

Торутанов Павел Сергеевич

лаборант-исследователь

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИЗГОТОВЛЕНИЯ
ПОСТОЯННЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАСТЕНИЙ
В КАЧЕСТВЕ ДЕМОНСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА
ДЛЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

Аннотация: в статье отражены этапы оптимизации гистологической техники по приготовлению постоянных гистологических препаратов растений, в зависимости от экологической группы, как наглядно-демонстрационного материала, входящих в состав Учебных наборов «Ткани растений» (сертификат №0166385) НИЦ ФППББ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» для образовательных учреждений.

Ключевые слова: гистологические препараты, школьные наборы, растения, гистологическая техника, образовательный процесс, ботаника.

Согласно приказу Министерства просвещения РФ от 06.09.2022 г. №804 «Об утверждении перечня средств обучения и воспитания, соответствующих современным условиям обучения, необходимых при оснащении общеобразовательных организаций в целях реализации мероприятий государственной программы Российской Федерации «Развитие образования», направленных на содействие созданию (создание) в субъектах Российской Федерации новых (дополнительных) мест в общеобразовательных организациях, модернизацию инфраструктуры общего образования, школьных систем образования, критериев

его формирования и требований к функциональному оснащению...» с целью оказания помощи образовательным организациям в приобретении демонстрационных материалов оптимизирован протокол изготовления гистологических препаратов растений, в качестве демонстрационного наглядного учебного материала. Учебный материал в виде гистологических препаратов обеспечит более глубокое фундаментальное изучение школьного материала по строению тканей и органов растений согласно обновленному ФГОС ООО, который устанавливает требования к оснащению кабинетов по отдельным предметным областям, в частности, кабинетов естественно-научного цикла по комплектации специальным лабораторным оборудованием (п. 36.3 ФГОС ООО; п. 36.1 ФГОС НОО, п. 37.3 ФГОС ООО). В рамках ФГОС наглядный демонстрационный учебный материал – гистологические препараты обеспечат удовлетворение индивидуальных образовательных интересов каждого школьника как способ сформировать у обучающихся навыки организации учебной деятельности; ориентирует обучающихся в выборе будущей профессии; позволят углубить и расширить знания в предметной области; обеспечат возможность обучающегося организовывать свою учебно-познавательную деятельность [4; 5].

В связи с этим на базе НИЦ ФППББ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» разработаны Учебные наборы гистологических препаратов «Ткани растений» (сертификат №0166385).

Изготовление гистологических препаратов включает несколько обязательных этапов: вырезка материала, фиксация, дегидратация, проводка по парафинам, изготовление срезов и их окраска [3], которые зависят от принадлежности растения к определенной экологической группе.

При вырезке материал располагают горизонтально или вертикально, в зависимости от задач исследователя. Вырезку осуществляют скальпелем с однолезвными сменными лезвиями от руки.

С целью остановить процессы гибели тканей, фрагменты фиксируют для сохранности структурной и биохимической организации. Соотношение объема фиксатора к объему ткани должна составлять 1:10. Длительность фиксации за-

висит от выбранного материала: от нескольких часов до одних суток. В качестве фиксаторов можно использовать: спирт 70%; формалин (10%); Фиксатор Кларка (состав: этиловый спирт 96°– 3 части, ледяная уксусная кислота – 1 часть); смесь Темпера (состав: хлорная медь – 0,2 г, азотнокислая медь – 0,2 г, фенол – 1 г, вода – 99 мл) и другие [1; 7].

Следующим этапом проводят дегидратацию фиксированного материала по батарее спиртов возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%), для удаления избытков воды и уплотнения материала. Длительность дегидратации также подбирается экспериментально, и может составлять от нескольких часов до нескольких суток.

Далее следует проводка по парафинам, необходимая для замещения жидкостной составляющей ткани на парафин. Она обеспечивает уплотнение ткани, которое необходимо для получения срезов. После этого материал заливается в парафиновые блоки, с которых на микротоме делают срезы. Толщин срезов зависит от целей исследователя, так для подсчета хромосом она составляет от 10 до 15 мкм, а при эмбриологических исследованиях – 15–25 мкм [1]. Изготовленные срезы помещают на предметное стекло и окрашивают красителем, при этом выбор красителя зависит от задач, которые стоят перед исследователем: клеточную стенку окрашивает краситель нейтральный красный (основные красители), в материале, который содержит дубильные вещества концентрируется метиленовый синий (с которыми вступает в реакцию). Отдельные клеточные структуры, на пример митохондрии окрашивает Янус зеленый. Для окраски цитоплазмы клеток используют акридиновый оранжевый, также применяют и другие красители [1]. Время окрашивания каждым конкретным красителем стоит подбирать экспериментально.

После окраски для получения постоянного гистологического препарата окрашенные срезы на предметном стекле заключают под покровное стекло в монтирующую среду. В качестве монтирующей среды используются канадский бальзам, пихтовый бальзам или витрогель [3].

Материалы и методы исследования.

