклы, особенно в весенний период, во вторых, относительно методики сокодобывания вообще и в частности относительно температурного режима, темпа работы и прочих условий на заводской диффузионной батарее.

Подчеркивая необходимость и значение изучения свойств структуры и прочих особенностей сибирской мороженой свеклы, как будущего ходового сырья сибирских сахзаводов, следует еще отметить, что имеющиеся до сего времени сведения, как из области заводской практической работы, так и из литературы очень ограничены, случайны и часто противоречивы. При том все эти данные относятся не

столько к замороженной свекле, сколько к свекле уже оттаявшей или повторно замораживающейся и повторно же оттаивавшей и благодаря этому претерпевшей помимо основных температурных влияний еще попутно сложные внутренние воздействия энзиматического и химического порядка, а также и внешние, нередко значительные влияния со стороны микрофлоры.

Все эти факторы в своем суммарном действии на свеклу производят в ней значительные биологические изменения и глубокие разрушения не только химической, но и чисто механической стороны, делая массу свекловичного корня механически очень непрочной. В результате этого такая мерзлая свекла дает при заводской переработке на резке мало стойкую легко слеживающуюся стружку, которая благодаря этому сильно затрудняет работу заводской диффузионной батареи.

Для того, чтобы осветить целый ряд вопросов, теоретически и производственно могущих интересовать сахарную промышленность в отношении свойств и особенностей, какие должен приобрести корень сахарной свеклы после его длительного промораживания в условиях сибирской зимы, было бы наиболее целесообразным подойти к этому вопросу со стороны выяснения последствий этих влияний на основной, с точки зрения сахарной промышленности, элемент всего свекловичного корня, т.-е. на клетки его паренхимной ткани, где сосредоточивается извлекаемый сахар. Установив это, можно было бы легче ориентироваться понимать, и в известной мере предугадать те изменения и последствия влияния замораживания, какие при этих условиях претерпевает корень сахарной свеклы в целом.

В виду указанного, целью настоящей работы в дальнейшем является выявление путем микроскопических и отчасти макроскопических исследований тех изменений, какие испытывает ткань свекловичного корня под действием длительных холодов сибирской зимы.

Влияние холода на клетки и ткани растений изучалось многими исследователями. В русской литературе имеется по данному вопросу весьма ценная работа проф. Н. А. Максимова „о вымерзании и холодостойкости растений“. Проф. Н. А. Максимов и др. исследователи подходили к явлению смерти от холода с чисто биологической точки зрения. Их интересует причина смерти, и явление разрыва оболочек клеток для них важно, только постольку, поскольку это может быть причиной гибели организма. Несмотря на иной поход и совершенно другие конечные цели, эти работы представляют и для нас значительный интерес.

Исследователи восемнадцатого и начала девятнадцатого столетия причину смерти растений видели в разрыве тканей.

Buffon и Du-Roi (1737 г.) считали, что при замерзании сок, наполняющий сосуды, увеличивается в объеме и растягивает их, при быстром же оттаивании, когда начинается, по мнению этих исследователей, „нечто вроде ледохода“, сосуды рвутся, сок вытекает, прекращается поступление воды, и растение гибнет. Senebier (1800 г.) разделяет точку зрения предыдущих авторов по вопросу о причине смерти, но считает, что разрыв сосудов происходит не при оттаивании, а при замерзании, вследствие расширения находящейся в них воды. В работах, начиная с 1830 г. и по настоящее время (Görpert (1830), Sachs (1860), Nägeli (1861) Prillieux (1913), посвященных изучению влияния холода, мы находим, что растения гибнут не от разрыва

стенок клеток, а от более тонких изменений, испытываемых клеткой под влиянием мороза. Göppert (1830) исследовал под микроскопом 222 вида различных растений, убитых морозом, а затем оттаянных, у всех у них клеточные стенки остались совершенно неповрежденными¹⁾.

Учение о разрыве клеточных стенок исчезло, и причину смерти стали вести—

1. В специфическом действии низких температур — в потере клеткой „жизненной силы“ под действием мороза (виталистическая точка зрения—Göppert'a (1830);

2) в быстром оттаивании, так как клеточная оболочка и плазма при замерзании теряют воду; клеточный сок, превращаясь в лед, становится более концентрированным. Если оттаивание происходит медленно, вода снова поглощается клеткой, и первоначальные свойства клеточного сока, оболочки и протоплазмы восстанавливаются; при быстром же оттаивании часть образующейся воды втекает в межклетники, и нормальные свойства клетки восстановиться не могут (Sachs (1870).

Против этих двух воззрений восстает Muller-Thurgau (1830, 1886). Опыты этого ученого с листьями растений, а также и с клубнями (картофеля) показали, что растения способны переносить без вреда в течение долгого времени охлаждение до температуры— 2° ,— 3° , если не происходит образование льда; там же где образуется лед, ткани отмирают. Причину смерти организма Muller-Thurgau, выдвинувший теорию обезвоживания, видит в явлении отнятия воды ледяными массами, образующимися в межклетниках. Причем, первое появление кристалликов льда не всегда влечет за собой гибель; смерть наступает только тогда, когда на образование льда клетка отдает так много воды, что наступает нарушение организованной структуры протоплазмы. Микроскопические исследования Muller'a-Thurgau привели его к заключению, что в тонких препаратах, подвергнутых действию холода, в силу быстрого охлаждения, лед образуется внутри клеток; при замерзании целых массивных органов растений лед образуется в межклетниках.

Gorske (1907) считает, что отнятие воды при замерзании повышает концентрацию клеточного сока, и находящиеся в нем соли высаживают белковые вещества, причем продолжительное воздействие концентрированного раствора солей может вызвать необратимые изменения белков—денатурацию. Наиболее интересными для нас являются работы Molisch (1897), Matruchot и Molliard (1902), Schaffnit'a (1910—1911).

Molisch начал свои микроскопические исследования с изучения влияния замораживания и дальнейшего оттаивания на различные коллоиды, эмульсии и другие вещества, входящие в состав клетки. Оказалось, что после оттаивания в некоторых случаях коллоид снова принимал первоначальный вид, в других же случаях происходящее при замораживании отнятие воды оказывалось процессом необратимым. Изучая растительные и животные объекты, Molisch вполне присоединяется к выводам Muller-Thurgau.

