

УДК 58.08+581.8

ОСОБЕННОСТИ МАЦЕРАЦИИ КОРЫ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

И.И. Власова, А.В. Копанина, А.И. Тальских, Е.О. Вацерионова
Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН,
ул. Науки 1Б, г. Южно-Сахалинск, 693022,
e-mail: iivlasova@gmail.com, anna_kopanina@mail.ru,
anastasiya_talsk@mail.ru, katya.vatserionova.85@mail.ru

В статье описаны сложности, возникающие при подготовке к мацерации коры древесных растений, и способы их преодоления путем модификации методических приемов и подходов. При мацерации коры древесных растений, а именно выделении слагающих ее элементов для дальнейшего анализа, возникают определенные трудности.

Флоэма является нестабильной и менее одревесневшей тканью, чем ксилема, которая остается сравнительно неизменной в своем строении в течение онтогенеза. Этот факт требует индивидуального подхода не только к разным видам растений, но и к каждому конкретному случаю. Мы используем выделение необходимых участков и типов тканей на каждом этапе мацерации. Сначала вырезаем необходимые фрагменты для анализа во время подготовки к мацерации. Для этого по возможности отделяем перидерму и древесину и мацерируем только ту часть, которая необходима для микроскопического анализа внутренней структуры коры.

Исследование проводящей флоэмы необходимо для выявления особенностей проводящих живых элементов, а непроводящей флоэмы для изучения склерифицированных элементов и элементов кортекса – паренхимы, первичных механических элементов и др. Подготовленные образцы заливаем мацерирующей жидкостью, плотно закрываем притертой крышечкой и помещаем в термостат с температурой 50 °С. Затем подбираем время экспозиции для определенного вида, места сбора и фрагмента ткани, чтобы элементы не разрушались и хорошо отделялись друг от друга. Время экспозиции в термостате может быть различным: от нескольких часов до нескольких суток. Затем мацерированный материал хорошо промываем дистиллированной водой до удаления запаха уксусной кислоты. Разбиваем получившуюся массу при мацерировании на магнитной мешалке, разливаем ее по коническим пробиркам, уравниваем на весах и ставим их в центрифугу, где центрифугуем для разделения твердой, мягкой и жидкой фракций. На завершающем этапе отбираем пипеткой необходимый слой и готовим временные препараты для анализа.

Ключевые слова: мацерация, микроскопический анализ, внутренняя структура коры.

Образец цитирования: Власова И.И., Копанина А.В., Тальских А.И., Вацерионова Е.О. Особенности мацерации коры древесных растений // Региональные проблемы. 2022. Т. 25, № 1. С. 31–43. DOI: 10.31433/2618-9593-2022-25-1-31-43.

Введение

Современные достижения в технологии и методологии ботанических исследований предоставляют больше возможностей в изучении внутренней структуры растения. Этой теме посвящено множество журналов (IAWA Bulliten, IAWA Jurnal) и статей [24, 28, 35]. Разработка новых типов микроскопов – конфокальных, электронных, сканирующих – требует и новых способов пробоподготовки. Эта тема освещается в журналах, выпускаемых Американским, Европейским и Королевским научными сообществами микроскопии (Microscopy and Microanalysis, Imaging & Microscopy, Journal of Microscopy), а также в от-

дельных публикациях. Безусловно, преимущество на стороне электронной и сканирующей микроскопии, но световая микроскопия по-прежнему востребована [22, 23, 27, 29, 31, 33, 36 и др.].

Представления о строении, росте и развитии клеток и тканей растений позволяют понять функциональную значимость тех или иных структур и отдельных элементов растительного организма. Изменение количественных параметров во внутренней структуре растений, произрастающих в стрессовых условиях, является их адаптивной реакцией на воздействие факторов окружающей среды [7–9 и др.]. Важнейшее направление исследований нашей лаборатории – изучение влияния

неблагоприятных экологических факторов, обусловленных активным магматическим и грязевым вулканизмом, условиями морских побережий, высотой над уровнем моря, на внутреннюю структуру коры древесных растений [3, 20, 34].

Кора древесных растений – сложный и многофункциональный комплекс тканей. Снаружи однолетний стебель покрыт фотосинтезирующей эпидермой, которая сменяется вторичной покровной тканью – перидермой, в свою очередь состоящей из феллемы (пробки), феллогена (пробкового камбия) и феллодермы (паренхимы). Повторные перидермы чаще образуются в более глубоких слоях коры, отсекая вышележащие ткани, формируя у некоторых видов ритидом (корку) – комплекс мертвых тканей, включающих не только саму перидерму, но и ткани, расположенные выше заложения повторных перидерм. Следом за эпидермой или первой перидермой располагается колленхима или гиподерма (у голосеменных), паренхима первичной коры, первичные механические элементы и проводящая ткань – флоэма, затем камбий, который снаружки откладывает флоэму, вовнутрь – ксилему (древесину). Флоэма и ксилема (первичная и вторичная) – проводящие ткани, осуществляющие соответственно нисходящий и восходящий ток веществ в стебле. Вторичная флоэма делится на проводящую и непроводящую. Проведение веществ осуществляется по проводящей флоэме, которая функционирует у большинства видов 1 год. Непроводящая флоэма не осуществляет проведение веществ, но в ее состав входят живые паренхимные клетки: аксиальная и горизонтальная паренхима. Эта наиболее общая топография тканей не отражает гетерогенность каждой из тканей и особенности их строения у разных видов [9, 21].

Для изучения клеточного и тканевого уровня применяются различные типы микроскопии (сканирующая, электронная, конфокальная, лазерная, рентгеновская и др.), наиболее широко и давно используемая – световая микроскопия. Для подготовки материала к исследованиям методами микроскопии разработано большое количество методик резки, окраски, контрастирования и др. В ходе исследований появляется множество модификаций и отступлений в методических подходах. Например, для уточнения строения проводящих элементов проводится мацерация растительного материала, которая применяется преимущественно для анализа строения клеточных оболочек, и, в подавляющем большинстве случаев, для древеси-

ны и склеренхимы коры. В ботанической микро-технике существует немалое количество методов и методических подходов по отношению к мацерации [10, 11, 16, 19, 25, 26, 32, 33]. Поскольку кора древесных растений – это комплекс тканей, которые состоят из клеток, отличающихся функциональной активностью, толщиной клеточных стенок, плотностью сложения их в самой ткани и др., это требует наблюдения за процессом мацерации и анализа всех элементов коры. Мы остановились на методике, которая отвечает нашим требованиям и является наименее трудоемкой [30]. С одной стороны, она позволяет экономить время, с другой – выделять и тонкостенные (ситовидные трубки, клетки-спутницы, паренхимные клетки), и толстостенные элементы (волокна, склереиды, феллему), для которых необходимо применять разные методики с кипячением и (или) применением агрессивных химических веществ (едкой щелочи, концентрированных кислот), используемые в перечисленных выше методиках. Кроме того, ледяная уксусная кислота и перекись водорода являются для нас наиболее доступными реактивами.

