

УДК 634.8

**ПРОГРАММНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
СТРУКТУР ОДНОЛЕТНИХ
ЧЕРЕНКОВ ВИНОГРАДА**

Никольский Максим Алексеевич
канд. с.-х., наук, доцент
ст. научный сотрудник
лаборатории виноградарства
и виноделия

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
Анапская зональная опытная станция
виноградарства и виноделия СКЗНИИСХВ,
Анапа, Россия*

В материалах статьи приводится краткий литературный обзор значения вызревания виноградных черенков на вегетативное размножение винограда. Приводится связь между вызреванием, физиолого-биохимическими характеристиками и анатомическим строением однолетнего одревесневшего побега винограда. Определяется, что анатомическая структура однолетнего вызревшего побега винограда – один из главных критериев оценки вызревания лозы. На анатомическую структуру и вызревание побегов оказывает влияние ряд факторов: сортовые и видовые особенности; почвенно-климатические условия выращивания; питательный режим; применяемая агротехника и способ выращивания. Указывается, что изучение анатомических структур черенков винограда является актуальным направлением исследований в виноградарстве. Детально, с подробными иллюстрациями описывается предлагаемый способ. Указывается, что предлагаемый способ определения процентного отношения тканей флоэмы, ксилемы и сердцевины к общему диаметру черенка и подсчет количества ситовидных трубок, довольно прост в освоении, намного точнее и оперативнее ручного подсчета.

UDC 634.8

**SOFTWARE TECHNICAL
METHODS OF DEFINITION
OF ANATOMICAL AND
MORPHOLOGICAL STRUCTURES
OF ANNUAL GRAPES SHOOTS**

Nikolsky Maxim
Cand. Agr. Sci., Docent
Senior Research Associate
of Laboratory of Viticulture
and Wine-making

*Federal State Budget Scientific
Institution Anapa's Zonal
Experimental Station of Viticulture
and Wine-making of NCRRIS&V,
Anapa, Russia*

The materials of the article is a brief literature review of value of ripening grapes cuttings for vegetative propagation of vines. The connection between aging, physiological and biochemical characteristics and the anatomical structure of the annual lignified grapes cutting is given. It is determined that the anatomical structure of the one-year matured shoots of grapes – is the one of the main criteria for evaluating of the ripening vines. On the anatomical structure and aging of shoots a number of factors affect: sort and specific features; soil and climatic conditions of growing; nutrient status; agricultural and cultivation method. It is pointed out that the study of anatomical structures of grapes cuttings is a topical area of research in viticulture. Detaily, with detailed illustrations the proposed method is describes. It is pointed out that the proposed method of determining of percentage of tissue phloem, xylem and core to the overall diameter of the cutting, and counting of the number of sieve tubes is quite easy to learn and more accurate

Единственным слабым местом, которое может сильно повлиять на конечный результат, является качество обрабатываемых фотографий, но здесь все зависит от исследователя. Авторы не умаляют достоинств классических гистохимических исследований и утверждают, что предлагаемый способ может дополнить существующие методики.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, ВЕГЕТАТИВНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ, РЕГЕНЕРАЦИЯ, ЧЕРЕНКИ, АНАТОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, НОВЫЙ СПОСОБ

and operative than manual counting procedure speedily. The only weak point that can greatly affect the end result is the quality of the processed photos, but here all depends from the researcher. The authors don't increase the merits of classical histochemical studies, and argue that the proposed method can complete the existing methodologies.

Key words: GRAPES, VEGETATIVE PROPAGATION, REGENERATION, CUTTINGS, ANATOMIC STRUCTURES, HISTOCHEMICAL STUDY, NEW METHOD

Введение. Для винограда, как и для большинства плодовых культур, основным способом размножения является вегетативный, который базируется на регенерации тканей и органов. При размножении винограда, в основном, используется репаративная регенерация – процесс, ведущий к восстановлению целого растения из отдельной его части [1].

Для вегетативного размножения винограда используются только стеблевые побеги (черенки), на которых находится не менее одной нормально развитой почки, заготовленные в период покоя растения [2]. Побег является одним из основных органов виноградного растения, объединяющий стебель с расположенными на нем листьями и почками; выполняет все жизненные функции куста. Целостность побега, как единого органа, подчеркивается общностью происхождения, единством проводящей системы листьев и стеблей и формированием их в онтогенезе из конуса нарастания [3]. Одревесневшие черенки винограда, используемые для вегетативного размножения, должны быть физиологически зрелыми (вызревшими) [2, 4]. Вызревание зеленого однолетнего побега является следствием глубоких физиолого-биохимических превращений, связанных с развитием тканей и изменениями в анатомической структуре побега [5, 6].

Все изменения побега, связанные с вызревaniem, коррелируют с анатомической структурой, которая представляет собой сочетание механических и проводящих тканей разного функционального назначения (кора, проводящая ткань древесины (флоэма и ксилема), сердцевина). Так, у физиологически зрелых побегов четко видна граница между лубом и древесиной (ксилемой); пучки твердого луба равномерно расположены в толще флоэмы, а расстояние между последним пучком твердого луба примерно равно расстояниям между другими пучками [7]. В то же время у невызревших побегов последние пучки твердого луба недоразвиты и прилегают плотно к камбию. Помимо дифференциации, различные ткани накапливают разные углеводы. Основной запас крахмала сосредоточен в клетках древесины (ксилемы) и сердцевинных лучах, сахаров же больше находится в камбиальных, лубяных клетках перидермы [8]. Таким образом, анатомическая структура однолетнего вызревшего побега винограда – это один из главных критериев оценки вызревания лозы. Толщину и соотношение структурных компонентов однолетнего побега преимущественно определяют вид и сорт винограда. На анатомическую структуру и вызревание побегов оказывает влияние ряд факторов, к которым относятся: сортовые и видовые особенности; почвенно-климатические условия выращивания; питательный режим; применяемая агротехника и способ выращивания.