¹⁾ Работу Göppert H. 1830 „Über die Wärme. Entwicklung in den Pflanzen, deren Gefrieren und die Schutzmittel gegen dasselbe“ Breslau мы не имеем, к сожалению, вышеприведенные сведения взяты из работы Н. А. Максимова; вследствие чего, необходимые для нас подробности—какой температуре и в течении какого времени подвергались эти 222 вида остались неизвестными.

Phycomyces и волоски *Tradescantia* выдерживают переохлаждение до -9° и остаются живыми, если только их отогреть до образования льда. Если же при замораживании переохлаждение не имеет места, то от образующегося льда организмы погибают при температурах выше -9° . Лед, по мнению Molisch'a, образуется при замораживании растений не только в межклетниках, но и внутри клеток. Доказательством этого могут служить пузырьки воздуха, присутствие которых, по мнению Molisch и Muller'a-Thurgau, являются верным признаком внутреннего образования льда. Различные клетки, тем более различные ткани, оказываются неодинаково выносливыми по отношению к холоду, это объясняется тем, что они имеют различные точки возможного переохлаждения. Микроскопические исследования Molisch'a, все же не дают ясного представления о тех тонких цитологических изменениях, которые испытывает клетка, подвергнутая действию холода. Этот пробел в значительной степени заполнили Matruchot и Molliard, изучая фиксированный и затем окрашенный материал. Объекты изучения подвергались замораживанию при помощи охладительной смеси и в замороженном виде погружались в фиксатор—смесь Флемминга. Окраска препаратов производилась сафранином. Авторы пользовались, как материалом своего исследования, губчатой перенхимой листьев нарцисса. Влияние холода сказывалось прежде всего на структуре ядер. Нормально в ядрах обнаруживались тонкие сети хроматина, в которых находились ядрышки. У замороженных и затем оттаянных объектов в ядрах наблюдаются вакуоли, число которых бывает иногда настолько значительно, что ядро кажется состоящим из отдельных камер.

Эти вакуоли в зависимости от положения ядра располагаются биполярно или на одном полюсе. Иногда ядро превращается в пузырь, перегороденный на две части кольцом хроматина. В некоторых случаях наблюдается прорыв тонкого слоя ядерной оболочки и протоплазмы. Появление внутри ядра наполненных водой камер является результатом отделения воды от ядерного вещества, что вполне согласуется с теорией „обезвоживания“ , Muller-Thurgau.

Картина изменений в клетках растений, подвергнутых плазмолизированию и подсушиванию, вполне аналогична тому, что происходит в клетках замерзших организмов. Изменение протоплазмы в клетках растений, погибших от холода, по наблюдениям Matruchot'a и Molliard'a, выражается в том, что зернистая или фибриллярная структура переходит в пенистую, типичную для мертвой протоплазмы.

Точка зрения Muller-Thurgau встретила жестокую критику со стороны Pfeffer'a (1901), Mez'a (1905), Apelt'a (1907) и Rein'a (1908), считавших, что смерть организмов наступает тогда, когда охлаждение (хотя бы на мгновение) переходит за специфический для каждого организма минимум температуры.

Тщательные исследования Н. А. Максимова, применявшего термоэлектрический метод измерения температур, привели его к заключению, что выводы Muller'a-Thurgau наиболее достоверны. Учения же Apelt'a Rein'a а также Gorcke не выдерживают опытной проверки.

Заканчивая этим обзор литературы по вопросу о вымерзании и холодостойкости растений, нужно отметить, что точка зрения Muller-Thurgau и Максимова в настоящее время, хотя и является наиболее распространенной, но вопрос о причинах смерти организмов при заморзании все же еще нельзя считать окончательно разрешенным. Но,

если по затронутому выше вопросу и теперь не пришли к окончательному выводу, то имеется полное согласие в том, что оболочки клеток у организмов, погибших от холода остаются целыми.

Первым интересующим нас вопросом было установление момента наступления смерти клеток корней сахарной свеклы. В то время как у некоторых растений после смерти происходит быстрое изменение окраски¹⁾, у сахарной свеклы нет веществ, меняющих свой цвет после смерти организма; клеточный сок также не окрашен, вследствие чего изменение окраски в момент смерти здесь не происходит. Оперирова с тонкими срезами возможно во многих случаях определить состояние клеток на основании явления осмоса.

Но и этот способ в отношении сахарной свеклы оказывается неприменимым, так как клеточный сок не окрашен, и количество плазмы настолько минимально, что она почти незаметна даже на фиксированных и затем окрашенных препаратах; кроме того, клеточные оболочки обладают значительной толщиной. Вышеуказанные обстоятельства лишают возможности наблюдать явление плазмолиза — отставания протоплазмы от оболочки. Попытка применить способ окрашивания смесью красок (Neutralrot-Methylenblau) тоже не увенчалась успехом.

Обыкновенно, при применении этого способа, у живых объектов плазма окрашивается в красноватый цвет, у мертвых же — плазма приобретает синюю окраску. При применении же на сахарной свекле окраски смесью красок мы получаем во всех случаях (у заведомо живых и мертвых клеток) окрашивание оболочки в фиолетовый цвет. Протоплазма же, являющаяся в данном случае реагентом, будучи в клетках в ничтожном количестве и заключенная внутри толстых клеточных оболочек, не может быть показателем состояния клеток.

Из всех примененных нами способов в условиях нашего опыта пригодными оказались — макроплазмолиз и потемнение при оттаивании погибших от мороза тканей сахарной свеклы.

Если поместить срез живой ткани какого-либо растительного организма в раствор сахара или соли, то мы можем наблюдать двоякого рода явления:

Если концентрация раствора, окружающего срез, выше концентрации клеточного сока, то часть воды, находящейся в клетке, будет выходить (экзосмос), и протоплазма начинает отставать от стенок — это явление называется плазмолиз. В противоположном случае, когда концентрация клеточного сока выше, чем у окружающего раствора, то вода пойдет внутрь клетки (эндосмос). Вызываемое эндосмосом осмотическое давление, называемое тургором, свойственно в большей или меньшей степени всякой живой клетке. В мертвой клетке явление экзосмоса и эндосмоса места не имеют. Людвиг Иост в лекции по физиологии растений (перевод со 2-го немецкого издания 1912 г. пишет (стр. 24) „Когда де-Фриз (1877) помещал в воду толстые срезы свеклы, от которых тщательно были отмыты все следы сахара из поврежденных при разрезах клеток, то ему удалось показать, что даже через 14 дней из них сахар не диффундировал наружу. Если для такого же опыта взять красную свеклу, вместо белой, то найдем, что протоплазма не проницаема и для растворенного в клеточном соку

¹⁾ Подобные случаи наблюдались у индигоносных орхидей, у которых появляется синий цвет, как только растение будет убито; клеточный сок красной свеклы после смерти клеток изменяется — бледнеет.

