

УДК 53.086

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

И.П. Гуров, М.А. Вольнский, Е.В. Жукова, Н.Б. Маргарянц

Обсуждаются возможности изучения внутренней микроструктуры тканей растительного происхождения методом оптической когерентной микроскопии с перестраиваемой длиной волны ( $1305 \pm 75$  нм). Приводятся изображения томограмм (В-сканов) и 3D-изображения областей исследования для тканей древовидного алое (*Aloe arborescens*), рипсалидопсиса (*Hatiora gaertneri*), пеларгонии зональной (*Pelargonium zonale*). Анализируются результаты исследования опробковения, деградации поверхностных слоев. Приведены спектры диффузного отражения здоровых, больных и сухих тканей листьев в области 900–1700 нм.

**Ключевые слова:** оптическая когерентная микроскопия, томограмма, 3D-изображение, структура ткани растения.

### Введение

Применение метода оптической когерентной микроскопии для изучения микроструктуры оптически неоднородных и слоистых сред убедительно продемонстрировало диагностические возможности данного неразрушающего метода для контроля материалов и веществ в решении разнообразных фундаментальных и прикладных задач. Возможности применения метода к изучению растительных тканей были проанализированы в работе [1], в которой подробно рассмотрена специфика изучения клеточного строения тканей арабидопсиса и обсуждаются возможности трехмерной визуализации изучаемой области. Авторами было выполнено детальное сопоставление реконструированных изображений с данными, получаемыми при помощи сканирующего электронного микроскопа, отмечены преимущества метода оптической когерентной микроскопии перед традиционными методами исследования растительных тканей. В работах [2, 3] приведены сравнительные результаты исследования тканей листьев традесканции методами оптической когерентной микроскопии и томографии, отмечается несомненное преимущество в изучении глубинных слоев тканей, неразрушающий характер измерений. Особый интерес в изучении тканей вызывают работы, посвященные анализу влияния внешних факторов на развитие клеточных структур и ткани, таких как, например, влияние водоснабжения на протекание физиологических процес-

сов в клетках, на изменение структуры и деформацию слоев. В работах [4, 5] при помощи метода оптической когерентной микроскопии исследованы влияния вирусной инфекции на строение ткани цветка орхидеи, изучена морфология и развитие в клетках хлоропластов листьев табака. Практическая реализация метода позволила авторам [6] создать оптический сканер, работающий на длине волны 830 нм, обеспечивающий ширину сканирования до 40 мм и предназначенный для диагностики поверхности тканей овощных и фруктовых культур. Цель настоящей работы – проанализировать возможности применения оптической когерентной микроскопии с перестраиваемой длиной волны в районе 1300 нм для изучения поверхностных тканевых структур растительного происхождения.

### Экспериментальная установка

Экспериментальные исследования были выполнены с использованием возможностей оптического когерентного микроскопа (ОКМ) EX1301 с перестраиваемой длиной волны, изготовленного фирмой Michelson Diagnostics (Великобритания). В конструкции используется микроинтерферометр малой когерентности. Источником излучения служит лазер HLS-2000-MDL производства фирмы SANTEC (Япония). В процессе измерения томограмм происходит изменение длины волны излучения в пределах  $1305 \pm 75$  нм. Мощность излучения источника составляет 15 мВт. Оптическая схема фокусировки – многоканальная, что обеспечивает на одной длине волны одновременную фокусировку излучения сразу на четыре глубины сканирования в пределах поверхностного слоя объекта. Результаты совместной обработки отраженных сигналов учитываются при регистрации томограмм. Прибор характеризуется разрешением по глубине не хуже 10 мкм и в боковом направлении не хуже 7 мкм, что создает условия для использования его в исследованиях тканей растительного происхождения. Подробно методика измерения томограмм на данном приборе рассмотрена в [7].

Для сравнительного анализа отражающих свойств поверхностей тканей растений были выполнены измерения спектров диффузного отражения. Для измерений в области 900–1700 нм использовался спектрометр NIRQUEST и приставка для измерения спектров диффузного отражения производства фирмы Ocen Optics. В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа (360–2000 нм) мощностью 20 Вт.