Исследования нашей лаборатории основываются на изучении внутренней структуры стеблей древесных растений. Весь процесс изучения внутренней структуры коры методом световой микроскопии занимает значительное количество времени и является довольно трудоемким. Он состоит из нескольких этапов: отбор и фиксация образцов в поле; хранение фиксированных образцов как в условиях поля, так и в лаборатории; подготовка лабораторной посуды; приготовление реактивов и красителей; подготовка образцов для резки с помощью микротомы или для мацерации; окрашивание, микрохимические реакции для качественного определения веществ и их групп; выполнение и заключение микросрезов в монтирующую среду, исследование срезов под микроскопом, их статистическая обработка и интерпретация результатов. В нашей лаборатории разработаны специфические модификации методических подходов на всех этапах – от сбора образцов в поле (рис. 1) до интерпретации результатов [4–6, 37, 38].

Особые трудности возникают при мацерации коры и слагающих ее тканей, в особенности флоэмы, поскольку она является менее одревесневшей и стабильной тканью, чем ксилема, которая остается сравнительно неизменной в своем строении в течение онтогенеза. Это требует особого подхода не только к разным видам растений, но и к каждому частному случаю. Чаще всего



Рис. 1. Сбор материала.
Полуостров Камчатка. Гидротермальные
источники «Дачные (влк. Менделеев)»

Fig. 1. Collection of material.
Kamchatka Peninsula. Hydrothermal vents
Dachnye (Volcano Mutnovsky)

это касается варьирования времени экспозиции, центрифугирования и разбивания на магнитной мешалке; возможно применять вариации с изменением температуры в термостате, концентрации раствора, чтобы достичь хорошего отделения требуемых для анализа элементов. В свою очередь индивидуального подхода в подготовке мацерируемого материала требуют стебли разного возраста, поэтому в ходе подготовки мы модифицируем методические алгоритмы, отмечаем их в рабочем дневнике и добавляем в методику: изменения времени экспозиции определённого вида, места сбора, возраста стебля, степени очистки и подготовки материала к мацерации. В наших исследованиях мы используем методику, разработанную Ge Wang с соавторами (2011) и применяющуюся для анализа древесных волокон кенафа, трахеид китайской ели и склерейд бамбука. В указанной работе описаны состав раствора для мацерации, его концентрация и экспозиция в термостате. Мы адаптировали эту методику для коры древесных растений и достаточно подробно описываем, как избежать тех или иных трудностей на стадии пробоподготовки и после выемки из термостата до формирования временных препаратов.

Целью данной работы является изучение способов пробоподготовки к мацерации коры древесных растений и приемов подготовки мацерированного материала для микроскопии. Для этого мы используем разделение тканей коры в многолетних стеблях до мацерации, а также разделение мацерированного материала при помощи центрифугирования и разбивания на магнитной мешалке.

Материалы и методы

При отборе образцов древесных растений для структурного анализа мы используем принятые в геоботанических исследованиях методические подходы [1, 14, 17]. В зависимости от типа и характера растительности выбираем размер пробной площади. Кроме этого, закладываем трансекты по градиенту высоты над уровнем моря или воздействия источника природного стресса в каждом местообитании. Внутри каждой пробной площади мы закладываем 3 площадки для отбора образцов древесных растений. Важно правильно выбрать оптимальные для исследования внутренней структуры стебли. Мы используем классификации по Серебрякову И.Г. (1949) и Мазуренко М.Т, Хохрякову А.П. (1977) для выбора и определения типов побегов. Мы отбираем для структурного анализа удлиненные побеги ветвления. Деревья выбираем с кроной, которая формируется на одинаковом уровне (в диапазоне около 1/3, 1/2 или 2/3) по высоте ствола. Для оценки возраст-зависимых признаков и состояний растений необходимо собрать образцы максимально полно, то есть выбрать такой возрастной шаг отбора, при котором структурные признаки коры и древесины будут изменяться последовательно от последнего годичного побега до основания ствола или стволлика. Обязательно следует обращать внимание на заглупление – геофитизацию стволликов и стволов в субстрат. По нашим наблюдениям, это очень распространенное явление у древесных растений в условиях вулканических ландшафтов [3, 15]. Мелкие кустарнички иногда фиксируются целой куртиной или ее фрагментом. В лаборатории для учета большого количества накопившегося материала мы вносим информацию об образцах в базу, в ней указывается вид, дата отбора, географические координаты, географическое название места сбора, характеристика объекта и краткие особенности фитоценоза, коллекторов, жизненная форма, количество листов гербария, кернов, «скруток» (фрагменты стеблей возраста определенного диапазона или особь целиком, упакованные в этикетку), фрагментов стеблей и стволов для коллекции и место хранения (маркировка контейнера), в котором находятся объекты для изучения.