Изучение анатомической структуры однолетних вызревших побегов проводится для: установления взаимосвязи с морозостойкостью кустов [5, 7]; изучения особенности развития сортов разных эколого-географических групп [9, 10]; определения зависимости между анатомической структурой, плодоносностью побега, и его регенерационными свойствами [11]; определения зависимости между анатомическим строением и накоплением пластических веществ [12, 13].

Объекты и методы исследований. Основным методом при изучении анатомической структуры является методика гистохимических исследований с использованием микротомных срезов, их микроскопированием и

измерением анатомических структур с помощью объект- и окулярмикрометров [7, 14, 15]. Измерение толщины побегов и отношение к ней величины флоэмы, ксилемы и сердцевины производится штангенциркулем.

Мы, при начале работ по НИР № госрегистрации 114063040035, столкнулись с определенными трудностями в освоении данного метода, которые заключались в отсутствии сотрудников, обладающих опытом проведения подобных исследований, а также отсутствием микротомы и невозможностью его приобретения из-за значительной стоимости. В связи с этим было принято решение применять в работе программы, использующие методы компьютерного зрения с автоматическим подсчетом объектов.

Обсуждение результатов. Для получения снимков объектов исследования, необходимых для дальнейшей обработки, использовался цифровой однообъективный зеркальный фотоаппарат NIKON D5100 в связке с объективом Nikon DX AF-S Micro Nikkor 40mm 1:2.8G, штативом и кольцевой макровспышкой MeiKeFC100. Срезы делались с помощью окулировочного ножа, после чего помещались на предметное стекло и фотографировались (рис. 1).

Дальнейшая наша работа заключалась в определении процентного соотношения тканей флоэмы, ксилемы и сердцевины к общему диаметру. Для этого мы использовали экранную рулетку Universal Desktop Ruler v. 3.6.3481, данная программа является результатом работы отечественной софтверной компании (стоимость составляет 490 рублей), нами использовалась 30-дневная trial-версия [16]. Для ее использования необходимо в любом просмотрщике изображений открыть фотографию, после чего левой кнопкой «мыши» активировать команду Площадь+Периметр программы Universal Desktop Ruler (рис. 2). Затем, последовательно, с помощью «мыши» выделяется контур флоэмы, ксилемы и сердцевины и определяется площадь в пикселях, с помощью полученных данных определяется процентное соотношение тканей к общему диаметру черенка (рис. 3).



