

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Каюковой Алёны Владимировны

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук



М. Ю. Касаткин

Зав. кафедрой:
профессор, док. биол. наук



С.А. Степанов

Саратов 2023

Актуальность темы. Актуальность темы исследования заключается в том, что за последние годы в области гистохимии были достигнуты значительные успехи. Однако, несмотря на большое количество гистохимических процедур, число которых в настоящее время достигает несколько сотен, немногие из них были использованы в ботанической практике. Это объясняется следующими причинами.

Первая причина заключается в недооценке значения гистохимических методов в решении различных ботанических вопросов. Как с морфологической, так и с физиологической точки зрения, растения в целом и их отдельные органы имеют сложное строение. Гистохимическая методика позволяет получить полную характеристику растения на следующих уровнях: клеточном, тканевом и систем тканей. Учитывая, что интерес к ботаническим проблемам такого рода возрастает, применение гистохимической методики приобретет все большее значение в области изучения растений.

Вторая причина связана с происхождением и природой гистохимических методов. Большинство современных гистохимических процедур разработано для тканей животных и лишь в ограниченной степени применимо к растениям. Кроме того, исследователям, не освоившим данную методику, она кажется затруднительной, а результаты – с трудом поддающиеся обработке. Также использование гистохимических процедур часто требует одновременного ознакомления с биохимической методикой и обычной морфологической микротехникой.

Целью работы является адаптация методик гистохимии для анатомо-гистологического анализа микропрепаратов растений с применением цифровых технологий

Исходя из данной цели, можно обозначить следующие задачи:

- Подбор красителей для дифференциации структур тканей древесных растений с целью их автоматического анализа.
- Освоение приёмов и методов комплексной анатомо-гистологической оценки срезов по их фотографиям.

- Определение особенностей развития однолетних и двулетних побегов древесных растений с применением цифровых технологий.

Предметом исследования являются гистохимические методы, применяемые для изучения анатомии и физиологии растений. Объектом исследования являются липиды плазмалеммы и углеводы клеточной стенки растений.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на кафедре микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. Объектом изучения являлись однолетние побеги древесных растений, произрастающих в условиях урбанизированной среды и широко используемых в озеленении города.

Пробы отбирались в середине июня 2022 г. у отдельно стоящих растений для исключения эффекта затенения. Исследовались междоузлия верхнего и нижнего фитомера однолетнего прироста бокового побега.

Для анатомических исследований использовали одно- и двулетние образцы стебля древесных растений. Для фиксации объектов, взятых в феврале и марте, использовали фиксатор Навашина [5], в состав которого входит хромовая кислота. Время фиксации составляло 24 часа, после чего осуществлялось промывание образцов в проточной воде. В дальнейшем объекты готовились для резки на микротоме. Толщина срезов 15 мкм. Срезы окрашивались фуксином, метиленовым синим, суданом, эозином и раствором йода, широко используемыми для получения обзорной гистологической окраски различных тканей и выявления внутриклеточных структур [3].

Структура и объем работы. Диплом изложен на 35 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы, Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Гистологическая характеристика тканей стебля древесных растений

2. Основные методы анатомического анализа древесных тканей и целлюлозных волокон.

3. Материалы и методы исследований, в которой рассматривались материалы исследований, методы исследований.

4 Результаты исследований, в которой рассматриваются особенности организации стебля древесных растений и анатомо-морфологическая характеристика ксилемы стебля некоторых видов древесных растений.

Научная новизна. Изучены видовые различия строения стебля одно- и двулетних побегов древесных растений по их оцифрованным изображениям в программном обеспечении с открытым исходным кодом.

Научная значимость. Применение современных методов построения и компьютерного анализа изображений биологических объектов для изучения динамических характеристик тканей позволит комплексно оценить цитологические характеристики древесных растений. Полученные таким путем данные могут лечь в основу методик для выведения новых продуктивных сортов пшеницы с высокими показателями засухоустойчивости.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дифференциация гистологических структур древесных растений красителями с целью их автоматического анализа позволяет повысить точность определения типов тканей в программе обработки изображений микропрепаратов.

2. Анализ оцифрованных изображений в программе на качественно приготовленных срезах позволяет определить цитоморфометрические различия растительных тканей.

Основное содержание работы

Особенности организации стебля древесных растений. Специфика строения стеблей древесных растений обусловлена деятельностью апикальных и латеральных меристем, с этим связано утолщение ствола и боковых ветвей.