В работе использовали растения группы:

– сциогелиофиты (теневыносливые растения) – липа европейская (*Tilia europaea*);

– склерофитов (засухоустойчивые растения) – иглица колючая (понтийская) (*Ruscus aculeatus*);

– гелиофиты (светолюбивые растения) – герань зональная (*Pelargonium zonale*) и фикус эластика (*Ficus elastica*).

Гистологические срезы изготавливались на полуавтоматическом ротационном микротоме (Thermo Fisher Scientific, США). Микроскопия приготовленных препаратов производилась на микроскопе Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия).

Полученные результаты.

Для отработки протокола изготовления постоянных гистологических препаратов проводился забор стеблевых частей растения вида липа европейская (*Tilia europaea*), листовой пластики (рис. 2) фикус эластика (*Ficus elastica*) и листового филлокладия иглицы колючей (понтийская) (*Ruscus aculeatus*) [2].

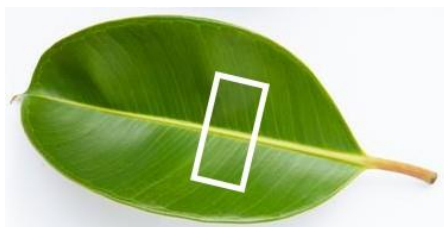


Рис. 1. Схема забора фрагментов листовой пластинки фикус эластика (*Ficus elastica*) – выделено цветом

Методика приготовления препарата (рис. 2) листа фикус эластика (Ficus elastica). При вырезке материала, лист располагали горизонтально, скальпелем изготавливались фрагменты, которые помещали в фиксатор (70% спирт, в соотношении 1:10). Материал фиксировался при комнатной температуре в темном месте в течении 24 часов. По истечении времени фиксации проводили дегидратацию в спиртовой батарее, возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%). В каждом спирте фрагменты находились в течении 24 часов. После дегидратации

фрагменты пропитывались в трёх ёмкостях с парафином (чистый парафин с синтетическими добавками «ЭргоПродакшн», Россия). В каждом парафине материал выдерживался 1 час, затем следовала заливка материала и изготовление парафиновых блоков. С парафиновых блоков изготавливали серийные срезы толщиной 15 мкм.

Аналогично был приготовлен препарат стебля липы европейской (*Tilia europaea*) и листового филлокладия иглицы колючей (понтийская) (*Ruscus aculeatus*). Для окраски использовали красители гематоксилин («ЭргоПродакшн», Россия) и метиленовый синий. («Невареактив», Россия), покрывали под покровное стекло витрогелем – синтетической монтирующей средой («ЭргоПродакшн», Россия).

Для изучения строения и формы клеток, типов устьичных комплексов, особенностей опушения листьев необходимо сделать препарат эпидермиса. Для этих целей лучше всего подходит эпидермис герани зональной (*Pelargonium zonale*) [2]. Для приготовления препарата снимают эпидермис с нижней стороны листа между жилками. Это делается при помощи препаровальной иглы и пинцета: между боковых жилок аккуратно делают небольшой разрез, подхватывают край эпидермиса пинцетом и тянут слой клеток, прижимая его к листу под острым углом. Для препарата был использован кусочек размеров 2–3 мм.

На рисунках 3, 4, 5, 6 представлены некоторые гистологические препараты растений, входящие в состав учебных наборов «Ткани растений» НИЦ ФППББ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

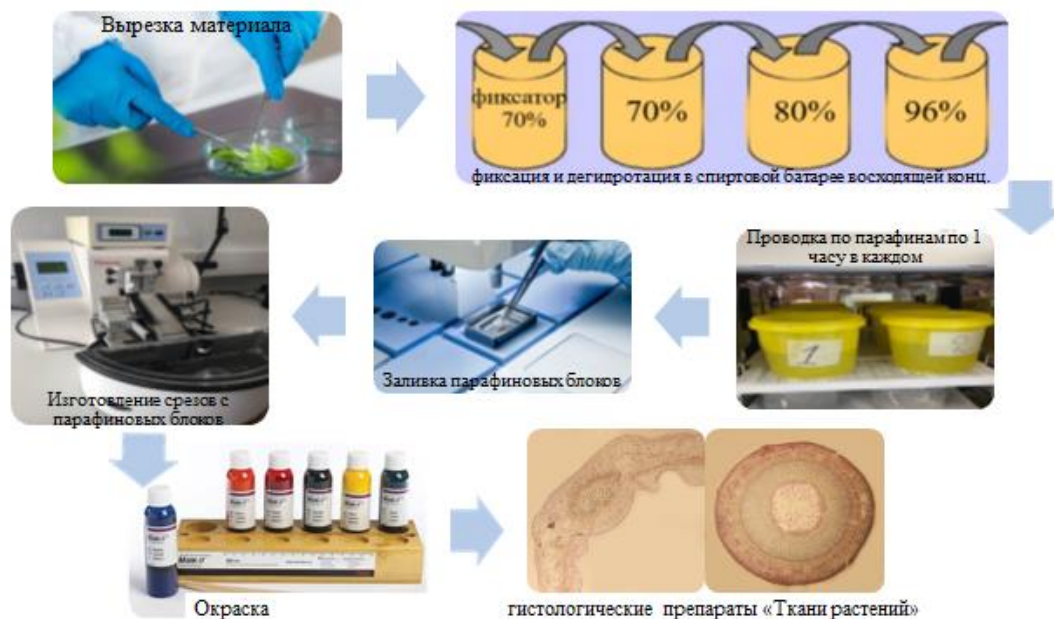


Рис. 2. Схема приготовления препарата листа филоды эластика (*Ficus elastica*) и препарат стебля липы европейской (*Tilia europaea*)