Рис. 1. Фотография среза черенка подвоя винограда сорта Кобер 5ББ

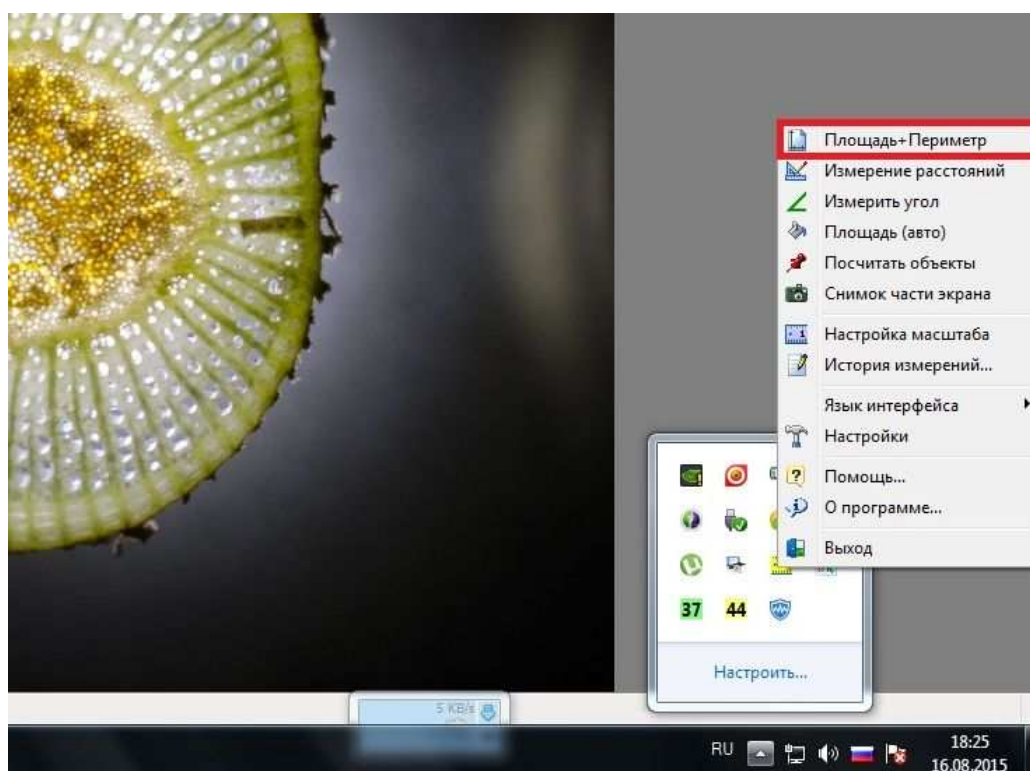
