

УДК 634.1: 58.086

**СПОСОБЫ ЦИТОАНАТОМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА  
РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ САДОВЫХ КУЛЬТУР**

**Дубровский Максим Леонидович**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

element68@mail.ru

**Муратова Светлана Александровна**

кандидат биологических наук, профессор

smuratova@yandex.ru

**Шамшин Иван Николаевич**

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

**Сурайкина Ирина Анатольевна**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

**Хорошкова Юлия Викторовна**

аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

**Аннотация.** Существенно повысить эффективность и ускорить цитоанатомический анализ клеток и тканей садовых культур возможно с помощью подбора современных красителей для световой и люминесцентной микроскопии, применения компьютерных программ фотофиксации микропрепаратов и автоматизированного измерения их количественных показателей.

**Ключевые слова:** садовые культуры, растительные клетки и ткани, цитоанатомический анализ, световая и люминесцентная микроскопия, красители, флуорохромы, пыльца, полиплоидия, культура *in vitro*.

Комплексное изучение биологических признаков и хозяйственно-потребительских качеств садовых культур имеет большое научное и прикладное значение [2, 5, 7, 8, 12, 13]. Немаловажную, но весьма трудоемкую часть в этих исследованиях занимает цитоанатомический анализ растительных клеток и тканей, позволяющий установить уровень ploидности изучаемого генотипа, степень развития у него проводящих тканей, толщину и характер опушения верхнего и нижнего эпидермиса листовой пластинки, количество и размеры устьиц, особенности развития столбчатой и губчатой паренхимы листа, размеры и функциональное состояние пыльцевых зерен, особенности протекания и возможные нарушения мейоза при микроспорогенезе и др. [3, 9, 15]. Так как растительные клетки и ткани характеризуются значительным разнообразием строения, специфическими особенностями роста и развития в связи с выполняемыми функциями, то не существуют единого универсального метода их исследования [1, 4, 6, 10, 14]. Основным из наиболее распространенных и доступных методов изучения растительных клеток и тканей является микроскопия, учитывая их мелкие размеры и невозможность непосредственных визуальных наблюдений. Микроскопия в настоящее время является серьезным аналитическим методом в биологии вследствие значительного совершенствования материально-технической базы, внедрения новых принципов и технологических схем изучения организмов на различных уровнях их структурной организации [3, 11, 16, 17].

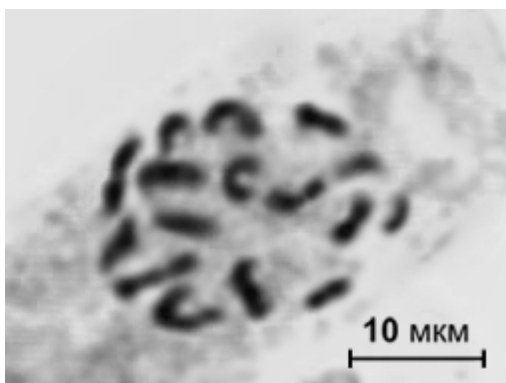
Целью наших исследований являлась оптимизация основных способов цитоанатомического анализа клеток и тканей садовых культур с помощью подбора красителей для световой и люминесцентной микроскопии, применения компьютерных программ фотофиксации микропрепаратов и автоматизированного измерения их количественных показателей.

Объектами исследования служили различные плодовые и ягодные растения из коллекции учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии ФГБОУ ВО

Мичуринский ГАУ – клоновые подвои яблони селекции университета, формы и сорта ежевики, малины красной, малино-ежевичных гибридов, жимолости синей, лимонника китайского, актинидии.

При цитоанатомическом анализе растительных клеток и тканей измерение их размеров, выявление особенностей строения, роста и развития возможно только при использовании современных методов световой или люминесцентной микроскопии. Применение различных красителей значительно расширяет возможности микроскопирования, так как большинство субклеточных структурных элементов прозрачны или плохо различимы из-за мелких размеров. Использование специальных красителей позволяет выборочно окрашивать различные органоиды клетки, контрастируя их и делая видимыми для детального анализа.

Ядра характеризуются значительным изменением размеров в процессе перехода клеток от деления к дифференцировке и росту, достигая максимального значения у старых клеток. Изучение ядерно-цитоплазматического отношения в различных растительных тканях может косвенно свидетельствовать о возрастном состоянии образующих их клеток. Исследование размеров ядер клеток возможно с помощью приемов как световой, так и флуоресцентной микроскопии при обязательном использовании специализированных красителей [1, 3-5].



*Рисунок 1* – Окрашивание ацетогематоксилином метафазных митотических хромосом смородины черной сорта Перун



*Рисунок 2* – Окрашивание ядер клеток мезофилла листа клонового подвоя яблони 54-118 флуоресцентным красителем Hoechst 33258

Наиболее эффективным световым красителем ядер и хромосом является ацетогематоксилин (рис. 1), более дешевым аналогом – ацетофуксин. Среди флуорохромов для окраски ядер используют Hoechst 33258, DAPI (флуоресценция в синей области, рис. 2), йодистый пропидий PI (в красной области).