Контейнеры хранятся в металлических шкафах (рис. 2). При необходимости исследования того или иного вида древесного растения контейнер с ним вынимаем из шкафа, вскрываем при соблюдении техники безопасности (халат, респиратор, перчатки, очки). При помощи пинцета во включенном вытяжном шкафу «скрутки» с об-

до 10–24 часов (рис. 5). Определение возраста ствольной части выполняем либо на керне (цилиндрические кусочки древесины, полученные с помощью возрастного бура), взятом при помощи возрастного бура (бурава) Naglof (инструмент, который позволяет извлекать керн (образец) из ствола дерева с целью исследования возраста, динами-

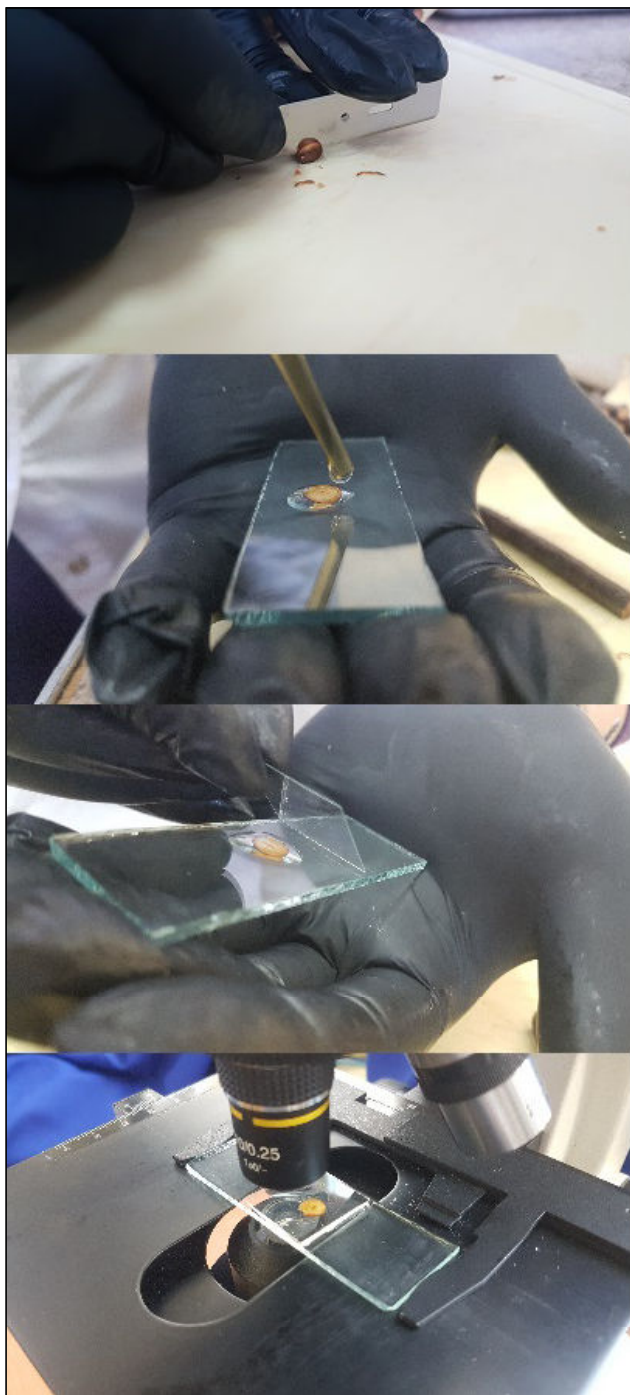


Рис. 4. Определение возраста образцов перед мацерацией

Fig. 4. Determining the samples age before maceration

ки роста и состояния), либо непосредственно на спиле перед фиксацией; информацию о возрасте вносим в этикетку, в которую упаковываем фрагмент ствола.

Для мацерации можно применять и свежий материал, взятый в природе. При этом время от сбора образца до его подготовки к мацерации не должно превышать суток при хранении в холодильнике. При мацерации ствольной части коры выбираем необходимый участок: отсекаем древесину и ближайший к камбию участок с проводящей флоэмой, который будет использоваться для мацерации (рис 7А), а в оставшемся фрагменте с непроводящей флоэмой отсекаем периферическую часть коры с перидермой или коркой и старовозрастной непроводящей флоэмой. Таким образом, для мацерации остаются фрагмент с проводящей флоэмой и камбием и фрагмент со слоем непроводящей флоэмы, который был расположен ближе к проводящей флоэме (в этой части обнаруживаются еще не смятые ситовидные трубки), мацерируем их в разных бюксах (рис. 5). При

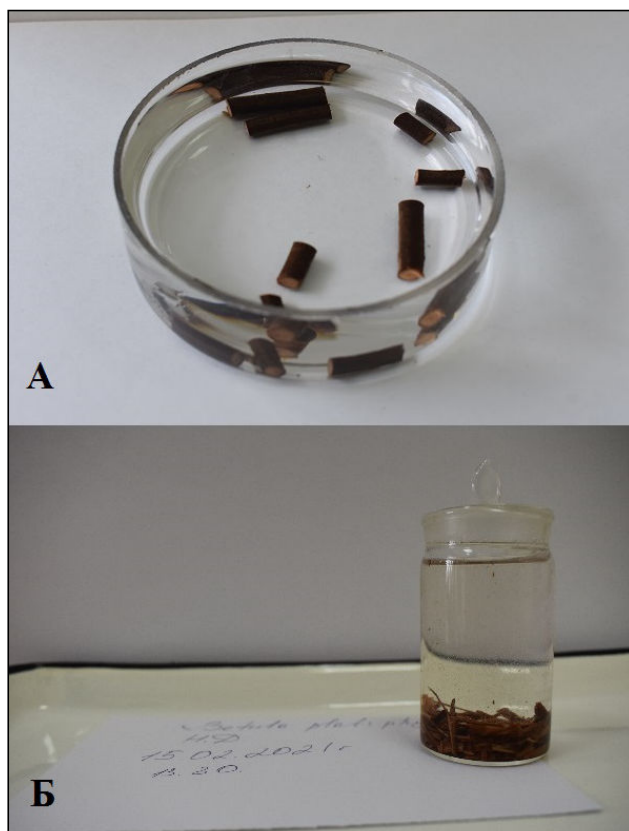


Рис. 5. А – вымачивание образцов определённого возраста; Б – вымачивание отсечённых фрагментов стебля

Fig. 5. А – Soaking of samples of a certain age; Б – Soaking of cut-off fragments of stem