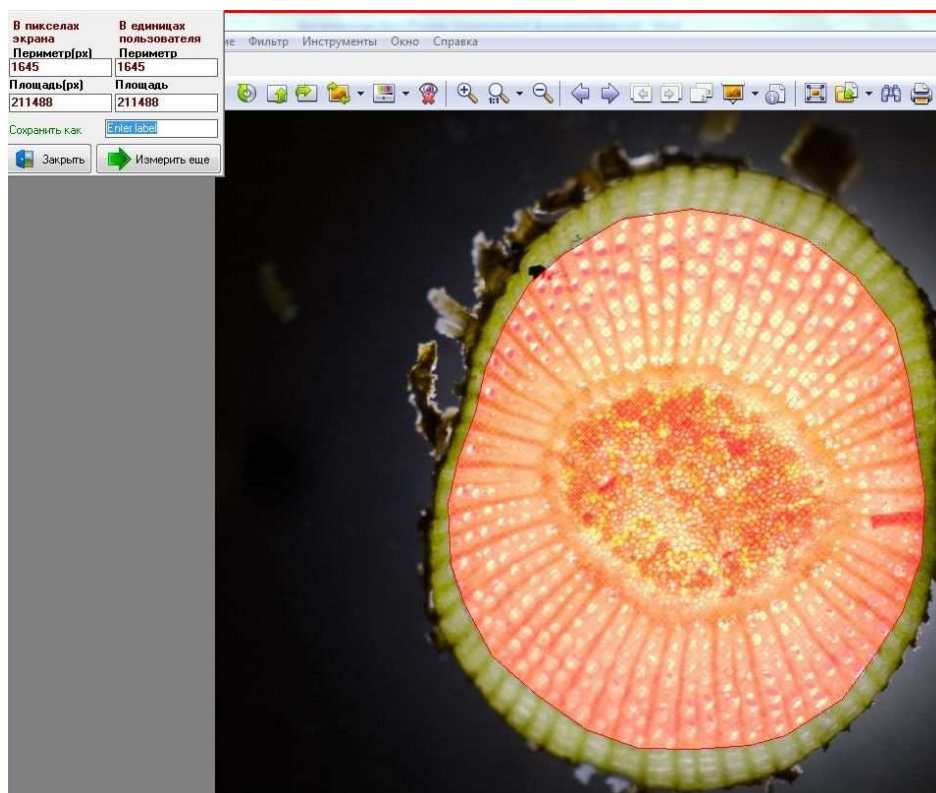
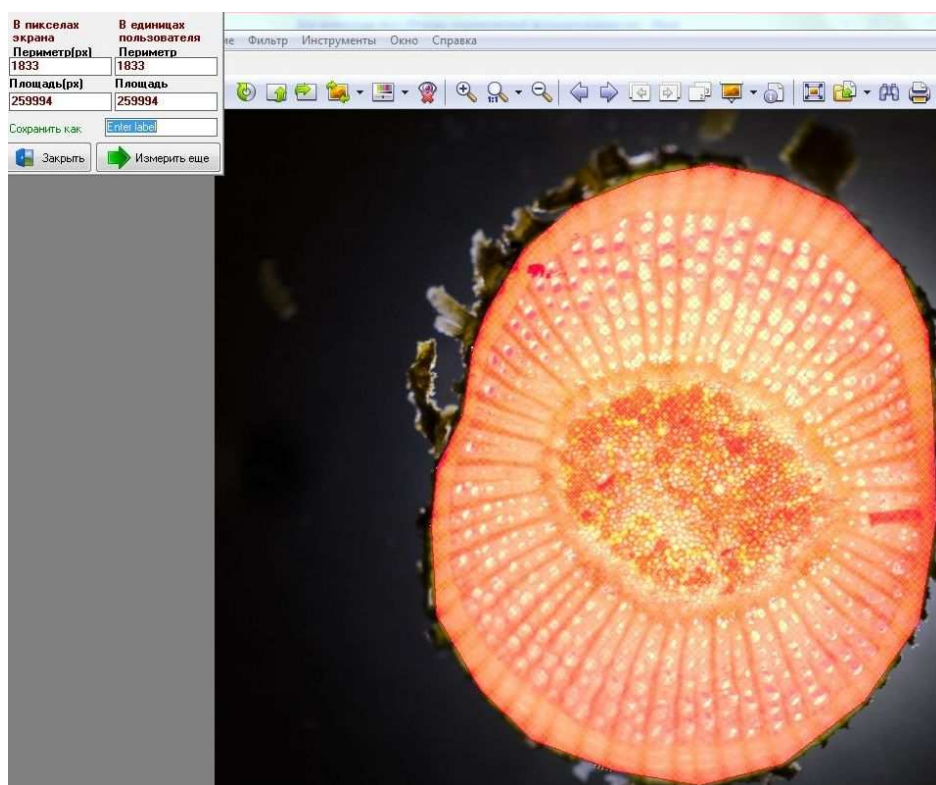
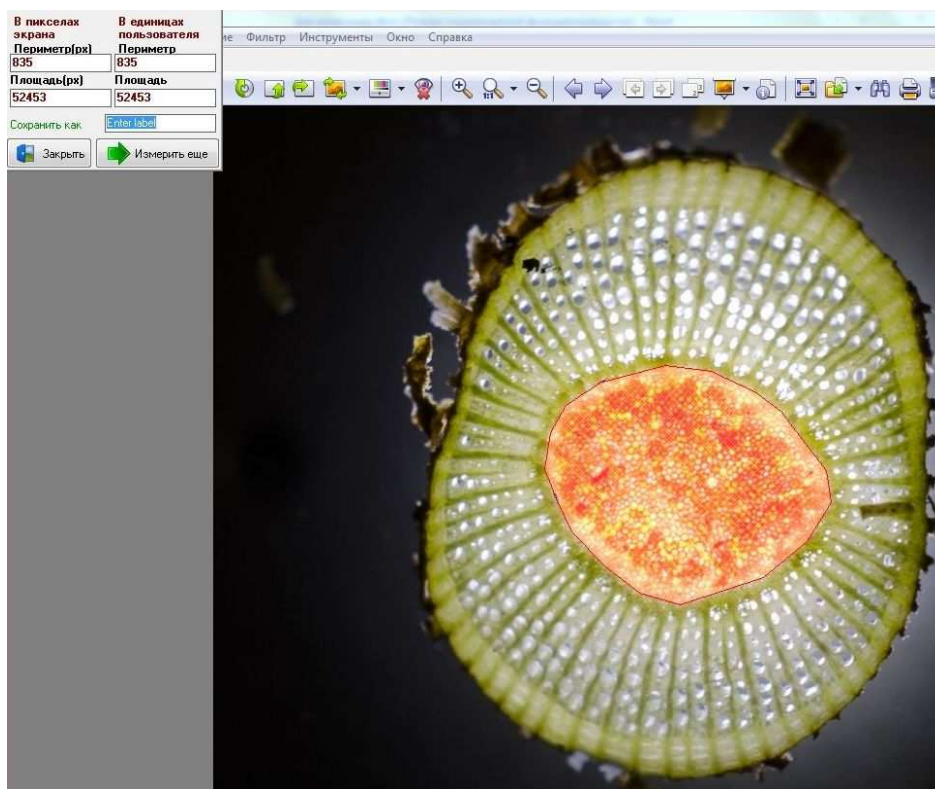