При анализе роста и развития стеблевой части побегов и молодых корней учитывают интенсивность и характер их одревеснения. Наиболее эффективным реактивом на чистую целлюлозу (клетчатку) является хлор-цинк-йод – раствор металлического йода в хлориде цинка, дающий контрастное сине-фиолетовое окрашивание растительных волокон на общем желтом фоне среза (рис. 3). Степень накопления каллозы в клеточной стенке и ее локализацию можно исследовать с помощью люминесцентного микроскопа при обработке микропрепарата 0,0001%-ным раствором анилинового синего; аналогично изучают характер и интенсивность роста пыльцевых трубок на рыльце и в столбике пестика, дополнительно используя щелочь в качестве мацерирующего раствора.

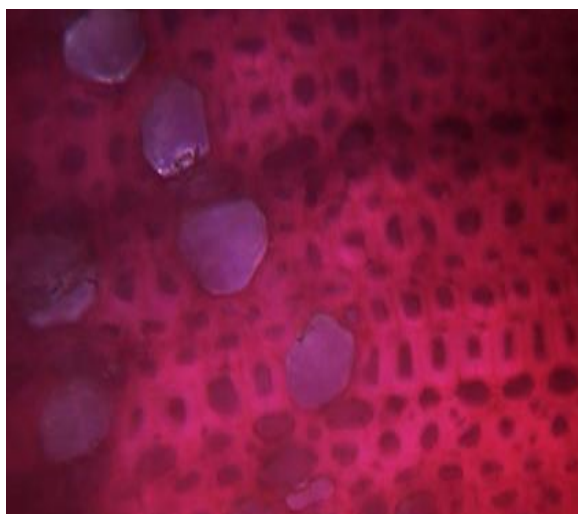
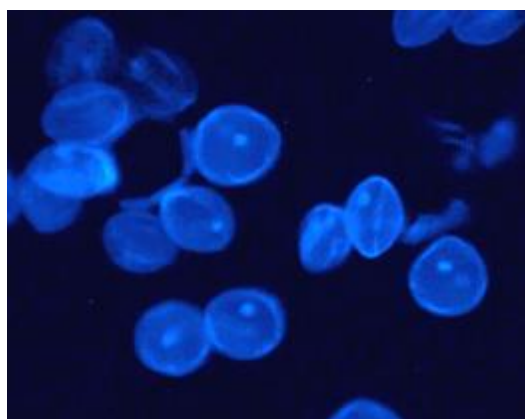


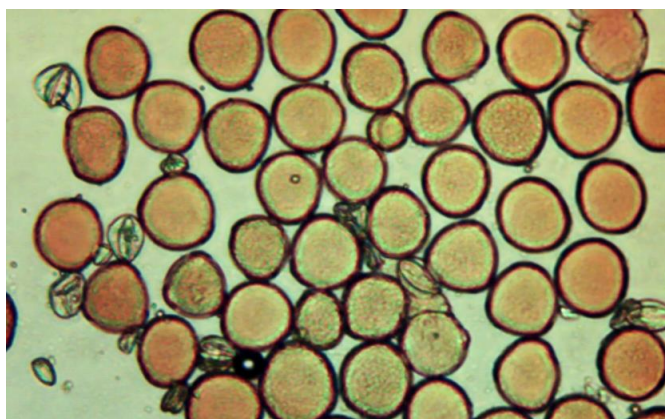
Рисунок 3 – Окрашивание хлор-цин-йодом клеток ксилемы побега клонового подвоя яблони 62-396

Значительное место в цитологических исследованиях многих культур занимает анализ их пыльцы. Пыльцевые зерна являются уникальными растительными клетками. Их ядро в процессе деления дает начало двум спермиям,

в совокупности являющимся мужским гаметофитом – гаплоидным поколением в жизненном цикле всех высших растений. Анализ размеров и особенностей строения пыльцевых зерен позволяет оперативно сделать предварительное заключение о протекании мейоза при микроспорогенезе: одномерность их диаметра, расположения и степени симметричности расположения ростовых пор – апертур могут свидетельствовать о полном или значительном отсутствии серьезных нарушений редукционного деления [1, 5]. В селекции растений иногда оказывается важным выделение и использование полиплоидных генотипов с наименьшими нарушениями мейоза, являющихся ценными донорами нередуцированных гамет и отцовскими формами при искусственной гибридизации. Применяя ядерные красители (более эффективное окрашивание получают флуорохромами), можно быстро установить количество ядер в пыльцевом зерне и стадию ее развития (рис. 4). Световые красители – ацетокармин, фуксин – позволяют окрасить цитоплазму пыльцевого зерна, благодаря чему измерить его диаметр, выявить расположение ростовых пор – апертур, а также подсчитать количество фертильной и стерильной пыльцы (рис. 5).