### Экспериментальные результаты

Анализ экспериментальных результатов целесообразно начать с демонстрации общих возможностей используемого метода в изучении растительных тканей. На рис. 1 представлены результаты исследования листа алоэ древовидного (*Aloe arborescens*).

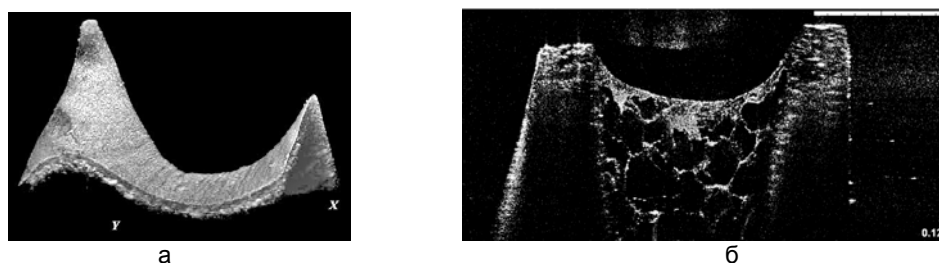


Рис. 1. 3D-изображение и томограмма листа алоэ (*Aloe arborescens*): 3D-изображение в области шипа ( $x=2,47$  мм;  $y=3,0$  мм;  $z=1,69$  мм) (а); томограмма (В-скан) поверхности поперечного среза листа (б).  
Размер В-скана – 3,63 мм×2 мм

На приведенном реконструированном 3D-изображении шипа листа алоэ (рис. 1, а), на поверхности видны темные области, появление которых связано с локальной деформацией поверхностных тканевых слоев, что и повлияло на величину отраженного сигнала при записи томограмм. Это – пример изучения на ОКМ растительного образца со сложной формой. Результат визуализации показывает, что анатомическое поверхностное изучение тканей растений важно для выявления патологических областей на начальной стадии развития. На рис. 1, б, приведена томограмма поперечного среза листа алоэ. На томограмме хорошо видна ткань мезофилла, которая выполняет водоносную и запасную функцию. Ткань состоит из крупных тонкостенных клеток с внутриклеточным гелем. Анализ изображения поперечного сечения листа показал, что общую толщину слоев эпидермиса и хлоренхимы для среза внешней части листа (левая часть изображения на томограмме) можно оценить в 370 мкм, клетки мезофилла занимают пространство для данного сечения около 1580 мкм. Стрелка прогиба поверхности в области геля после разрезания листа составила около 410 мкм, форма поверхности геля определяется эффектом поверхностного натяжения. Размер клеток мезофилла в диаметре составляют более 310 мкм. Глубина проникновения излучения в области хлоренхимы составила около 315 мкм, а в области мезофилла – более 1250 мкм. Методика регистрации томографических изображений позволяет оценивать внутриклеточные размеры отдельных структур тканей, как это видно на примере изучения листа алоэ.

Учитывая, что разрешение прибора не позволяет наблюдать по глубине органические структуры размером менее 10 мкм, были выполнены исследования более крупных структурных видоизменений поверхностных тканей. В качестве образца использовались листья рипсалидопсиса (*Hatiora gaertneri*). Приведено изображение поверхности здоровой ткани растения (рис. 2, а). Излучение, проникая вглубь, позволяет визуализировать структуру тканей в пределах толщины слоя, равного примерно 310 мкм. Сильно отражающий поверхностный слой – это кутикула, содержащая воскообразную пленку. На томограмме не видны границы между слоем кутикулы и эпидермиса, а также границы слоя полисахаридных клеток, находящегося под слоем эпидермиса. Но попиксельный анализ увеличенного изображения позволил оценить общую протяженность этих трех слоев (около 30 мкм).