пигмента, как и для тростникового сахара“ и далее на стр. 41— „в заключении заметим еще, что эндосмос и экзосмос зависят не только от свойств плазмы, но и оболочка клетки иногда может обуславливать непроницаемость для некоторых веществ, особенно тогда, когда она опробковела (Körner 1903). Так как опробкование после поранения может наступить уже через несколько часов (Appel 1906), то весьма возможно, что недостаточный эндосмос сахара в опыте де-Фриза со свеклой (стр. 24) зависел от такого образования пробки“. В настоящее время полагают, что явление экзосмоса и эндосмоса зависят почти всецело от поверхностного кожистого слоя протоплазмы (проф. Ивановский „Физиология растений“ 1919 г.) Если явления экзосмоса и эндосмоса трудно наблюдать в отношении отдельных клеток, изучая тонкие срезы, под микроскопом, то увеличение объема кусочков свеклы (в 2—4 см.³), в силу увеличившегося осмотического давления, обусловленного эндосмосом, значительно облегчает наблюдение этих явлений.

Для этой цели кусочки сахарной свеклы в 2—3 см.³ погружались в дистиллированную воду и на основании измерения с точностью до 0.1 куб. см. через определенные промежутки времени выяснилось— увеличивается ли их объем, если увеличивается, то в какой степени.

Итак, исчезновение явления осмотического давления может быть показателем момента наступления смерти. Помещая в дистиллированную воду ломтики свежей свеклы и мороженой (оставшиеся от 20 октября до опыта—17 января на открытом воздухе) мы обнаружили, что свежая свекла значительно (в среднем на 60%) увеличивается в объеме в течение первых двух часов после погружения в воду, в дальнейшем же объем ее не изменяется; мороженая же с осени сахарная свекла сохраняет свой первоначальный объем все время без изменения.—Ломтики, подвергнутые в течение 2—3 дней действию холода, увеличиваются настолько ничтожно, что в некоторых случаях это увеличение заключается в пределах ошибки наблюдения. Если же мы будем придерживаться взгляда де-Фриза приведенного Иостом, что сила осмоса зависит о целостности оболочки, то мы должны будем допустить, что клетки свеклы, разрезанной на ломтики и вынесенной на мороз с 15 по 17 января, в значительной степени должны были бы подвергнуться разрыву, так как они явления осмоса не обнаруживали. Но тщательные микроскопические исследования убеждают нас в обратном; поэтому надо думать, что правильнее будет объяснять явление осмоса, придерживаясь новейшей точки зрения, а именно: осмос обуславливается кожистым поверхностным слоем плазмы, а клеточная оболочка, если и имеет значение, то очень ничтожное. Отсутствие осмоса в предыдущих опытах указывает на коагуляцию плазмы, т. е. на смерть клетки, клеточные же оболочки в данном случае сохраняются.

Воспользовавшись сравнительно теплым днем 8 января, мы вынесли ломтики свежей свеклы на улицу, где они оставались с 13 ч. до 21 ч. За этот промежуток времени температура воздуха колебалась от $-10,8^{\circ}$ С. в 13 часов и до $-7,8^{\circ}$ С. в 21 час.

После этого мы погрузили их в воду и обнаружили, что объем их не изменился. Следовательно, средняя температура— $9,3^{\circ}$ С (в течение 8 часов) является для свеклы в данном случае уже смертельной.

В нашем исследовании деятельность энзим, вызывающих потемнение тканей, также может служить верным показателем смерти кле-

ток. Относительная стойкость энзим к действию холода является фактом общеизвестным. Замораживание применялось в работах Палладина (1905), Красносельской (1905, 1906) и Ковшова (1906) даже как метод изучения действия внутриклеточных энзим. В вышеуказанных проделанных нами опытах, когда ткани от действия холода погибли, что подтверждалось отсутствием явления осмоса, клетки при их оттаивании (в силу свободного проникновения в них воздуха и обусловленной этим деятельности энзим) принимали темную окраску. Чем ниже температура и длительнее ее воздействие, чем больше разрывов, и легче проходит внутрь тканей воздух, тем скорее идет процесс потемнения. Необходимо отметить, что работа энзим уже начинается при температурах близких к 0° , и потепление, достигающее $+2^{\circ}$, вызывает у корней, хранившихся на открытом воздухе, потемнение, идущее далеко вглубь. Сперва темнеют сосуды, а затем клетки паренхимы. Так как у периферии сосуды расположены ближе друг к другу, разрыв здесь больше и величина их значительнее, то и потемнение здесь наступает быстрее.

Не менее важным для нас является изучение структуры корней, подвергнутых действию холода. Ткани мороженой и свежей свеклы изучались на срезах, сделанных бритвой от руки и на препаратах, полученных с помощью микротомы. Препараты, сделанные с помощью бритвы от руки, имели при наших исследованиях ориентировочное значение. Для изучения же структуры клетки применялся более сложный и тонкий метод обработки материала. Обычно употреблялись ломтики свеклы свежей или подвергнутой действию холода, толщиной около 2 мм. и фиксировались следующими веществами;

1. Спиртом (60,85:96%) в течение 12—24 часов.
 2. Смесью 1% хромовой кислоты и 10% формалина (в различных комбинациях—5:5, 3:7, 7:3).
 3. Смесью Навашина—1% хромовой кислоты 10 см.³, 16% формалина 3 см.³, ледяной уксусной кислоты 1 см.³
 4. Смесью Флемминга (сильная концентрация)—однопроцентной хромовой кислоты 15 см.³, двухпроцентной осмиевой кислоты 2 см.³ ледяной уксусной кислоты—1 см.³, дистиллированной воды—10 см.³
- Ориентировочное исследование показало, что наилучшие результаты получаются при применении двух последних фиксаторов, в силу чего материал фиксировался смесями Навашина и Флемминга; после фиксации в течении 24 часов тонкие ломтики свеклы промывались в проточной воде, затем обезвоживались спиртом, проводились через смеси спирта с ксиолом, затем через чистый ксиол и, наконец, уже в парафине помещались на 3—4 суток в термостат (при t-ре $50-52^{\circ}$ C). Срезы делались при помощи микротомы Юнга толщиной от 6 до 16 микрон. Из различных способов окраски наилучшими оказались—окраска гематоксилином по способу Гейденгайна и тройное окрашивание сафранином и смесью Blochman'a ¹⁾. Материалом для исследования послужили корни свеклы, посланной из Алейского района, Барнаульского округа и хозяйства Алейского свеклосахарного совхоза в г. Томск 20 октября (Минимальная температура за период с I/X по 20/X — $4,6^{\circ}$ C), сохранявшиеся в течение всего времени опытов в условиях температур наружного воздуха в досчатом сарае, помещенные в

¹⁾ Смесь Blochman'a : воды—100 см.³, Wasserblau —0,5 гр., пикриновая кислота —0,25 гр.