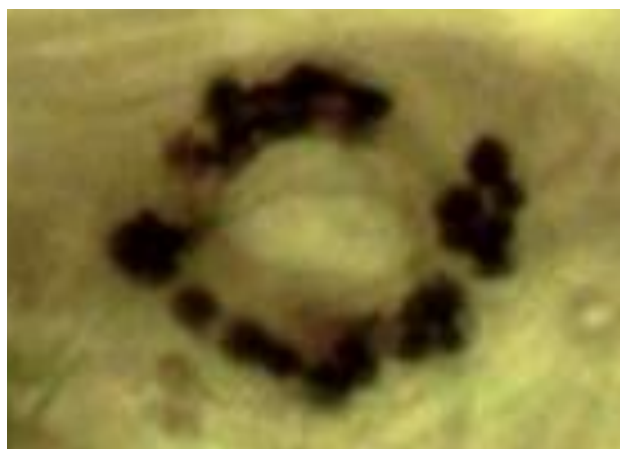
*Рисунок 4* – Окрашивание ядер пыльцы земляники садовой сорта Фестивальная флуоресцентным красителем Hoechst 33258



*Рисунок 5* – Окрашивание ацетокармином пыльцевых зерен жимолости синей сорта Лазурная

Важную роль в жизнедеятельности всех растений играют устьица,

состоящие из двух замыкающих клеток и регулирующие процесс транспирации. Размер замыкающих клеток устьиц и количество хлоропластов в них, а также плотность распределения устьиц в эпидермисе листовой пластинки являются косвенными маркерными признаками полиплоидных генотипов, а также учитываются при анализе потерь листом испаряемой влаги в условиях засухи и действия повышенных температур [6]. Для контрастирования устьиц на фоне эпидермальной ткани можно использовать раствор Люголя – раствор металлического йода в йодиде калия, окрашивающий крахмал в хлоропластах в темно-синий цвет. В крупных устьицах хлоропласты становятся отчетливо заметными, что делает возможным их подсчет (рис. 6).



*а*



*б*

*Рисунок 6 – Окрашивание раствором Люголя крахмала в хлоропластах замыкающих клеток устьиц: а – яблони; б – ежевики*

После подбора необходимого красителя и приготовления микропрепарата для предотвращения его быстрого обесцвечивания рекомендуется провести фотофиксацию полученных в поле зрения микроскопа изображений с помощью различных современных технических средств – цифровых фотоаппаратов с адаптерами тринокулярного канала, фотоокуляров.

Обработка полученных цифровых изображений с помощью различных графических редакторов позволяет повысить качество итоговой фотографии. Объединение нескольких изображений с соседних полей зрения в единую панораму позволяет получить крупную картину клеточной популяции или большого фрагмента растительной ткани. С помощью обработки фотографий одного и того же объекта, но с разной глубиной резкости можно создать его целостное трехмерное изображение с одинаковой фокусировкой всех участков – и переднего, и заднего плана. Подобную обработку можно осуществить в специализированной программе *Helicon Focus* или ее аналогах, а также средствами наиболее распространенного графического редактора *Adobe Photoshop*.

После получения первичных фотоизображений, их обработки и сохранения преобразованных файлов в случае необходимости можно с помощью соответствующего программного обеспечения проводить их промежуточный автоматизированный анализ – бинаризацию, сегментацию и др., а также измерять линейные размеры, периметр и площадь различных морфологических структур. Одной из наиболее распространенных программ для анализа изображений в биологии является международный графический редактор *ImageJ* с открытым доступом и открытым программным кодом.

Таким образом, применение при цитоанатомическом анализе красителей, специфических для каждого метода окрашивания при использовании световой и люминесцентной микроскопии, позволяет контрастировать растительные ткани, клетки и субклеточные структуры, повышая точность измерения их размеров, выявления особенностей строения, роста и развития. Фотосъемка таких микропрепаратов и измерение их количественных показателей с помощью компьютерного программного обеспечения позволяет упростить и ускорить цитоанатомический анализ растений, в том числе садовых культур.