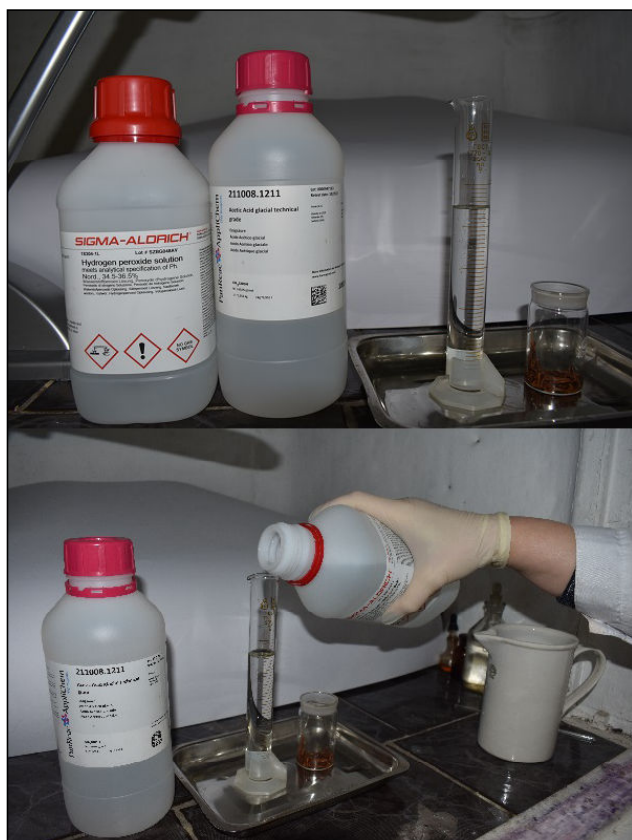


Рис. 6. Приготовление мацерирующей смеси

Fig. 6. Preparation of the macerating composition

необходимости отдельно мацерируем и другие вышележащие участки коры. Если необходимо мацерировать однолетний стебель или стебель небольшого диаметра (менее 5 мм), отсекаем фрагменты стебля вместе с древесиной и перидермой.

Небольшие фрагменты коры размером 1,0–2,0 мм × 1,0–3,0 см помещаем в бюксы емкостью 30 мл и заливаем раствором для мацерации, приготовленным непосредственно перед использованием (рис 6, 7Б). Состав мацерирующей жидкости: 4 части дистиллированной воды: 5 частей концентрированной (ледяной) уксусной кислоты: 1 часть перекиси водорода ($4\text{H}_2\text{O} : 5\text{CH}_3\text{COOH} : 1 \text{ 34–36,5\% } \text{H}_2\text{O}_2$). Плотнo закрываем притёртой крышкой бюксы с образцами в растворе для мацерации и помещаем в термостат с температурой 50 °C [30] (рис. 8). Время экспозиции в термостате может быть различным: от нескольких часов до нескольких суток. Например, для ствoловой части *Betula ermanii* Cham. время экспозиции в термостате в мацерирующей жидкости составляет 2–3 суток, это время увеличивается при мацерации ствoловой части образцов с большим объе-

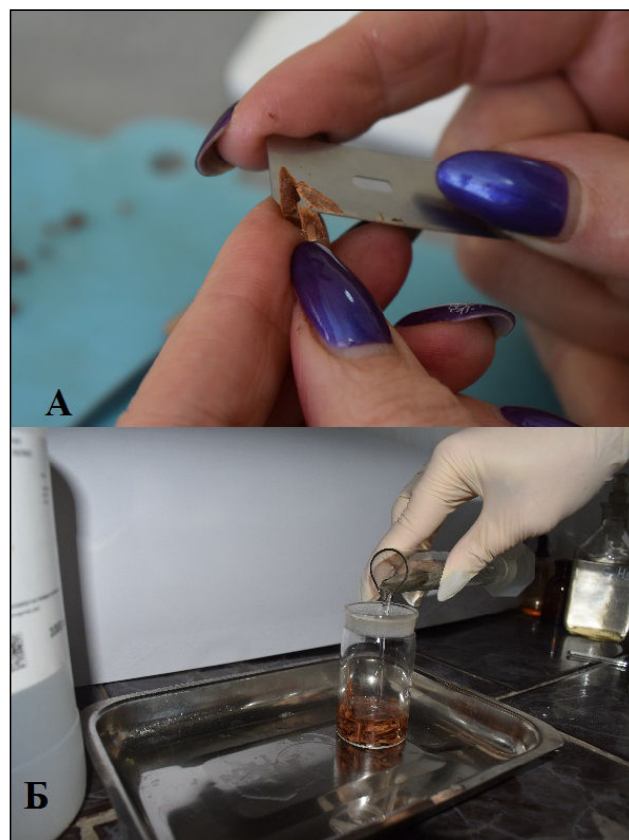


Рис. 7. А – отсекание фрагмента, необходимого для мацерации; Б – помещение образцов в мацерирующую смесь

Fig. 7. А – Cutting off the fragment required for maceration; Б – Placement of samples in the macerating composition

мом лигнифицированных и склерифицированных элементов. Увеличение мощности последних наблюдается нами в коре растений, произрастающих в экстремальных условиях [3, 14, 37]. Для однолетних стеблей этого вида, взятых в нормальных условиях, время экспозиции составляет 1–2 суток, а произрастающих в условиях агрессивных сред – до 2,5 суток, например, с fumarольных и сольфатарных вулканических полей. Для однолетних стеблей *Betula platyphylla* Sukaczew время экспозиции составляет 12–24 часа, в зависимости от условий местообитания и времени сбора, а также части стебля (ближе к апикальной части или к основанию годового прироста). Для сокращения времени экспозиции материала многолетних стеблей после его проводки водой отделяем по возможности перидерму и древесину и мацерируем только ту часть, которая необходима для микроскопического анализа внутренней структуры коры: проводящая флоэма для выявления



Рис. 8. Мацерация в термостате

Fig. 8. Maceration in the thermostat

особенностей проводящих живых элементов, непроводящая флоэма для исследования склерифицированных элементов, элементы кортекса – для изучения паренхимы, первичных механических элементов и др. При исследовании толстостенных элементов не всегда удаётся полностью очистить материал от неиспользуемых для анализа тонкостенных элементов при подготовке материала к мацерации, удаляем их после экспозиции в мацерирующем растворе. Остатки древесины, перидермы, склеренхимы распадаются значительно позднее живых элементов коры. Пользуясь этим, мы убираем паренхимные клетки и облитерированные ситовидные трубки и мацерируем далее склеренхиму, волокна или феллему в зависимости от того, из какой части коры требуются толстостенные элементы для анализа.