Рис. 2. Активация команды Площадь+Периметр программы UniversalDesktopRuler





3

Рис. 3. Вычисление площади в пикселях, 1 – общая площадь, 2 – площадь ксилемы и сердцевины, 3 – площадь сердцевины

После определения процентного отношения тканей флоэмы, ксилемы и сердцевины к общему диаметру черенка мы определяли общее количество ситовидных трубок и сердцевинных лучей. Количество ситовидных трубок определялось с помощью программы ImageJv.1.49i с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. Программа написана на языке Java сотрудниками NationalInstitutesofHealth и распространяется без лицензионных ограничений как общественное достояние [17].

Прежде чем приступить к определению количества ситовидных трубок необходимо область сердцевины закрасить однотонным цветом или градиентом в любом векторном графическом редакторе. Это делается для того что бы исключить вероятность ошибочного учета клеток сердцевины в качестве ситовидных трубок. Затем программой ImageJ открывается интересующая нас фотография и следующим набором команд производится обработка и подсчет ситовидных трубок: File- >Open (рис. 4).

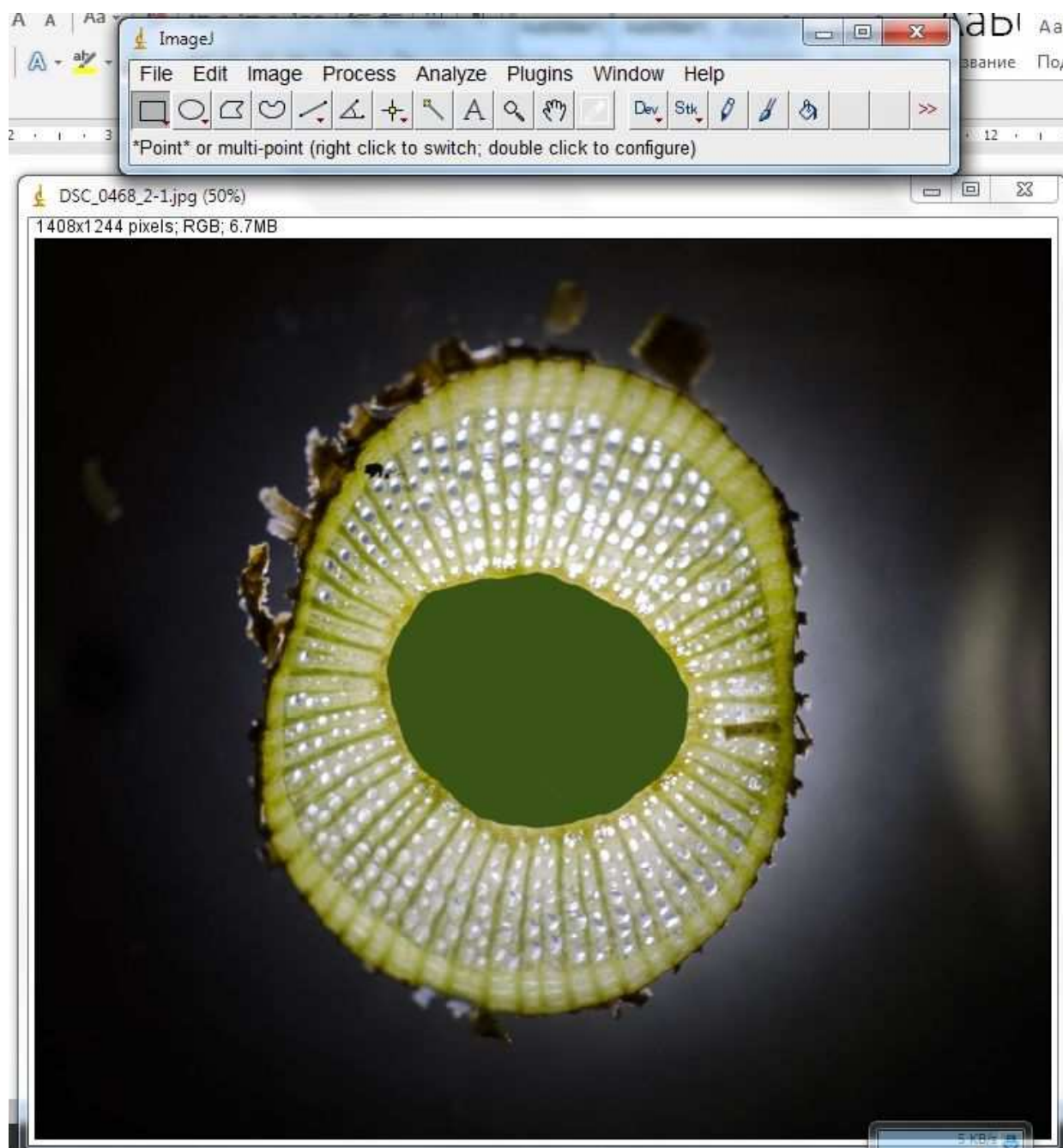


Рис. 4. Открытие изображения для обработки
в программе ImageJ

Image - >Type -> 8 bit (рис. 5)

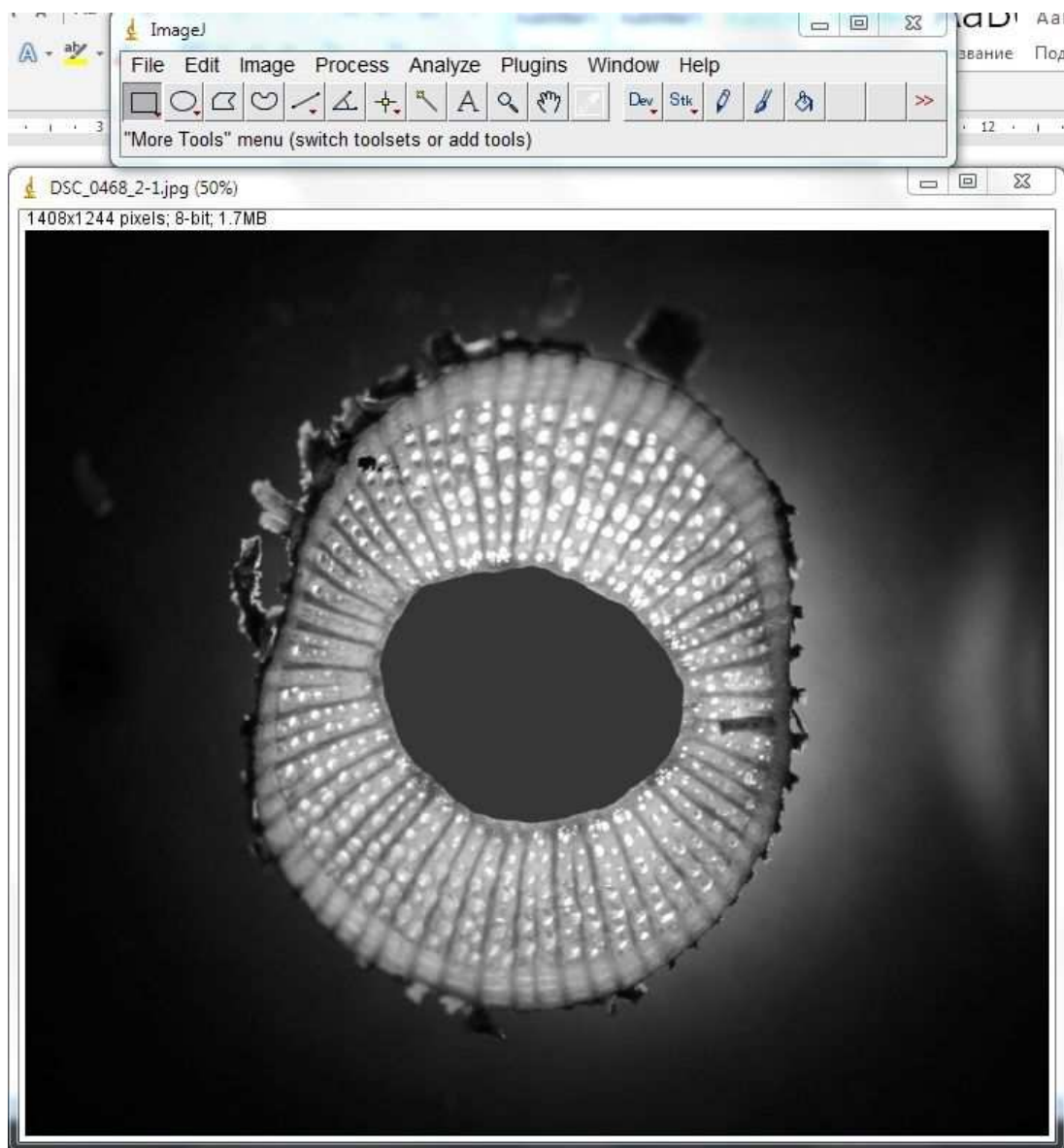


Рис. 5. Преобразование изображения в черно-белое
с глубиной цвета 8 бит

Image - > Adjust - > Threshold (рис. 6, 7)