закрытые ящики, и свежая свекла, находившаяся в подвале лаборатории при температуре около $+4^{\circ}\text{C}$.

Изучение изменений структуры, происходящих в корнях свеклы, подвергнутых действию холода, было начато в январе 1929 г. Свекла лежала в указанных выше помещениях и условиях. Для метеорологической температурной характеристики периода с 20 октября по 1 марта проводим нижеследующие таблицы по данным метеорологической станции Сибирского Технологического Ин-та в г. Томске.

Название месяцев	Средняя месячная температура	Миним. темпер. за месяц по ми- нимум термом.	Срочные наблюдения	
			Максимум темпе- ратуры	Амплитуда температур. (месячн.)
Октябрь 1928 года .	$+ 3,2^{\circ}\text{C}$	$-20,4^{\circ}\text{C}$ 25/X	$+24,1^{\circ}\text{C}$ 7/X	$44,3^{\circ}\text{C}$
Ноябрь " .	$-11,4^{\circ}\text{C}$	$-28,1^{\circ}\text{C}$ 29/XI	$+ 3,8^{\circ}\text{C}$ 1/XI	$30,2^{\circ}\text{C}$
Декабрь " " .	$-19,6^{\circ}\text{C}$	$-40,9^{\circ}\text{C}$ 24/XII	$- 6,4^{\circ}\text{C}$ 19/XII	$45,1^{\circ}\text{C}$
Январь 1929 года . .	$-22,6^{\circ}\text{C}$	$-40,5^{\circ}\text{C}$ 28/I	$- 7,8^{\circ}\text{C}$ 8/I	$47,8^{\circ}\text{C}$
Февраль " " . .	$-23,0^{\circ}\text{C}$	$-41,4^{\circ}\text{C}$ 2/II	$- 6,2^{\circ}\text{C}$ 14/II	$47,1^{\circ}\text{C}$

Колебание минимальных температур по декадам:

Месяцы \ Декады	I		II		III	
	от	до	от	до	от	до .
Октябрь					$- 0,1^{\circ}\text{C}$	$-20,4^{\circ}\text{C}$
Ноябрь	$+ 1,1^{\circ}\text{C}$	$-25,5^{\circ}\text{C}$	$- 0,4^{\circ}\text{C}$	$- 1,4^{\circ}\text{C}$	$-18,4^{\circ}\text{C}$	$-28,1^{\circ}\text{C}$
Декабрь	$-19,6^{\circ}\text{C}$	$-33,7^{\circ}\text{C}$	$-12,5^{\circ}\text{C}$	$-32,2^{\circ}\text{C}$	$-13,1^{\circ}\text{C}$	$-41,9^{\circ}\text{C}$
Январь	$-11,6^{\circ}\text{C}$	$-35,9^{\circ}\text{C}$	$-12,0^{\circ}\text{C}$	$-32,9^{\circ}\text{C}$	$-21,5^{\circ}\text{C}$	$-40,5^{\circ}\text{C}$
Февраль	$-20,1^{\circ}\text{C}$	$-41,4^{\circ}\text{C}$	$-14,3^{\circ}\text{C}$	$-31,5^{\circ}\text{C}$	$-18,0^{\circ}\text{C}$	$-36,6^{\circ}\text{C}$

Уже первые срезы в конце декабря 1928 года обнаружили ясно заметные разрывы-щели в тканях корней мороженой свеклы в виде прямой или ломаной линии. Количество этих разрывов было не одинаково в отдельных корнях. На основании нашего наблюдения можно заключить, что количество и величина разрывов прямо пропорциональны величине корня. Чем больше корень (чем толще он), тем больше и разрывов, что ясно заметно на фотографических снимках (2—5). Изучая наши препараты, мы можем отметить, что там, где разрез ножа микротом перпендикулярен направлению сосудисто-волокнистых пучков, во всех случаях ясно видно, что сосуды остаются целыми (см. фот. 8). Между тем, как Buffon и Du-Hamel (1737), а также Senebier (1800) объясняли смерть организма разрывом сосудисто-волокнистых пучков. Отсюда мы можем заключить, что сосудисто-волокнистые пучки не рвутся даже в условиях нашего опыта, когда

корни свеклы подвергались чрезвычайно сильному охлаждению в течение очень продолжительного времени (до 2—3 месяцев). Разрыв происходит в зоне межпучковой паренхимы, причем образующаяся щель располагается посредине между пучками, иногда же, особенно при более продолжительном замораживании (в течении 2—3 месяцев) появляется еще одна или две щели по бокам от первой, но размеры их несколько меньше.

Установленный здесь факт разрыва клеток не вполне совпадает с ныне существующим, весьма принятым взглядом, что клеточные оболочки при замерзании сохраняются. Это противоречие заставило нас остановиться на этом вопросе более подробно и при исследовании обратить на него особое внимание.—Помимо взаимного контроля срезов бритвой от руки и при помощи микротомы, нами учитывались и устранялись возможные причины, могущие во время приготовления препаратов вызвать подобные разрывы. Положение разрывов всегда сохранялось одним и тем же, независимо от того, как были ориентированы сосудисто-волокнистые пучки—по длине ли парафиновой ленты или же поперек ее. Констатирование явления разрыва и места образования его облегчается тем, что трещины или щели отличаются значительными размерами не только в длину и в ширину, но и в глубину, в силу чего разрыв носит не случайный характер и представлен не на одном срезе, а на всей серии их.