*Исследования выполнены в рамках проекта №5-МУ-19(02) при финансовой*

*поддержке Управления образования и науки Тамбовской области и Совета молодых ученых и специалистов Тамбовской области.*

### **Список литературы:**

1. Дубровский, М.Л. Получение и отбор генотипов плодовых и ягодных культур с измененным уровнем ploидности: методика / М.Л. Дубровский, А.С. Лыжин, Н.Ю. Ван-Ункан. – Мичуринск, 2013. – 52 с.
2. Исследования товарных качеств и комплекса биологически активных веществ ягод малины (*Rubus idaeus* L.) в условиях ЦЧР / Л.В. Титова, И.Б. Кирина, А.А. Обьедков, Е.Г. Титова // Сб.: Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XVI Международной научной конференции. - 2019. - С. 429-433.
3. Кирина, И.Б. Задачник по генетике: учебное пособие / И.Б. Кирина, Ф.Г. Белосохов, Л.В. Титова. - Мичуринск: Издательство Мичуринский государственный аграрный университет, 2020. - 155 с.
4. Кирина, И.Б. Некоторые материалы для ведения Красной книги Тамбовской области / И.Б. Кирина // Сб.: Разнообразие и устойчивое развитие агробиоценозов Омского Прииртышья: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной 90-летию ботанического сада Омского ГАУ. - Омск, 2017. - С. 57-60.
5. Количественный анализ листовой поверхности перспективных генотипов клоновых подвоев яблони селекции Мичуринского ГАУ / М.Л. Дубровский, Н.Л. Чурикова, А.В. Кружков, К.О. Соболева // Наука и Образование. - 2020. - Т. 3. - № 1. - С. 75.
6. Методические рекомендации по применению цитологических методов в плодоводстве. – М.: Типография ВАСХНИЛ, 1988. – 52 с.
7. Методический подход к экспериментальной оценке жаростойкости плодовых культур при анализе динамики флуоресценции хлорофилла / М.Л.



Дубровский, М.Ю. Пимкин, Р.Е. Кириллов // Плодоводство и ягодоводство России. - 2016. - Т. 47. - С. 124-127.

8. Оценка биометрических показателей кроны сортоподвойных комбинаций яблони в условиях сада / М.Л. Дубровский, Ан.В. Кружков, Р.В. Папихин [и др.] // Сб.: Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XV Международной научной конференции. – Брянск, 2018. - С. 439-444.

9. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений. Изд. 4-е, перераб. и доп. / З.П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

10. Попова, И.Б. Биологические особенности формирования урожая жимолости: автореф... дис. канд.с-х.н. / И.Б. Попова. – Мичуринск, 2000. – 22 с.

11. Селекция садовых культур: учебное пособие / Н.С. Самигуллина, Н.И. Савельев, С.Л. Расторгуев [и др.]. - Мичуринск, 2013. - 330 с.

12. Способ цитоанатомического изучения пыльцы растений с помощью люминесцентной микроскопии / М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, И.Б. Кирина [и др.] // Наука и Образование. - 2020. - Т. 3. - № 1. - С. 74.

13. Сравнительная оценка биохимического состава ягод перспективных сортов смородины черной / Л.В. Титова, И.Б. Кирина, Г.С. Усова, А.С. Ратушный // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания. - 2019. - № 2 (28). - С. 16-21.

14. Топильская, Л.А. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах / Л.А. Топильская, С.В. Лучникова, Н.П. Чувашина // Бюллетень научной информации ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – Вып. 22. – Мичуринск, 1975. – С. 58-61.

15. Цитологические исследования плодовых и ягодных культур: методические рекомендации / Под ред. Г.А. Курсакова. – Мичуринск, 1976. – 104 с.

16. Dubrovsky, M.L. Analysis of the karyotype of the russian apple tree clonal

rootstocks bred at the Michurinsk State Agrarian University / M.L. Dubrovsky, R.V. Papikhin // Amazonia Investiga. - 2019. - T. 8. - № 21. - C. 688-698.

17. Papikhin, R.V. The statistical analysis of cytomorphological traits in the distant apple and pear F1 and F2 hybrids (*Malus x pyrus*) from artificial and spontaneous outcrosses/ R.V. Papikhin, M.L. Dubrovsky // Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. «Advances in Intelligent Systems Research». - 2019. - C. 363-367.

**UDC 634.1: 58.086**

**METHODS OF CYTOANATOMICAL ANALYSIS OF PLANT CELLS AND  
TISSUES OF GARDEN CROPS**

**Dubrovsky Maxim Leonidovich**

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

element68@mail.ru

**Muratova Svetlana Alexandrovna**

Candidate of Biological Sciences, Professor

smuratova@yandex.ru

**Shamshin Ivan Nikolaevich**

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory

**Suraykina Irina Anatolyevna**

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

**Khoroshkova Yulia Viktorovna**

graduate student

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

**Abstracts.** The use of modern stains for light and fluorescence microscopy, computer programs for photographic fixation of micropreparations and automated measurement of their quantitative indicators allow to significantly increase the efficiency and speed up time of the cytoanatomical analysis of cells and tissues of garden crops.

**Key words:** garden crops, plant cells and tissues, cytoanatomical analysis, light and fluorescence microscopy, stains, fluorochromes (fluorescence stains), pollen. polyploidy, *in vitro* culture.