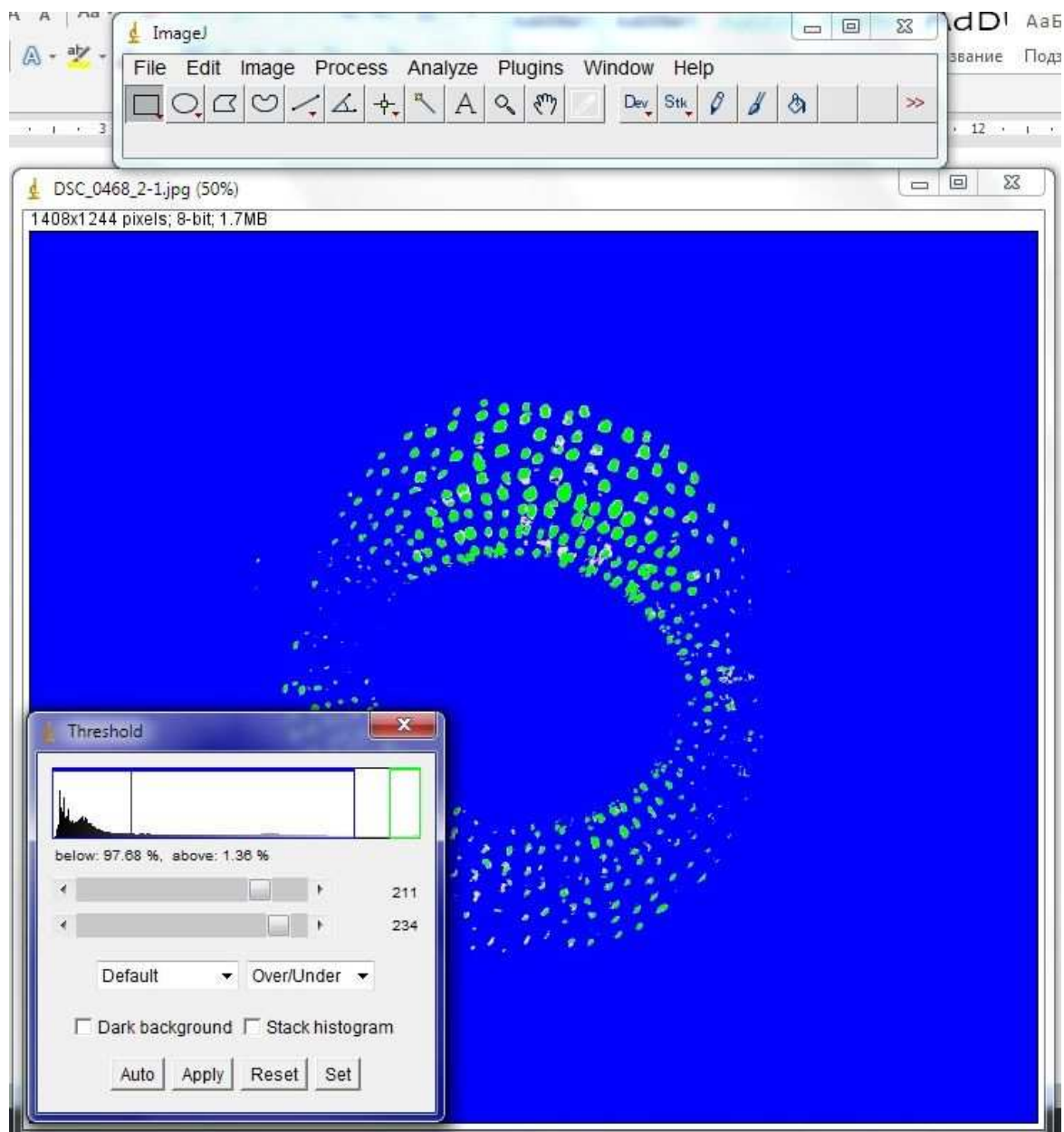


Рис. 6. Выделение диапазона цветов, отвечающих за определение ситовидных трубок

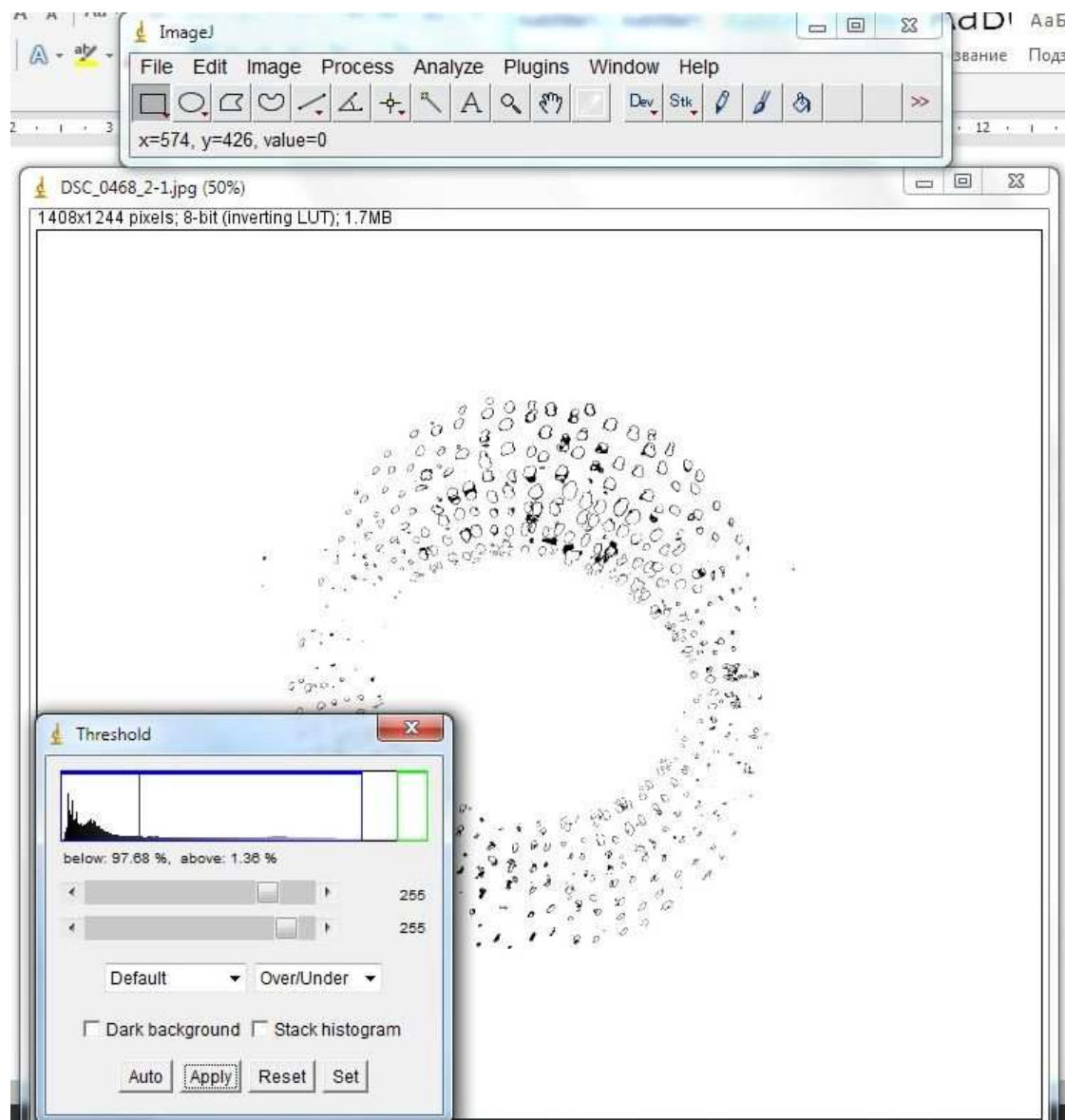


Рис. 7. Контуры выделенных ситовидных трубок
для дальнейшего подсчета

Analyze - > AnalyzeParticles (рис. 8)