Стебли древесных растений в течение первого года жизни сходны по строению со стеблями травянистых растений - молодой однолетней стебель снаружи покрыт кожицей, которая уже к концу первого лета сменяется пробкой. В пробке имеются специальные образования — чечевички, состоящие из мертвых, рыхло расположенных клеток. На поперечных спилах стволов даже невооруженным глазом можно различить три основные части: кору, древесину и сердцевину.

Для всех исследуемых видов характерна типичная для древесного двудольного растения анатомическая организация стебля. Центральная часть стебля представлена сердцевиной, отграниченной от ксилемы перимедулярной зоной (рис.2). Камбий кольцом отделяет ксилему от коровой части стебля, где различимы области проводящей и непроводящей флоэмы, коровая паренхима, колленхима, покровные ткани. При диаметре стебля в среднем 5 мм для сердцевины составляет 27%-28% (1,3мм). На поперечном срезе стебля можно выделить длинную (верх-низ) и короткую (правый и левый край) оси. В центральной части сердцевины наблюдались большие (от 46–74) до (84–93) и маленькие (от 19-19) до (33–33мкм) клетки с поровыми полями, располагающимися локальными участками. Первичная ксилема располагается пятью чередующимися участками по периметру сердцевины, что придает ей в целом пятилучевую форму на поперечном срезе стебля бокового побега.

Первичная ксилема по-разному выражена в участках перимедулярной зоны сердцевины можно выделить небольшие по размеру клетки - от 7-11 до 15-19 мкм на поперечном срезе стебля, крупные клетки - от 26-35 мкм до 32-46 мкм.

Вторичная ксилема (древесина) составляет в среднем 58 – 62 % от диаметра и представлена трахеальными элементами – члениками сосудов (трахей) и трахеидами, волокнами, лучевыми и осевыми паренхимными клетками.

Однако следует заметить, что значительное число сосудов располагается рядом с лучами сердцевины, где как уже отмечалось располагаются и спиральные сосуды протоксилемы.

Также отмечалось, что в нижней части стебля число сосудов больше, чем в верхней его части.

Волокна ксилемы различной длины (короткие - от 259 до 330 мкм; длинные от 330 до 900 мкм отдельные волокна - еще большей длины), с заостренными концами, иногда образующими разветвления, характерной штриховатостью клеточных оболочек, толщина которых незначительна. В волокнах ксилемы наблюдаются цитоплазма и простые косо расположенные поры. Большое число пор отмечено со смежными волокнами, с клетками лучевой паренхимы ксилемы и меньшее с члениками сосудов. В некоторых волокнах выявлено наличие сект, ядра ланцетовидной формы. Отдельные волокна имели несколько ядер.

На поперечных срезах стебля клетки лучевой паренхимы ксилемы в большинстве своем однорядны, но отмечены и двурядные лучи. Ширина лучевой паренхимы ксилемы составляют в среднем 6 – 8 мкм, а ближе к сердцевине – до 15 мкм.

Паренхимные клетки ксилемного луча хорошо прокрашиваются гематоксилином имеют большое число крупных поровых полей и ядра различной формы – округлые и вытянутые, ланцетовидные. Наличие значительного числа поровых полей и ядер – одно в каждой клетке – позволяет предположить важную физиологическую роль клеток луча в транспорте веществ, а также их потенциальную способность к быстрому переходу в меристематическое состояние.

Тип расположения клеток осевой паренхимы окудновазицентрический, то есть эти клетки, как правило располагаются рядом с сосудами. Подобный тип расположения клеток ксилемной паренхимы отмечен у яблони.

Кора стебля составляет от 10,8 до 14,4% от радиуса стебля (520 – 700 мкм). По бокам от условной линии соединяющей верхнюю и нижнюю части

стебля бокового побега, толщина коры несколько больше чем, в верхней части, но меньше относительно нижней его части.

Флоэма коры в понимании многих исследователей представляет собою сложную ткань, так как включает наибольшее количество различных в морфолого-анатомическом плане клеток, выполняющих соответственно разную физиологическую роль. Флоэма представлена как последовательное чередование тканей мягкого и твердого луба.

Мягкий луб представлен ситовидными трубками, клетками осевой флоэмной паренхимы и лубяных лучей, клетками кристаллоносной паренхимы; твердый луб – склеренхимными волокнами и склереидами, ситовидные трубки состоят из члеников, вытянутых вдоль продольной оси побега и отделенных друг от друга кривой ситовидной пластинкой.