Наблюдая за последовательными изменениями в структуре корня, мы видим, что величина трещин с течением времени растет. Так, если в январе простым глазом они были плохо заметны, то в феврале мы уже легко могли рассмотреть их на тонких срезах (см. фот. 2—5) Для сопоставления срезов мороженой со срезами свежей свеклы приводятся фотографии 1—5. Продольный срез корня мороженой свеклы изображен на фотографии 2. Здесь мы ясно видим разрывы, причем они имеют известную ориентировку, соответствующую расположению сосудисто-волокнистых пучков. Хотя на фотографии 2 это менее заметно, чем на поперечных срезах корня, сделанных в марте месяце, но цель этой фотографии № 2 прежде всего иллюстрировать самый факт разрыва в продольном направлении корня. Фотографии 3, 4, 5 соответствуют снимкам срезов, сделанным поперек корня; причем срезы сделаны из корней разного диаметра, приблизительно по одному и тому же месту „головки корня“. Как видно на фотографиях, место разрывов щелей отражает структуру свеклы и указывает на круговое расположение сосудисто-волокнистых пучков. Глядя на эти снимки, легко заметить, что разрывы расположены между сосудисто-волокнистыми пучками. Кроме того, чем больше диаметр, чем массивнее корень, тем больше разрывов. Итак, приведенные фотографии, микро и макроскопических препаратов окончательно подтверждают правильность высказанного нами положения.

Но нельзя ограничиться только одним констатированием факта разрыва тканей, необходимо остановиться и на причине, вызывающей эти разрывы. Если бы причиной разрыва клеточных оболочек было расширение клеточного сока при замерзании, то разрывы носили бы беспорядочный характер. Тогда в лучшем случае, решающим моментом являлась бы величина клетки и степень прочности (эластичность) ее оболочки. Но, если бы разрыв клеток зависел только от вышеуказанных причин, то мы должны были бы наблюдать постепенное образование щелей, начиная с разрыва лишь нескольких клеток. На на-

ших же препаратах мы не могли заметить этой закономерности. Рассматривая внимательно оболочки их клеток, разрезанных ножом микротомы пополам, пользуясь самым большим имеющимся у нас увеличением (2250 раз), мы не могли обнаружить даже признаков разрыва ни около пор, ни в стороне от них. Наблюдающиеся иногда повреждения оболочки клеток мы склонны скорее объяснить несовершенством техники изготовления препаратов, нежели действием мороза.

Итак, более вероятным является допущение, что разрыв в виде щели между сосулисто-волокнистыми пучками возникает не постепенно, а быстро-внезапно, а затем образовавшаяся трещина постепенно увеличивается. Чем же вызывается появление трещины? На этот вопрос, нам кажется, более правдоподобным следующий ответ: клетки, удаленные от сосудов, являются наибольшими по размерам, и стенки их более тонки. Межклетники здесь крупные, и, будучи наполнены не только жидкостью, но и газами, легко поддаются сжатию. При расширении и изменении объема клеток, в силу не одинаковой эластичности слагающих корень тканей, получается неравномерное натяжение, вследствие чего возможны даже сдвиги. В то время, как сосулисто-волокнистые пучки представляют собой как бы „каркас“, межпучковая паренхима является наиболее благоприятным местом для натяжения и разрывов.

С тем, чтобы установить, хотя бы приблизительно, при каких температурах и после какого промежутка времени наступает разрыв, начиная с 14 января и почти ежедневно до 5 февраля выносились партии кусочков свеклы размерами $3 \times 1 \times 1$ см., которые помещались в метеорологическую будку английского типа. Изучая их, мы пришли к заключению, что разрыв тканей, хотя и в этом случае имеет место но размеры и количество их значительно меньше, чем в целых корнях. В общем степень повреждений от действий холода пропорциональна массе корня.

Изучая кусочки свеклы, вынесенные на улицу 14 января, нам удалось наблюдать явление разрыва только 25 января, т. е. через 11 дней. Промежуток времени с 14 по 25 января 1929 г. характеризуется по пятидневкам так:

Колебание минимальных температур.

Пятидневки января 1929 года

С 16 по 20	С 20 по 25
От $-12,0^{\circ}\text{C}$ до $-32,9^{\circ}\text{C}$	От $-24,5^{\circ}\text{C}$ до $-33,9^{\circ}\text{C}$

Разрывы в вышеуказанных ломтиках в последних числах февраля достигали еще больших размеров.

Переходя к результатам цитологического исследования корней мороженой сахарной свеклы, необходимо указать, что наибольшее внимание было уделено ядру и ядрышку. Ядро и ядрышко, несмотря на свои малые размеры по сравнению с величиною клетки, являются наилучшими реагентами и показателями происходящих под влиянием

холода физико-химических процессов внутри клетки. Нужно думать, что в результате более тщательного изучения ядра можно было бы проследить постепенную картину изменений этого важного органоида клетки и в дальнейшем на основании изменения структуры ядра определять, в каком состоянии находилась в момент фиксации клетка.

Предпринятое нами цитологическое исследование вполне согласуется с данными Matruchot и Molliard, но некоторые детали в отношении судьбы ядрышка, ускользнувшие от наблюдения вышеуказанных ученых, удалось обнаружить, пользуясь более сложным и более совершенным методом тройной окраски по Blochmann'у.

Изучая клетку свежей свеклы, мы наблюдаем следующую картину: возле стенок, окрашенных в синий цвет, помещается ядро; окраска его, как и протоплазмы, более бледная—голубоватая. Форма ядра варьирует в различных тканях. В межпучковой паренхиме оно округлое, с боков несколько сплюснутое; в зависимости от ориентировки, оно кажется круглым или несколько вытянутым (см. фотографию 6). В зоне же делящихся клеток (камбие) и флоеме ясно наблюдается соотношение между формой клеток и формой ядер. В вытянутых клетках ядро веретенообразной формы (см. фотогр. 6). Изучая препараты, нам удавалось довольно часто встречать клетки с двумя ядрами. Внутри ядра помещается ядрышко, оно резко отделено со всех сторон от массы ядра светлой полоской „двориком“. Это образование приходится рассматривать, как посмертное, возникающее при обработке материала. Ядрышко всегда окрашивается в красный цвет.

На препаратах, сделанных из свеклы, подвергнутой длительному действию холода (с осени до 20 января), помимо упомянутых разрывов тканей, мы видим, что ядер, как морфологических образований, более не существует. Вместо них, в различных частях клетки встречаются бесформенные кусочки—хлопья какого-то вещества, красящегося с синеватым цветом. Ядрышек мы тоже не находим, и красная окраска совершенно отсутствует.