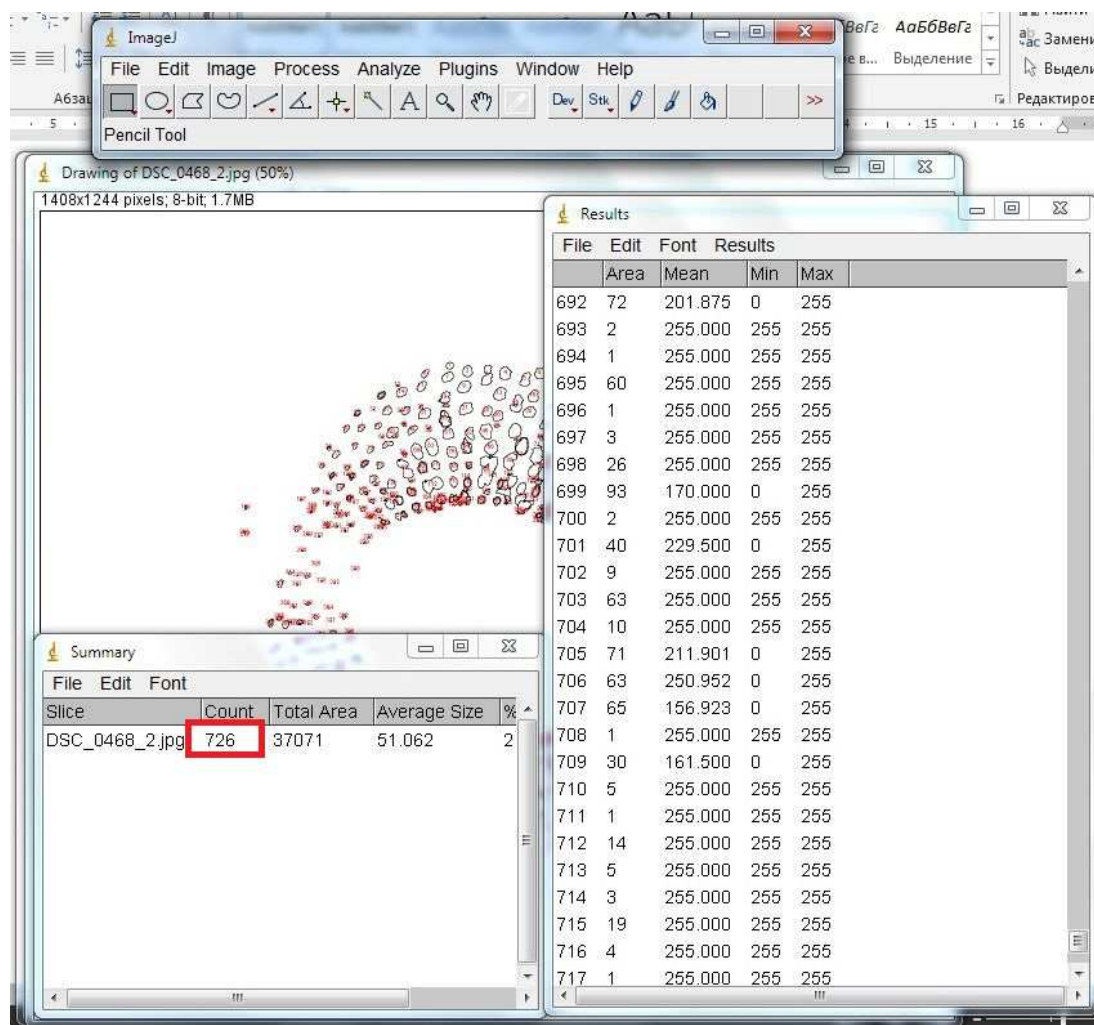


Рис. 8. Окончательный подсчет количества ситовидных трубок

Выводы. Как видно, предлагаемый нами способ определения процентного отношения тканей флоэмы, ксилемы и сердцевины к общему диаметру черенка и подсчет количества ситовидных трубок довольно прост в освоении, намного точнее и на порядок оперативнее ручного подсчета. Единственным слабым местом, которое может сильно повлиять на конечный результат, является качество обрабатываемых фотографий, но здесь, как и везде, все зависит от исследователя.

Еще одним несомненным достоинством является то, что фотографии срезов можно анализировать в любое удобное время, а также есть возможность независимой и непредвзятой их оценки другим исследователем.

Мы ни в коей мере не умаляем достоинств классических гистохимических исследований, но предлагаемый нами способ может в какой-то мере дополнить существующие методики.

Литература

1. Боровиков, Г.А. Анатомия и физиология прививки у виноградной лозы / Г.А. Боровиков. – Харьков: Держсшгоспвидав, 1935. – 80 с.
2. Мишуренко, А.Г. Виноградный питомник. 4-е изд., перераб. и доп. / А.Г. Мишуренко, М.М. Красюк. – М.: ВО "Агропромиздат", 1987. – 272 с.
3. Баранов, П.А. Строение виноградной лозы / П.А. Баранов // Ампелография СССР. – Т. 1. – М.: Гос. тех. и эконом. изд., Пищепромиздат, 1946. – 495 с.
4. Мельник, С.А. Производство виноградного посадочного материала / С.А. Мельник. – Кишинев: Госиздат, 1940. – 140 с.
5. Кондо, И.Н. Покой почек и камбия виноградного растения / И.Н. Кондо // Тр. ВНИИВиВ «Магарах». – Кишинев, 1960. – Т. 15. – С. 57-94.
6. Oprea D. Lucrari practice de viticultura. Bucuresti: Edit. Didacticasipedagogica, 1965. – 325 p.
7. Вакарь, Б.Г. Анатомо-гистохимическое исследование тканей виноградной лозы в связи с зимостойкостью / Б.Г. Вакарь. – Кишинев: Штиинца, 1987. – 170 с.
8. Николенко, В.Г. О подвойных черенках различной толщины / В.Г. Николенко, А.И. Николенко // Виноградарство и виноделие. – 1990. – Вып. 33. – С. 17-20.
9. Негру, П.В. Эколого-физиологические механизмы устойчивости винограда / П.В. Негру, Т.Н. Медведева, В.А. Кожокару, М.В. Михайлов. – Кишинев: Штиница, 1988. – 176 с.
10. Chnar Najmaddin, Comparative study on the anatomy and palynology of the three variety of *Vitisviniferavarity* (family Vitaceae) / Chnar Najmaddin, Khatijah Hussin, Haja Maideen // African Journal of Biotechnology, 2011. – Vol. 10(74), pp. 16866-16874.
11. Навроцкая, А.А. О связи анатомической структуры однолетних побегов винограда с плодоношением // Пути увеличения производства винограда и продуктов переработки: Научн. тр. / Отв.ред. Н.А. Дудник. – Одесса: ОСХИ, 1984. – Вып. 28. – С. 3-10.
12. Ребров, А.Н. Анатомическое строение и накопление пластических веществ в виноградной лозе на песчаных почвах / А.Н. Ребров // Виноделие и виноградарство. – 2013. – №1. – С. 40-42.
13. Brendan Choat, Vascular Function in Grape Berries across Development and Its Relevance to Apparent Hydraulic Isolation / Brendan Choat, Greg A. Gambetta, Kenneth A. Shackel, and Mark A. Matthews // Plant Physiology, 2009 - Vol. 151, pp. 1677-1687
14. Паламарчук, И.А. Учебное пособие по ботанической гистохимии / И.А. Паламарчук, Т.Д. Веселова. – Москва: МГУ, 1965. – 105 с.
15. Рябчун, О.П. О содержании углеводов и лигнина в побегах винограда при расчете на одну клетку / О.П. Рябчун // Физиология растений, 1965. – Т. 12, вып. 3. – С. 479-487.
16. <http://avpsoft.ru>
17. <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>