После помещения в бюксы мацерируемый материал периодически проверяем на готовность. Последнее определяется обесцвечиванием (белые или бледно-жёлтые) фрагментов растения, поме-

щенного в мацерирующий раствор и появлением небольшого количества взвеси над твёрдым осадком. Материал готов, если он легко раздавливается препаровальной иглой на предметном стекле и под покровным стеклом в капле воды определяются отдельные элементы ткани. После извлечения мацерированного материала из термостата хорошо промываем его дистиллированной водой до удаления запаха уксусной кислоты. Чтобы не потерять отдельные элементы коры при сливе, верхнюю прозрачную фракцию каждый раз отстаиваем до образования осадка и только после этого сливаем (рис. 9). Отбор желательно производить пипеткой. Для лучшего распределения на отдельные элементы мацерированный материал, предварительно помещенный в бюксы в небольшом количестве дистиллированной воды (10–20 мл), разбиваем в стеклянной бюксе на обычной магнитной мешалке (Эксперт-Эконикс, Ритм-1, УММ с кондуктометром Эксперт-002 (Эконикс) или Intillab TM Magnetic Stirrer) со специальным магнитным якорем. Процесс разбивания занимает 5–20 мин до получения мутной взвеси (рис. 10). Зачастую из-за разного времени распада твёрдых и мягких элементов необходима их сепарация. В случае наличия большого количества нераспавшихся склеренхимных элементов, остатков неудалённой древесины и феллемы при подготовке материала к мацерации в виде твёрдого осадка мацерированный материал выливаем в чашку Петри и нераспавшиеся твёрдые фрагменты тканей удаляем пинцетом под лупой (рис. 11). В нашей лаборатории мы используем для этого стационарную лупу с подсветкой (Лупа-лампа с подсветкой Kgomatech бестенева 2/20x, 85 мм, с прищепкой). Готовую взвесь с паренхимными клетками и ситовидными элементами переливаем в конусные пробирки и центрифугируем 2–5 минут при 1,0–1,5 тыс. оборотов в минуту на центрифуге Liston С 2203



Рис. 9. Промывание материала от мацерирующей смеси

Fig. 9. Washing the material from the macerating composition

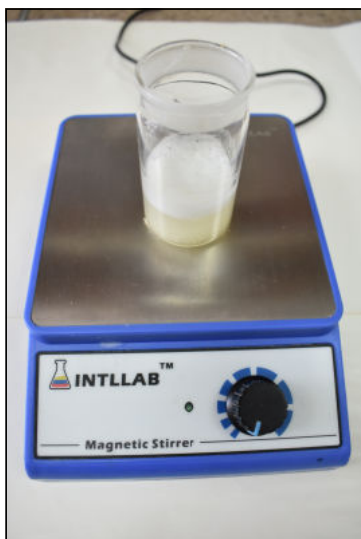


Рис. 10. Разбивание материала на магнитной мешалке

Fig. 10. Breaking up the material on a magnetic stirrer

(рис. 12). Затем со дна пипеткой собираем осадок и переносим на предметное стекло. Готовим временный препарат с дистиллированной водой или с добавлением глицерина для уменьшения скорости испарения пленки воды под покровным стеклом. Пробирки с материалом закрываем пробкой и хра-



Рис. 11. Удаление твёрдых участков коры в мацерированном материале

Fig. 11. Removal of hard fragments of bark from the macerated material

ним в холодильнике. При необходимости контрастирования (рис. 13) под покровное стекло капаем немного сафранина для окрашивания лигнифицированных элементов или нильского синего для окрашивания ситовидных полей и ситечек. После готовности анализируем и фотографируем препарат под микроскопом AxioScop A1 (Zeiss) при помощи программного обеспечения ZEN 2 (рис. 14). Возможно приготовить постоянные препараты из мацерированного материала стандартным спосо-

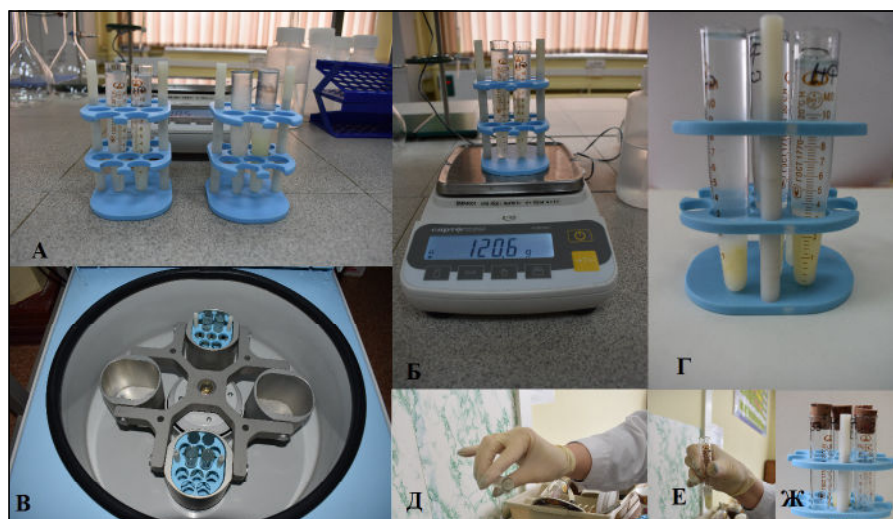


Рис. 12. А – центрифужные пробирки со взвесью мацерированного материала; Б – взвешивание пробирок для уравновешивания в центрифуге; В – центрифугирование; Г – прозрачная верхняя фракция и осадок со взвесью и твёрдыми частицами; Д, Е – слив верхней прозрачной фракции; Ж – готовый материал для анализа

Fig. 12. А – centrifuge tubes with a suspension of macerated material; Б – test tubes weighing for balancing in a centrifuge; В – centrifugation; Г – transparent upper fraction and sediment with suspension and solid particles; Д, Е – draining the upper transparent fraction; Ж – ready material for analysis