Если Matruchot и Molliard у замороженных и затем оттаянных объектов наблюдали в ядрах вакуоли, то мы в наших опытах, наблюдали все те же картины, о которых писали вышеуказанные авторы; изучая же корни, подвергнутые более длительному и сильному охлаждению, встретились с явлением полного разрыва всех ядер (фотогр. 8, 9, рис. с, d, табл. III). Наиболее сохранившимися ядрами оказываются ядра клеток меньших размеров с большим количеством протоплазмы. О влиянии замораживания на ядрышки мы можем судить в силу характерной для них красной окраски. На наших препаратах нам удалось наблюдать (фотогр. 10 и рис. с, d, табл. III) распадение ядрышка на более мелкие части. Эти частички еще не утратили способности окрашиваться в красный цвет и резко вырисовывались на синем, уже бесформенном фоне ядра.

Наше предварительное ориентировочное исследование является далеко не законченным: нами еще не указано точно температурные границы, при которых наступает разрыв оболочек клеток, ядра и ядрышек; мы еще не можем изобразить вышеуказанные явления в необходимой последовательности сменяющихся картин. Основные же первоочередные вопросы—разрыв оболочек клеток, ядра и ядрышка являются для нас очевидным фактом. Как уже сказано выше, в клетках

свежей свеклы ядрышко окрашивается сафранином в красный цвет; в клетках же, подвергнутых действию мороза, краской Wasserblau—в синеватый цвет. Это свидетельствует о происходящих изменениях внутри ядрышек. Ядрышко становится „ацидофильным“. По новейшим данным изменение способности окрашиваться в другие цвета объясняется (Romeis Taschenbuch der mikroskopischen Technik Allgemeiner Teil, 12 Auflage, 1928) не только химическим, но и физическим—изменением плотности.

Изучая срезы мороженой, нефиксированной свеклы, мы постепенно наблюдаем пузырьки воздуха не только в межклетниках, но и внутри клеток. Установленный нами факт вполне согласуется с данными Schaffnit'a и говорит за то, что лед образуется при замерзании корней в клетках и в межклетниках. Попытки путем микроскопического исследования найти различие между структурой тканей мороженой свеклы, подвергнутой действию пара в течение 5—6 секунд, и просто оттаянной в комнате при 15°C, не выявили заметного различия. Некоторое незначительное изменение в тонах окраски едва ли можно считать достаточно верным признаком происшедших изменений.

Нам необходимо еще остановиться на влиянии способов оттаивания. В литературе по этому вопросу имеются следующие указания. Buffon Du-Hamel (1737), Sachs (1870), Preilleux (1872) считали, что оттаивание является решающим моментом в возможности сохранения жизни. Эта точка зрения вполне разделяется и практиками. Максимов, резко выступающий против значения различных способов оттаивания, все же на стр. 291—292 и 299—300 своей работы—„О вымерзании и холодостойкости растений“, считает возможным признать, что постепенное оттаивание может оказаться спасительным, так, как прежде чем растение потеряет значительное количество влаги, плазма восстанавливает свою непроницаемость, и вода из межклетников снова будет поглощена клетками. Senebier (1800), Göppert (1830, 1870—71), Künisch (1880) и др. оспаривают значение оттаивания, считая, что разрыв тканей происходит во время замерзания. Muller-Thurgau, воздерживаясь от определенного суждения о моменте смерти—наступает ли она при замерзании или в момент оттаивания, возражает решительно против укоренившегося мнения, что путем медленного оттаивания можно спасти замерзшее растение. Кроме этих литературных данных, в том же труде Н. А. Максимова мы находим, что быстрота оттаивания для яблок имеет известное значение (стр. 32—33). Сопоставляя вышеприведенные факты, мы считаем, что оттаивание может иметь значение тогда, когда организм, подвергнутый действию холода, испытывает известные изменения, но эти изменения являются процессом обратимым, т. е. при медленном оттаивании ткани и клетки могут принимать первоначальное нормальное строение. Оттаивая те же самые растения быстро, мы можем вызвать новые более глубокие изменения и организм в конечном счете погибает. Говоря это, мы, конечно, должны учитывать, что при продолжительном замораживании происходят настолько глубокие изменения, что восстановить первоначальное строение и свойства каким-бы то ни было оттаиванием невозможно.

В нашем исследовании мы имеем дело с корнями свеклы, оставшимися в течение нескольких месяцев на морозе, при температуре достигающей до—40°C. Вне всякого сомнения, что „воскресить“,—вернуть способность прорасти и жить этим корням каким, бы то ни

было способом—невозможно. Но этот вопрос не входит в программу нашего исследования. Нас интересует только вопрос, как влияют различные способы оттаивания на мороженую свеклу в смысле сохранности ее тканей и клеток. С этой целью материал в виде кусочков сперва подвергался замораживанию в течение от 2 до 14 дней (в период с 14 января по 28 января) при температурах от $-12,0^{\circ}\text{C}$ до $-40,5^{\circ}\text{C}$ и затем оттаивался в воздухе при t 2° , 10° , 15° , в воде при t 2° , 12° , в парах—около 100°C .; после указанных выше воздействий материал фиксировался. Кроме того, одна партия замороженных кусочков свеклы была погружена в фиксатор, температура которого была 3° . Температура фиксатора повышалась постепенно и ломтики свеклы, таким образом, оттаивали медленно. Изучая приготовленные из этого материала препараты (пользуясь вышеуказанными методами), мы не нашли заметных различий и считаем, что применяемые нами способы оттаивания не оказывали никакого влияния на сохранность свеклы, которая остается, видимо, такой же, какой была до оттаивания. Все вышеуказанное говорит за то, что разрывы в сахарной свекле происходят при замораживании, а не при ее оттаивании. Необходимо отметить, что большинство биологов, занимавшихся до сих пор вопросом влияния холода на растение, интересовалось растением, пока оно было живо, пока к жизни его можно было вернуть, и поэтому в их опытах воздействию холода подвергался организм в течение секунд, минут и часов; в условиях же нашего опыта корни свеклы оставались на морозе, доходившем до -41° , целыми днями, неделями и месяцами. Нас интересует строение не только живой, но и заведомо мертвой ткани. Клетки от холода погибают еще тогда, когда их оболочки являются целыми,—это положение вполне подтверждается и данными нашего исследования, показавшими вместе с тем, что дальнейшее продолжительное действие температур влечет за собой разрыв тканей и целый ряд новых изменений в строении уже погибшей клетки.