Рис. 3. Стебель (3х летний) липы европейской (*Tilia europaea*)

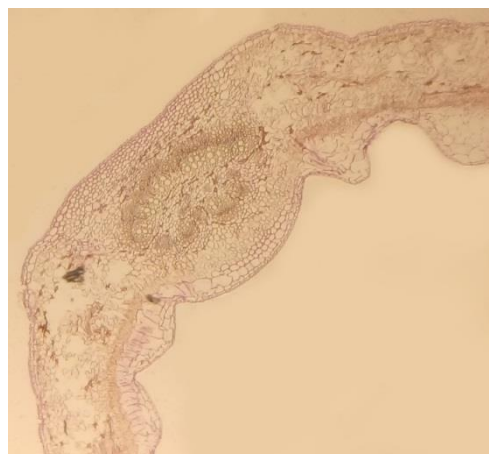


Рис. 4. Срединная жилка листа филоды эластика (*Ficus elastica*)

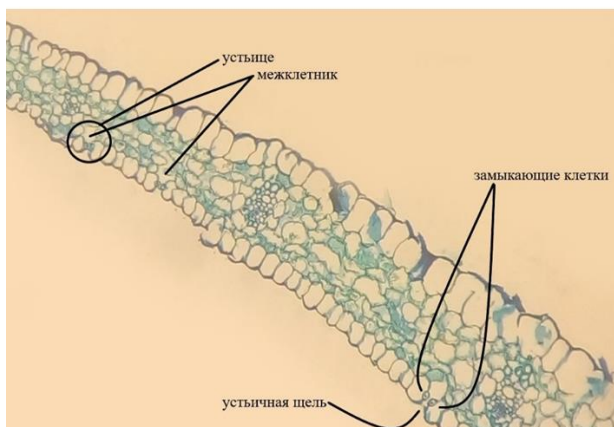


Рис. 5. Срез листа иглицы колючей (понтийская) (*Ruscus aculeatus*)

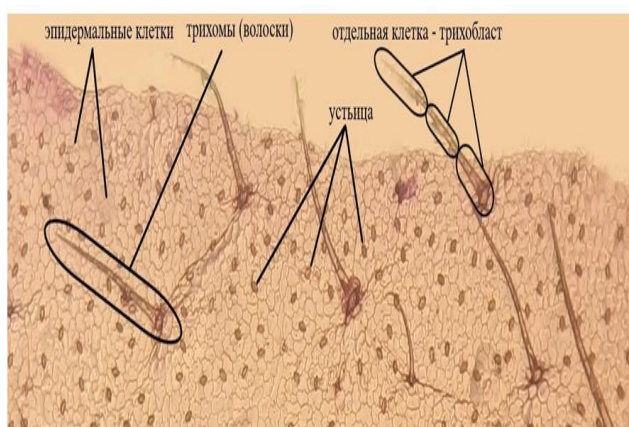


Рис. 6. Герань зональная (*Pelargonium zonale*). Эпидермис

Таким образом, в зависимости от органа и экологической группы растения проведена оптимизация этапов гистологической техники по приготовлению гистологических препаратов растений. Качественные гистологические препараты растений, входящие в состав Учебных наборов «Ткани растений» (сертификат №0166385) НИЦ ФППББ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» являются демонстрационным наглядным учебным материалом для образовательных учреждений по разделу ботаника.

Список литературы

1. Барыкина Р.П. Справочник по ботанической микротехнике / Р.П. Барыкина, Ю.Т. Дьяков, С.Н. Лекомцева [и др.]. – М.: МГУ, 2004. – 312 с.
2. Губанов И.А. Определитель сосудистых растений / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков [и др.]. – М.: Аргус, 1995.
3. Мавликеев М.О. Краткий курс гистологической техники: учебно-методическое пособие / М.О. Мавликеев, С.С. Архипова, О.Н. Чернова [и др.]; под науч. ред. канд. мед. наук, доцента Р.В. Деева. – Казань, 2020.
4. Приказ Министерства просвещения РФ от 31 мая 2021 г. №286 «Об утверждении Федерального государственного образовательного стандарта начального общего образования».
5. Приказ Министерства просвещения Российской Федерации от 31.05.2021 №287 «Об утверждении Федерального государственного образовательного стандарта основного общего образования».
6. Яковлев Г.П. Ботаника: учебник для вузов / Г.П. Яковлев, В.А. Челомбитько, В.И. Дорофеев. – СПб.: СпецЛист, 2008.
7. Zelko I., Lux A., Sterckeman T., Martinka M., Kollárová K., Lišková D. An easy method for cutting and fluorescent staining of thin roots // Annals of Botany, Volume 110, Issue 2, 1 July 2012. P. 475–478.