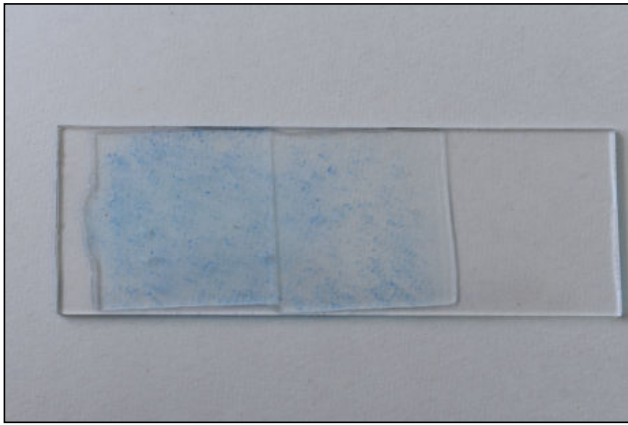


Рис. 13. Готовый для анализа контрастированный препарат с мацерированным материалом

Fig. 13. Contrast preparation of macerated material ready for analysis

бом, применяемым в нашей лаборатории, – это регрессивный метод окраски сафранином и нильским синим с вымыванием красителей при помо-

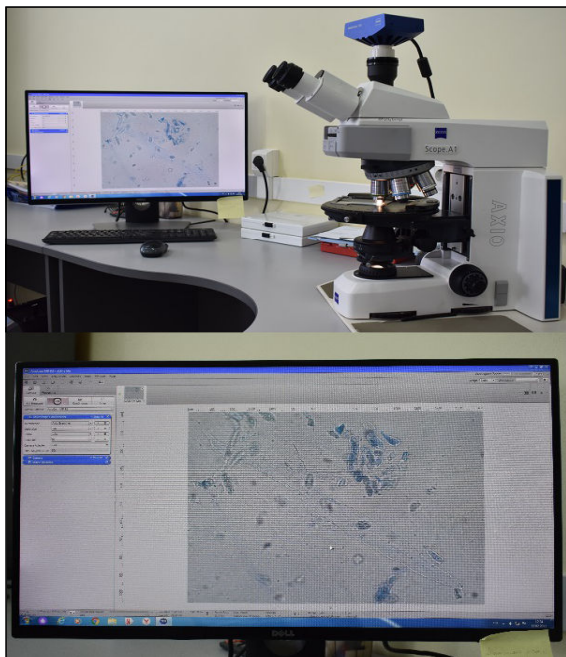


Рис. 14. Анализ мацерированного материала под микроскопом (на мониторе компьютера членик ситовидной трубки *Betula platyphylla*)

Fig. 14. Analysis of the macerated material under the microscope (sieve-tube element of *Betula platyphylla* on the computer monitor)

щи постепенного повышения концентрации раствора этилового спирта [17, 19].

Заключение

Таким образом осуществляется индивидуальный подход при подготовке материала к микрокопированию, в том числе мацерации, в каждом отдельном случае. Нами используется сепарация, то есть выделение для анализа необходимых участков и типов тканей (мягких и твердых) на каждом этапе мацерации; варьирование времени экспозиции для определённого вида, места сбора и фрагмента ткани; разбивание мацерированного материала на магнитной мешалке до взвеси, в которой клетки отделены друг от друга; центрифугирование для разделения твердой, мягкой и жидкой фракций.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИМГиГ ДВО РАН.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алехин В.В. Методика полевого изучения растительности и флоры. 2-е изд., доп. и перераб. М.: Наркомпрос, 1938. 208 с.
2. Вацерионова Е.О., Копанина А.В. Особенности структуры молодых стеблей *Spiraea beauverdiana* в условиях сольфатарных полей вулкана кальдеры Головнина, остров Кунашир // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2016. Вып. 15. С. 8–10.
3. Вацерионова Е.О., Копанина А.В., Власова И.И. Структура коры однолетнего стебля *Spiraea beauverdiana* (Rosaceae) в условиях сольфатарных полей кальдеры вулкана Головнина (о-в Кунашир, южные Курильские о-ва) // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2021. № 25. С. 1–15. DOI: 10.17581/bbgi2501.
4. Власова И.И., Копанина А.В. Методические особенности анализа коры древесных растений // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: тез. докл. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2019. С. 100.
5. Власова И.И., Копанина А.В. Методические особенности подготовки материала для микрокопирования тканей древесных растений // Геодинамические процессы и природные катастрофы: тез. докл. III Всерос. науч. конф. с междунар. участием / отв. ред. Л.М. Богомолов. Южно-Сахалинск, 2019. С. 157.
6. Власова И.И., Копанина А.В. Особенность пробоподготовки кустарничков и кустарничков к структурному анализу // Ботанические чте-