Установленный нами факт разрыва тканей не опровергает правильности новейших воззрений. Объект изучения и условия нашего опыта являются совершенно иными, и результаты нашего исследования будут дополнением к тому, что сделано до нас по данному вопросу.

ВЫВОДЫ.

1. Наступление смерти клеток корней сахарной свеклы возможно установить, пользуясь следующими признаками:
 - а) Исчезновение осмотического давления, определяемого путем макропласмолиза;
 - б) Потемнение тканей свекловичного корня от деятельности энзим, работа которых в мертвых клетках совершенно ясно проявляется при нуле градусов и при еще более низких температурах.
 - в) Структурные изменения ядра и ядрышка.
2. От продолжительности действия низких температур ткани свекловичного корня рвутся; в ядре и ядрышке первоначально по-

являются вакуоли, число и размеры которых с течением времени увеличиваются и, наконец, ядро и ядрышко распадаются на мелкие части; вещество ядрышка, окрашивающееся в живых клетках сафранином в красный цвет, при распадении их окрашивается в синюю окраску.

3. Разрывы тканей, ядра и ядрышка происходят при замерзании корней сахарной свеклы, а не при ее оттаивании.
4. Действие холода в условиях поставленных опытов при температуре около -9°C убивает плазму клеток свекловичного корня уже через 8 часов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Корень сахарной свеклы, подвергаясь в природных условиях сибирской зимы длительному действию устойчивого холода без оттепелей, претерпевает глубокие изменения. При этом в корне появляются разрывы его паренхимной ткани между сосудисто-волокнистыми пучками. Размеры и число этих резервов с течением времени возрастает. Массы льда чистой воды, первоначально появляющейся в межклетниках, со временем постепенно увеличиваются, образуя вытянутые скопления, пронизывающие тело замороженного свекловичного корня. Уже к январю месяцу сахарная свекла под действием естественного холода сибирской зимы превращается в совершенно новый, неизвестный Европейскому сахарному производству материал, резко отличный по своим биохимическим, физическим и механическим свойствам от обычной сахарной свеклы, хранящейся в незамороженном состоянии. Изучение явления плазмолиза, потемнений разрезов свеклы и изучение структурных изменений ядра и ядрышка клетки паренхимной ткани свекловичного корня дают возможность уточнить зависимость структуры корней сахарной свеклы, хранящейся на открытом воздухе, от метеорологических и климатических факторов. Это дает возможность наметить окончательно наилучшие условия для хранения корней сахарной свеклы в условиях сибирского производства. Помимо этого, данная методика может осветить вопрос о тех предельных низших температурах, при которых сахарная свекла могла бы храниться без замерзания в условиях районов с более мягким климатом, исключая возможность замерзания сахарной свеклы при хранении ее в кагатах.

Объяснение к фотографиям и рисункам.

- Фотография 1. — Поперечный срез свежего корня свеклы.
 2. — Продольный срез мороженой свеклы.
 3, 4, 5. — Поперечный срез мороженных корней свеклы.
 Фотографии фиг. 2—5. Сделаны (0,8 н. в.) с срезов корней свеклы, предварительно оттаянных на воздухе при температуре 15° С, ранее находившихся с самой осени и до февраля месяца на открытом воздухе (в г. Томске температура воздуха падала за этот период до—41,4° С).

Толщина срезов, сделанных от руки острой бритвой, примерно, около 2-х мм.

ПРИМЕЧАНИЕ: Количество и величина разрывов возрастает с величиной корней. Фотографии 6—10 — и рис. а, в, с, d, е — сделаны с препаратов, приготовленных вышеуказанным способом) фиксатор-крепкая концентрация Флеминга; окраска по Blochman'у (Толщина срезов от 8—16 микрон). Снимки сделаны при компенсационном окуляре 10 и 20 и объектив 10 и 20 (фирмы Zeiss).

Фотографии 6 и 7. — Свежая свекла. Разрывов нет. Во многих клетках видны ядра; в некоторых единичных клетках по 2 ядра. Форма ядер соответствует форме клеток. Плазма в незначительном количестве находится у стенок клеток в виде мелко-зернистых чуть заметных сгустков.

Фотография. 6—ок. 10; об. 10, толщина срез. 8 микрон.

Фотография. 14—ок. 15; об. 10, толщина среза 16 микрон.

Фотография 8.

Мороженная свекла (с осени до 20/1). Каждый сосуд в отдельности и сосудисто-волоконный пучок в целом сохранены, значительные разрывы заметны в зоне межпучковой паренхимы. Ядра отсутствуют (разрушены холодом).

Ок. 10, объект. 10, толщина срез. 8 микрон.

Фотография 9.

Мороженная свекла (с осени до 20/1). В зоне межпучковой паренхимы заметен значительный разрыв. Ядра отсутствуют.

Ок. 15, объект. 10, толщ. срезов 16 микрон.

Фотография 10.

Мороженная свекла (с осени до середины декабря). В некоторых клетках, хотя и ядра утратили уже свою форму, но хроматин еще сохранился в виде бесформенных сгустков, внутри которых видны маленькие красные зернышки распавшегося ядрышка (на фотографии они кажутся светлыми точками на фоне темных комочков—сгустков. ядра.

Ок. 15, объект. 20; толщ. срезов 8 микрон.

Рисунки а, в, с, d, е — сделаны при помощи рисовального прибора Аввё. Пунктиром обозначено зернистое вещество ядра (на препаратах окрасившееся в синий цвет); тушью залиты ядрышки и их частички-глыбки разнообразной формы и величины, получившиеся в результате разрушения ядрышек от действия холода (на препаратах вещество ядрышек и частичек их окрашено в красный цвет):

Рис. а, в, е — сделаны с препаратов, заснятых на фотографии 6, 7.

Рис. с, d — сделаны с препарата, заснятого на фотографии 10.

Рис. а, в — нормальные ядра с 1—2-мя ядрышками из корня не мороженой сахарной свеклы.

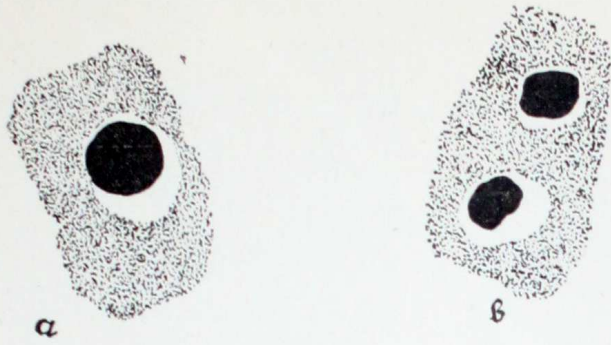
Рис. с, d — распад ядра и ядрышек.