Лучевая паренхима флоэмы разделяет отдельные блоки из ситовидных трубок и осевой паренхимы флоэмы или же располагается в промежутках между тяжами волокон твердого луба. На поперечных срезах стеблей отмечено, что клетки лучевой паренхимы флоэмы по мере их удаления к наружи от камбиальной зоны крупнее предыдущих производных лучевого камбия – от 6–7 мкм до 11–37 мкм; при этом клетки уплощаются в направлении, перпендикулярном радиусу стебля. Паренхимные производные лучевого камбия простираются на большую глубину по радиусу флоэмной зоны; отмыкаясь с клетками коровой паренхимы стебля.

Лубяные волокна залегают на поперечном срезе группами с различным числом отдельных волокон в группах – от 1 до 100, а в отдельных группах и более. Максимальный диаметр волокон на поперечном срезе составлял 18-25 мкм при этом диаметр полости был равен примерно 1,0 – 1,5 мкм.

Колленхима стебля отличается отдельными группами в 4 – 6 клеток по радиусу стебля под перидермой, отличаясь от клеток феллодермы более крупными размерами и сильным развитием межклетников, заполненных следующим веществом темного цвета. На продольных срезах стебля форма клеток паренхимы различна – от типично паренхимной до прозенхимной со

скошенными дистальными концами, заходящими за концы других смежных клеток. В первом ряду клетки колленхимы, граничат с феллодермой их размеры составляли от 17–17 мкм до 17–22 мкм.

Перидерма представлена клетками феллодермы, феллогена и феллемы. Снаружи стебля к ней примыкают клетки эпидермиса со слоем кутикулы.

Клетки феллемы располагаются в ряд вдоль; продольной оси стебля и самой разной формы в пределах ряда. Клетки феллемы каждого ряда отличаются от клеток другого ряда размерами и формой.

Анатомо-морфологическая характеристика ксилемы стебля некоторых видов древесных растений. Для анализа цитологических особенностей клеток ксилемы необходим дифференциальный подхода к изучению роста деревьев в зависимости от погодных условий. Известно, что существует положительная связь с осадками, а зависимость ширины годичных колец от метеорологических условий увеличивается, если учитывать два фактора — температуру первой половины вегетационного сезона и осадки второй, которые оказывают преобладающее воздействие на рост дерева в различные периоды вегетации.

Однако, нужно помнить, что другие характеристики внешней среды: свет, минеральное питание, концентрация углекислого газа и др.— оказывают как специфическое, так и неспецифическое воздействие на рост деревьев. Например, эффект влияния интенсивности света можно учесть, сравнивая рост господствующих и угнетенных деревьев в древостое. Исходя из этого, нами были отобраны пробы у отдельно стоящих деревьев с хорошим равномерным освещением в течение целого дня.

Определение цитоморфометрических параметров ксилемы одно- и двулетних побегов некоторых древесных растений показало возможность продифференцировать проводящие элементы в автоматическом режиме с помощью цифровых технологий анализа изображений приготовленных анатомических препаратов

Выявленные различия связаны как с видоспецифичностью анализируемой ткани, так и с особенностями деятельности камбия в складывающихся конкретных погодных условиях года. Максимальный радиальный размер ксилемы был обнаружен у однолетних побегов акации и берёзы по сравнению таким же показателем за прошлый год у двулетних побегов тех же видов. Наоборот, стебли двулетнего дуба имели более мощное развитие ксилемы за прошлый год по отношению к году исследования. Однако, у всех видов ширина годового кольца ксилемы была выше в текущем году исследования в сравнении с прошлым.

Средние размеры проводящих элементов ксилемы были больше в текущем году исследования, независимо от вида растения.

ВЫВОДЫ

1. Дифференциация гистологических структур древесных растений красителями с целью их автоматического анализа позволяет повысить точность определения типов тканей в программе CellProfiler. Так, раствор йода позволяет избирательно окрасить перимедуллярную зону сердцевины, что позволяет понизить процент ошибки в идентификации клеток этого участка в качестве ксилемных элементов.

1. Анализ оцифрованных изображений в программе ImageJ на качественно приготовленных срезах позволяет определить цитоморфометрические различия тканей ксилемы, связанные как с видоспецифичностью, так и с условиями внешней среды. К числу таких оценочных параметров следует отнести площадь проводящей системы, диаметр элементов ксилемы, толщину клеточной стенки и степень прокрашивания цитоплазмы растительной клетки.