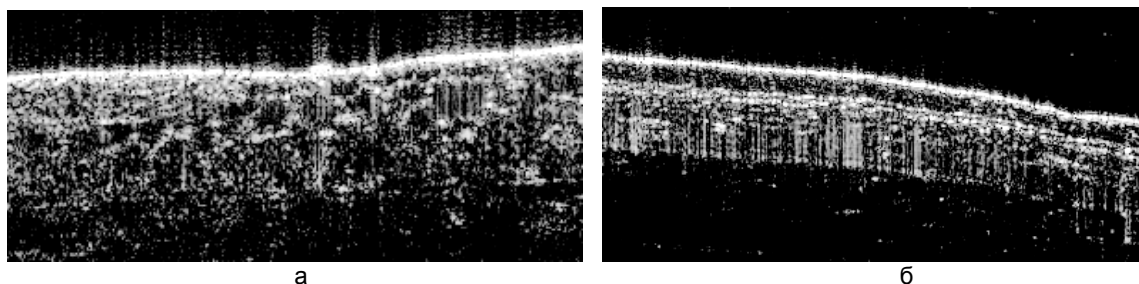


Рис. 2. Томограммы (В-сканы) поверхности листа рипсалидопсиса (*Hatiora gaertneri*): здоровая ткань, размер В-скана –1,28 мм×0,56 мм (а); поверхность с областью опробковения, размер В-скана –1,58 мм×0,73 мм (б)

На томограмме здоровой ткани хорошо видны клетки губчатой паренхимы, диаметр которых составляет более 70 мкм. На рис. 2, б, представлена томограмма поверхности листа в области опробковения, которая образовалась за счет возрастного накопления воскообразного вещества суберина. Толщину этого слоя можно оценить в пределах 65 мкм. В области воскового слоя глубина проникновения излучения составила около 260 мкм, о сильно отражающих свойствах границы воздух/восковой слой свидетельствует появление участка с артефактами, что не наблюдается для естественной границы воздух/кутикула. Это – примеры изучения поверхностного процесса, обусловленного физиологическими явлениями, протекающими в растении.

Метод оптической когерентной томографии может быть использован и для изучения процессов поверхностной деградации тканей растений. Результаты показаны на рис. 3, а–г. Рис. 3, а, б, демонстрируют процессы видоизменения тканей под воздействием бактерий. Ткани рипсалидопсиса могут быть подвержены заражению группой бактерий *Erwinia*, которая приводит к изменению структуры поверхностного слоя. Глубина проникновения излучения в поверхность составила около 280 мкм, в пределах которой четко визуализированы участки, отличающиеся по своей структуре от здоровой ткани. На рис. 3, а, размер образовавшихся пор в диаметре составил около 90–140 мкм, на томограмме (рис. 3, б) наблюдаются поры размером в 350–450 мкм вдоль поверхности листа. Вокруг пор видны сильно рассеивающие участки, появление которых указывает, что это – области с быстропротекающими процессами метаболизма, обусловленного действием бактерий, так как образуются структуры с мелкими органеллами, они и вызывают сильное рассеяние фотонов. Деградация тканей бактериальными колониями сопровождается деформацией поверхности листа, появлением углублений. На рис. 3, в, г, приведен другой пример изменения строения тканей. На поверхности листа рипсалидопсиса произошла локальная деформация поверхности, обусловленная образованием нароста. Природа таких явлений для данных растений может быть вызвана действием вирусов. Из томограммы видно, что ступенька по высоте нароста составляет около 600 мкм, а протяженность нароста более 3200 мкм. Произошло видоизменение структуры в тонких поверхностных слоях (кутикула/эпидермис). В центре нароста наблюдается уплотнение поверхностных слоев, суммарная толщина которых уже составляет около 70 мкм, это связано с необратимыми изменениями в тканях эпидермы. На рис. 3, г, показано реконструированное 3D-изображение нароста. Центральная часть нароста на изображении, имеющая более темный цвет, свидетельствует об отличии в отражающих свойствах на данном участке поверхности, это результат локального уплотнения и более длительного процесса видоизменения тканей. Представленные примеры наглядно демонстрируют возможности изучения поверхностных процессов, происходящих в тканях кутикулы и эпидермиса, в частности, воздействия бактерий, вирусов, развития онкологических процессов, внешних механических поверхностных повреждений.