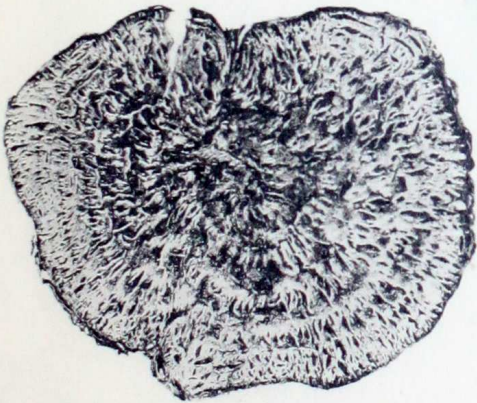
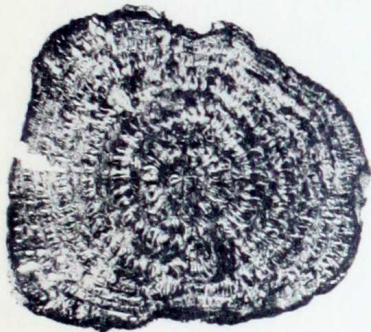
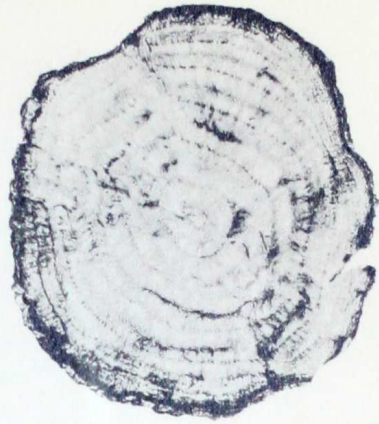
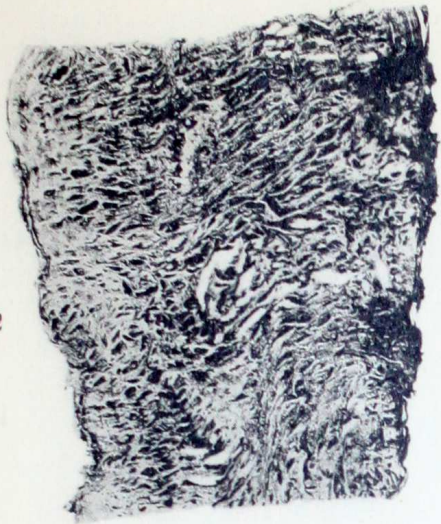
Рис. е — клетка с ядром из немороженой свеклы (соотношение между величиной ядра и клетки.

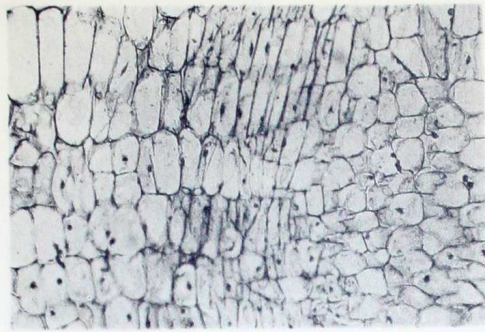
Рис. а, в, с, d — сделаны при иммерсион. системе апохром. 2 мм. Zeiss и компенсац. окуляре 20. Увелич. 2250 раз.

Рис. е — сделан при апохромате 16 мм. Reichert и компенсационном окуляре 20. Увелич. 375 раз.

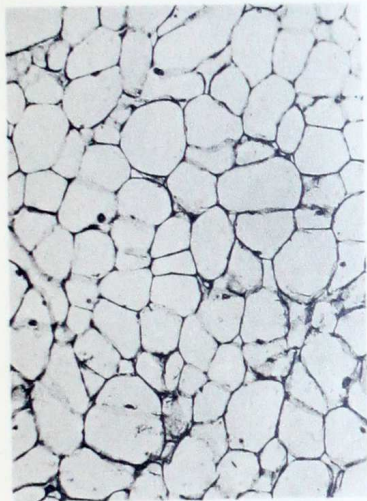
К раб. С. В. Лебедева и В. П. Чехова.



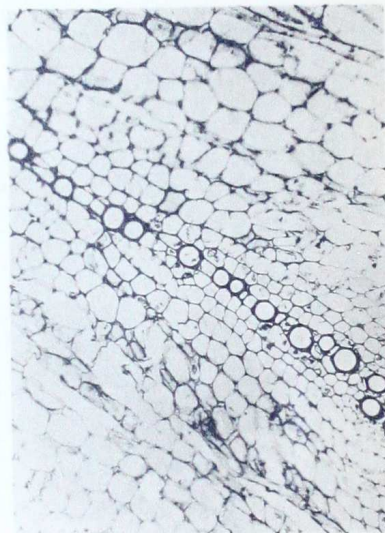




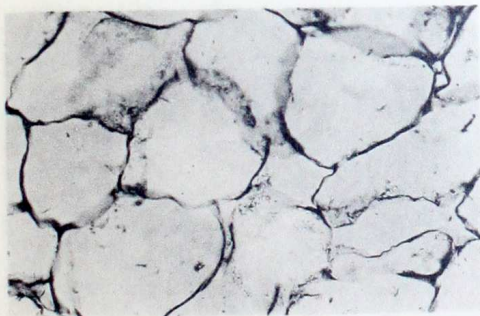
6



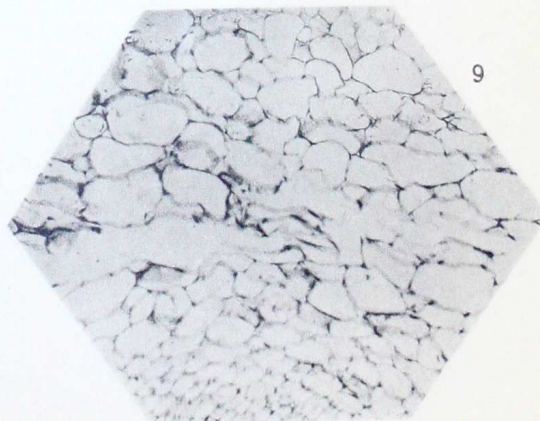
7



8



10



9