На рис. 4, а, б, показана томограмма листа пеларгонии зональной (*Pelargonium zonale*) и реконструированное трехмерное изображение участка стебля листа. Толщину слоя кутикулы можно оценить менее 10 мкм, общую толщину слоев верхнего эпидермиса и полисахаридной паренхимы – около 85 мкм для данного образца, а размеры клеток губчатой паренхимы – менее 10 мкм. На трехмерном изображении образца видны как проводящие слои внутренних тканей стебля, так и поверхностные железистые волоски (трихомы),

на конце которых находятся головки-емкости с эфирным маслом. Этот пример демонстрирует возможности применения метода для изучения морфологического строения отдельных участков тканей.

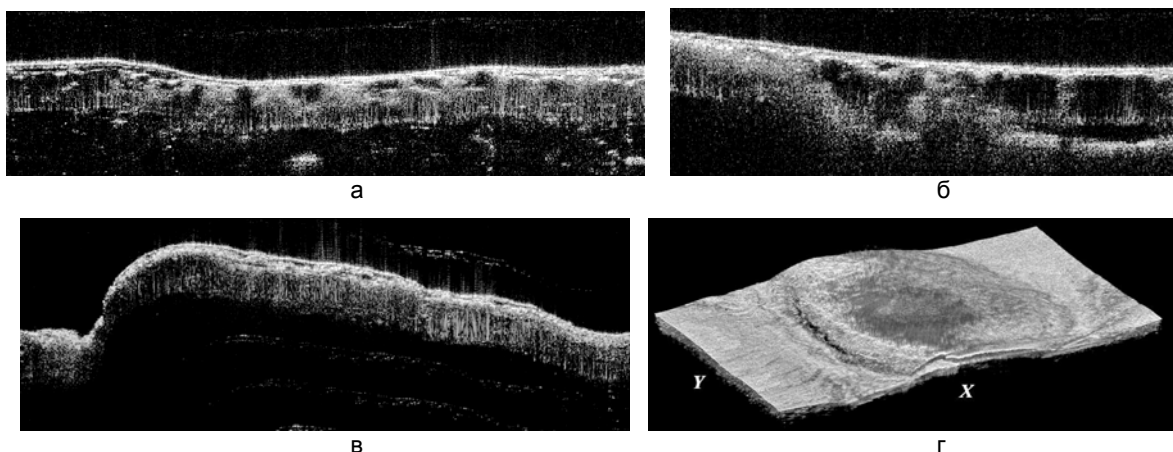


Рис. 3. Поверхность листа рипсалидопсиса (*Hattoria gaertneri*): в области разрушения ткани группой бактерий *Erwinia*, размеры В-сканов – 3,58 мм×0,92 мм (а); 2,64 мм×0,85 мм (б); в области нароста, размер В-скана – 3,73 мм×1,29 мм (в); 3D-изображение нароста на поверхности листа ( $x=5,0$  мм;  $y=3,0$  мм;  $z=1,69$  мм) (г)

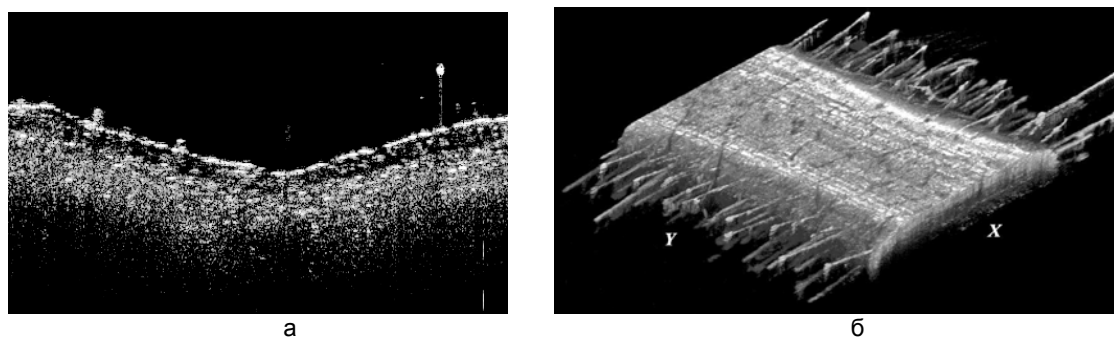


Рис. 4. Томограмма (В-скан) поверхности листа пеларгонии (*Pelargonium zonale*) и 3D-изображение участка стебля листа: поверхность листа в области верхней эпидермы, размер В-скана – 3,73 мм×1,29 мм (а); стебель листа ( $x=5,0$  мм;  $y=3,0$  мм;  $z=0,86$  мм) (б)

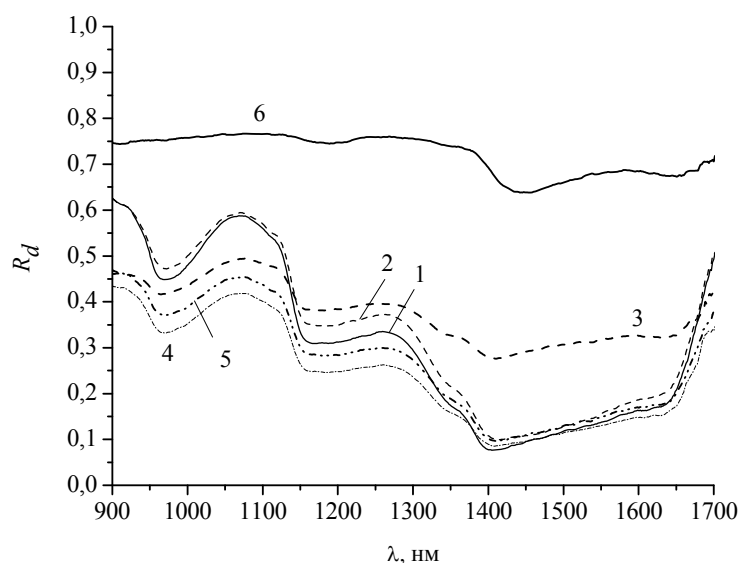


Рис. 5. Спектры диффузного отражения, измеренные от поверхности листьев рипсалидопсиса (*Hattoria gaertneri*): 1 – здоровый лист; 2 – увядший (бледно желтый); 3 – сухой участок на краю листа; 4 – область нароста на поверхности; 5 – участок опробковения; 6 – высохший полностью лист

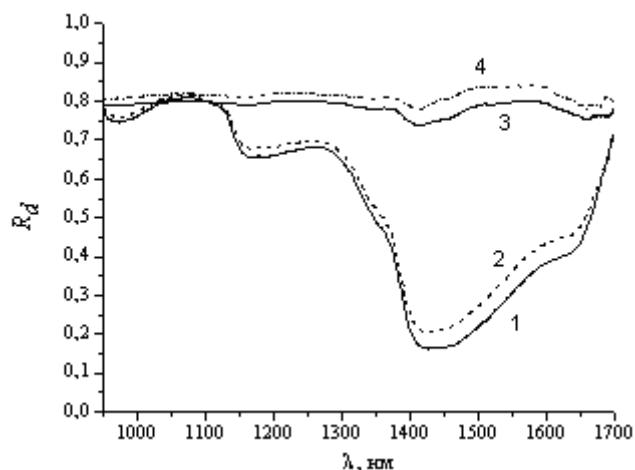


Рис. 6. Спектры диффузного отражения, измеренные от поверхности здорового листа пеларгонии (*Pelargonium zonale*): 1 – верхняя поверхность; 2 – нижняя поверхность; 3 – сухой участок листа со стороны внешней поверхности; 4 – сухой участок со стороны нижней поверхности листа

На рис. 5, 6 приведены спектры диффузного отражения, измеренные для разных растительных тканей. Объектами служили листья ропсидопсиса (*Hatiora gaertneri*) и пеларгонии зональной (*Pelargonium zonale*). Измерения были выполнены на поверхности здоровой ткани, а также на участках локальной дегенерации биотканей, вызванных, в том числе, и процессами высыхания. На рисунках видно, что на спектральный ход изменения коэффициентов диффузного отражения  $R_d$  влияют полосы поглощения воды, особенно в области длины волны  $\lambda = 1400$  нм.

Образование локальных областей высыхания меняет естественную структуру листа. Процессы высыхания листьев связаны с уменьшением содержания влаги в поверхности, сморщиванием поверхностных тканей, видоизменением рельефа листьев, что сопровождается ростом коэффициента отражения и уменьшением интенсивности полос поглощения. Это хорошо видно на примере опыта с листом пеларгонии.

Приведенные спектры полезны для понимания возможностей применения метода оптической когерентной томографии в изучении поверхностных тканевых структур. Видно, что область 1230–1380 нм, которая охватывает диапазон изменения длин волн источника оптического когерентного микроскопа, обеспечивает необходимую чувствительность для диагностики структуры тканей и может быть использована для дальнейших исследований, но с большей разрешающей способностью.

### Заключение

Представленные в работе результаты изучения микроструктуры растительных тканей методом оптической когерентной микроскопии показали, что в области длины волны 1300 нм можно успешно выполнять экспериментальные исследования по изучению поверхностных структур биоматериалов. Несмотря на расположение по обеим сторонам диапазона 1230–1380 нм интенсивных полос поглощения воды, регистрируемые томограммы содержат информацию о микроструктуре тканей и отдельных слоев.

В соответствии с результатами исследования разных образцов тканей следует отметить, что метод оптической когерентной микроскопии может быть использован для сканирования поверхности биотканей в данном спектральном диапазоне с целью последующей трехмерной визуализации отдельных участков. При соответствующей организации эксперимента метод может быть рекомендован для наблюдения в режиме *in vivo* за зарождением новых листьев, формированием зародышей, контролем пространственной направленности отдельных участков поверхности тканей, для проведения вспомогательных исследований при выполнении таксонометрических исследований и классификации растительных объектов.

Метод изучения поверхностных структур тканей растений может быть использован для диагностики состояния слоистых структур, для анализа влияния внешних факторов на развитие, дегенерацию сред на клеточном и тканевом уровне, как это было показано на примерах изучения влияния бактерий, процессов старения и локального перерождения клеточных структур. Это представляет важное направление в экспериментальной практике, так как толщина поверхностных слоев тканей и их клеточное строение свидетельствуют о возрастных свойствах растения, а также о характере адаптации тканей к среде обитания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

### Литература

1. Hettinger J.W., Mattozzi M., Myer W.R., Williams M.E., Reeves A., Parsons R.L., Haskell R.C., Petersen D.C., Wang R., Medford J.I. Optical Coherence Microscopy. A technology for rapid, *in vivo*, non-destructive visualization of plants and plant cells // *Plant Physiology*. – 2000. – V. 123. – P. 3–15.
2. Сапожникова В.В., Каменский В.А., Куранов Р.В. Визуализация растительных тканей методом оптической томографии // *Физиология растений*. – 2003. – Т. 50. – № 2. – С. 316–320.
3. Кутис И.С., Сапожникова В.В., Куранов Р.В., Каменский В.А. Исследование методами оптической когерентной микроскопии и оптической когерентной томографии формо-функционального состояния тканей высших растений // *Физиология растений*. – 2005. – Т. 52. – № 4. – С. 635–640.
4. Chow T.H., Tan K.M., Ng B.K., Razul S.G., Tay C.M. Diagnosis of virus infection in orchid plants with highresolution optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. – 2009. – V. 14. – № 1. – P. 014006–1–014006–6.
5. Voccaro A.C., De Paere R., Dubois A., Voccaro M. Full field optical coherence tomography (OCT) and early alterations in chloroplast morphology // *Proc. of SPIE*. – 2007. – V. 6755. – 67550E1–67550E5.
6. Shiina T., Kishiwaki D., Ito M., Honda T., Okamura Y. OCT system for plant measurement // *Proc. of SPIE*. – 2005. – V. 5948. – 59482D1–59482D9.
7. Гуров И.П., Жукова Е.В., Маргарянц Н.Б. Исследование внутренней микроструктуры материалов методом оптической когерентной микроскопии с перестраиваемой длиной волны // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. – 2012. – № 3 (79). – С. 40–44.

**Гуров Игорь Петрович**

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой, gurov@mail.ifmo.ru

**Волынский Максим Александрович**

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат технических наук, научный сотрудник, maxim.volynsky@gmail.com

**Жукова Екатерина Владимировна**

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат технических наук, доцент, zhukova-ifmo@mail.ru

**Маргарянц Никита Борисович**

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, ст. преподаватель, fosp@grv.ifmo.ru