- ния: сб. материалов науч. конф. Брест: БрГУ, 2021. С. 31–35.
7. Гамалей Ю.В. Эндоплазматическая сеть растений. Происхождение, структура и функции. СПб.: БИН РАН, 1994. 79 с.
 8. Гамалей Ю.В. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. 424 с.
 9. Ерёмин В.М., Копанина А.В. Атлас анатомии коры деревьев, кустарников и лиан Сахалина и Курильских островов / отв. ред. Е. С.Чавчавадзе. Брест: Полиграфика, 2012. 896 с.
 10. Кашина Е.Н. Способ мацерации растительных тканей: авт свид. № 325938 СССР. 06.07.1970.
 11. Кашина Е.Н. Мацерация тканей листьев, корней и зародышей семян *Heliantus annuus L.* // Ботанический журнал. 1971. Т. 565, № 10. С. 1477.
 12. Копанина А.В. Структурные адаптации *Spiraea beauverdiana* (Rosaceae Juss.) в экстремальных условиях строение, свойства и качество древесины // Строение, свойства и качество древесины – 2018: материалы VI Междунар. симп. им. Б.Н. Уголева, посвященного 50-летию регионального координационного совета по современным проблемам древесиноведения. Красноярск: СО РАН, 2018. С. 108–111.
 13. Копанина А.В. Структурные особенности коры и древесины *Spiraea beauverdiana* (Rosaceae) в экстремальных условиях Арктики и поствулканической активности на Курильских островах // Сибирский лесной журнал. 2019. № 3. С. 52–63.
 14. Лавренко Е.М. Методика геоботанических исследований степей // Методика полевых геоботанических исследований. М.; Л., 1938. С. 43–55.
 15. Мазуренко М.Т., Хохряков А.П. Структура и морфогенез кустарников. М.: Наука, 1977. 160 с.
 16. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М.: Высшая школа, 1960. 206 с.
 17. Раменский Л.Г. Учёт и описание растительности (на основе проективного метода). М.: Изд-во Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук, 1937. 100 с.
 18. Серебряков И.Г. Структура и ритм в жизни цветковых растений // Бюллетень МОИП, отд. биол. 1949. Т. 54, вып. 1. С. 47–61.
 19. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятов и др. М.: МГУ, 2004. 312 с.
 20. Тальских А.И., Копанина А.В., Власова И.И. Структурные особенности коры *Betula ermanii* (Betulaceae) в ландшафтах морских побережий и активных вулканов Дальнего Востока России // Растительные ресурсы. 2021. Т. 57, № 2. С. 124–144.
 21. Эверт Р.Ф. Анатомия растений Эзау. Меристемы, клетки и ткани растений: строение, функции и развитие: пер. с англ. / под ред. А.В. Степановой. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 600 с
 22. Angyalossy V., Pace M.R., Evert R.F., Marcati C.R., Oskolski A.A., Terrazas T., Kotina E., Lens F., Mazzoni-Viveiros S.C., Angeles G., Machado S.R., Crivellaro A., Rao K.S., Junikka L., Nikolaeva N., Baas P. IAWA List of Microscopic Bark Features // IAWA Journal. 2016. Vol. 37, N 4. P. 517– 615. DOI: 10.1163/22941932-20160151.
 23. Barbosa A.C.F., Pace M.R., Witovisk L., Angyalossy V. A new method to obtain good slides of heterogeneous plant parts // IAWA Journal. 2010. Vol. 31, N4. P. 373–383. DOI: 10.1163/22941932-90000030.
 24. Blagitz M., Nogueira A., Marcati C.R. Differences of the stem vascular system across populations of two tropical species under contrasting water conditions strategy // IAWA Journal. 2021. Vol. 21, N 1. P. 1–18. DOI: 10.1163/22941932-bja10077.
 25. Chamberlain C.J. Methods in plant anatomy. 4th ed. Chicago: University of Chicago Press, 1935. 334 p.
 26. Franklin G.L. Preparation of sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood // Nature. 1945. 155. P. 51.
 27. Dickson A. Mosaic, block-face microscopy for measuring cell dimensions, cell collapse, and spatial relationships in wood // IAWA Journal. 2021. Vol. 32, N 14. P. 1–13. DOI: 10.1163/22941932-bja10072.
 28. Frankiewicz K.E., Oskolski A.A., Reduron J.-P., Banasiak Ł., Reyes-Betancort J.-A., Trzeciak P., Spalik K. Stem anatomy of Apioideae (Apiaceae): effects of habit and reproductive strategy // IAWA Journal. 2021. Vol. 277, N 1693. P. 1–20. DOI: 10.1163/22941932-bja10078.
 29. Gärtner H., Schweingruber F.H. Microscopic preparation techniques for plant stem analysis. Birmensdorf: Verlag Dr. Kessel, 2013. 78 p.
 30. Ge Wang, Sheldon Q. Shi, Jinwu Wang, Yan Yu, Shuangping Cao, Haitao Cheng. Tensile prop-

erties of four types of individual cellulosic fibers // Wood and Fiber Science. 2011. Vol. 43 (4). P. 353–364.

31. Hamann T., Smets E., Lens F. A comparison of paraffin and resin-based techniques used in bark anatomy // Taxon. 2011. Vol. 60, N 3. P. 841–851. DOI: 10.1002/tax.603016.
32. Johansen D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.
33. Keating R.C. Preparing plant tissues for light microscopy study: a compendium of simple techniques. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2014. 154 p.
34. Kopanina A.V., Talskikh A.I., Vlasova I.I., Kotina E.L. Age-related pattern in bark formation of *Betula ermanii* growing in volcanic environments from southern Sakhalin and Kuril Islands (North-east Asia) // Trees. 2022. P. 1–25. DOI: 10.1007/s00468-021-02257-x.
35. Sabinelli V., Ceccantini G. Axial and radial wood maturation in three mistletoe ‘giants’ (Loranthaceae) // IAWA Journal. 2022. Vol. 32, N 2. P. 1–16. DOI: 10.1163/22941932-bja10081.
36. Tomlinson P.B., Horn J.W., Fisher J.B. The anatomy of palms: Arecaceae–Palmae. Oxford University Press, 2011. 276 p. DOI:10.1093/acprof:osobl/9780199558926.001.0001.
37. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Specific microtechniques for bark tissues of woody plants // Plant anatomy: traditions and perspectives: materials of the International Symposium dedicated to the 90th anniversary of Prof. Ludmila Ivanovna Lotova. In two parts. Moscow: MAKSPress, 2019. Part 1. P. 274–278.
38. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Peculiarities of selecting woody plants for anatomy analysis in various environments // IOP Conference Series Earth and Environmental Science. 2021. Vol. 946 (1). 012048.

REFERENCES:

1. Alekhin V.V. *Metodika polevogo izucheniya rastitel'nosti i flory* (Methods of field study of vegetation and flora). Moscow: Narkompros Publ., 1938. 208 p. (In Russ.).
2. Vatserionova E.O., Kopanina A.V. The Internal Structure of the Young Stems *Spiraea Beauverdiana* Formed Under Solfataric Fields Golovnin Volcano Caldera, Kunashir Island. *Byulleten' Botanicheskogo sada-instituta DVO RAN*, 2016, no. 15, pp. 8–10. (In Russ.).
3. Vatserionova E.O., Kopanina A.V., Vlasova I.I. The Structure of the Bark of the Annual Stem of *Spiraea Beauverdiana* (Rosaceae) in the Conditions of the Solfatar Fields of the Golovnin Volcano's Caldera (Kunashir, South Kuril Islands). *Byulleten' Botanicheskogo sada-instituta DVO RAN*, 2021, no. 25, pp. 1–15. DOI: 10.17581/bbgi2501. (In Russ.).
4. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Methodological features of the analysis of the bark of woody plants, in *IXS''ezd obshchestva fiziologov rastenii Rossii «Fiziologiya rastenii – osnova sozdaniya rastenii budushchego»: tez. dokl.* (IX Congress of the Society of Plant Physiologists of Russia «Plant Physiology – the basis for the creation of plants of the future»). Kazan: Izd-vo Kazanskogo un-ta Publ., 2019, pp.100. (In Russ.).
5. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Methodological features of preparation of material for microscopy of woody plant tissues, in *Geodinamicheskie processy i prirodnye katastrofy: tezisy докладov III Vserossijskoj nauchnoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. otv. red. L.M. Bogomolov* (Geodynamic processes and natural disasters: tez. dokl. III All-Russian Scientific Conference with international participation), Bogomolov L.M., Ed. Yuzhno-Sakhalinsk, 2019, pp. 157. (In Russ.).
6. Vlasova I.I., Kopanina A.V. The peculiarity of sample preparation of shrubs and shrubs for structural analysis, in *Botanicheskie chteniya: sb. materialov nauch. konf.* (Botanical readings: collection of materials of scientific conf.). Brest: BrSU, 2021. pp. 31–35. (In Russ.).
7. Gamalei Yu.V. *Jendoplazmaticheskaya set' rastenii. Proishozhdenie, struktura i funkcii* (Endoplasmic network of plants. Origin, structure and functions). Saint Petersburg: BIN RAS, 1994. 79 p. (In Russ.).
8. Gamalei Yu.V. *Transportnaya sistema sosudistyh rastenii* (Transport system of vascular plants). Saint Petersburg: Iz-vo Sankt-Peterburgskogo un-ta Publ., 2004. 424 p. (In Russ.).
9. Eremin V.M., Kopanina A.V. *Atlas anatomii kory derev'ev, kustarnikov i lian Sakhalina i Kuril'skikh ostrovov, otv. red. E.S.Chavchavadze* (Atlas of the anatomy of the bark of trees, shrubs and lianas of Sakhalin and the Kuril Islands). Brest: Poligrafika Publ., 2012. 896 p. (In Russ.).
10. Kashina E.N. *Sposob maceracii rastitel'nyh tkanei: Avt svid. № 325938 SSSR.* (Method of maceration of plant tissues). 06.07.1970. (In Russ.).
11. Kashina E.N. Maceration of the tissues of leaves, roots and seed germs of *Helianthus annuus* L.

- Botanicheskii zhurnal*, 1971, vol. 565, no. 10, pp.1477. (In Russ.).
12. Kopanina A.V. Structural Adaptations of *Spiraea Beauverdiana* (Rosaceae Juss.) in Extreme Conditions, in *Stroenie, svoistva i kachestvo drevesiny – 2018: materialy VI Mezhdunar. simp. im. B.N. Ugoleva, posvyashchennogo 50-letiyu regional'nogo koordinatsionnogo soveta po sovremennym problemam drevesinovedeniya* (Wood structure, properties and quality – 2018: materials of the VI International. simp. named after B.N. Ugolev, dedicated to the 50th anniversary of the Regional coordinating council on modern problems of wood science). Novosibirsk: SB RAS, 2018, pp. 108–111. (In Russ.).
 13. Kopanina A.V. Structural Features of Bark and Wood of *Spiraea Beauverdiana* (Rosaceae) in the Extreme Conditions of Arctic and Volcanic Activity on the Kuril Islands. *Sibirskii lesnoi zhurnal*, 2019, no. 3, pp. 52–63. (In Russ.).
 14. Lavrenko E.M. Metodika geobotanicheskikh issledovaniy stepei, in *Metodika polevykh geobotanicheskikh issledovaniy* (Methods of field geobotanical research). Moscow; Leningrad, 1938, pp. 43–55. (In Russ.).
 15. Mazurenko M.T., Khokhryakov A.P. *Struktura i morfogenez kustarnikov* (Structure and morphogenesis of shrubs). Moscow: Nauka Publ., – 1977. 160 p. (In Russ.).
 16. Prozina M.N. *Botanicheskaya mikrotekhnika* (Botanical microtechnics). Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1960. 206 p. (In Russ.).
 17. Ramenskiy L.G. *Uchet i opisaniye rastitel'nosti (na osnove proektivnogo metoda)* (Accounting and description of vegetation (based on the projective method)). Moscow: Iz-vo Vsesojuznoi akademii sel'skhozozhajstvennykh nauk Publ., 1937. 100 p. (In Russ.).
 18. Serebryakov I.G. Structure and rhythm in the life of flowering plants. *Byulleten' MOIP, otd. biol.*, 1949, vol. 54, no. 1, pp. 47–61. (In Russ.).
 19. *Spravochnik po botanicheskoy mikrotekhnikе. Osnovy i metody*, R.P. Barykina, T.D. Veselova, A.G. Devyatov, et al. (Handbook of botanical microtechnics. Basics and methods). Moscow: MSU, 2004. 312 p. (In Russ.).
 20. Tal'skih A.I., Kopanina A.V., Vlasova I.I. Structural features of the crust of *Betula ermanii* (Betulaceae) in the landscapes of sea coasts and active volcanoes of the Russian Far East. *Rastitel'nye resursy*, 2021, vol. 57, no. 2, pp. 124–144. (In Russ.).
 21. Evert R.F. *Anatomiya rastenii Ezau. Meristemy, kletki i tkani rastenii: stroenie, funktsii i razvitie: per. s angl.* (Anatomy of Ezau plants. Meristems, cells and tissues of plants: structure, functions and development: trans. from English), Stepanova A.V., Ed. Moscow: BINOM. Laboratoriya znanii Publ., 2015. 600 p. (In Russ.).
 22. Angyalossy V., Pace M.R., Evert R.F., Marcati C.R., Oskolski A.A., Terrazas T., Kotina E., Lens F., Mazzoni-Viveiros S.C., Angeles G., Machado S.R., Crivellaro A., Rao K.S., Junikka L., Nikolaeva N., Baas P. IAWA List of Microscopic Bark Features. *IAWA Journal*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 517– 615. DOI: 10.1163/22941932-20160151.
 23. Barbosa A.C.F., Pace M.R., Witovisk L., Angyalossy V. A new method to obtain good slides of heterogeneous plant parts. *IAWA Journal*, 2010, vol. 31, no. 4, pp. 373–383. DOI: 10.1163/22941932-90000030.
 24. Blagitz M., Nogueira A., Marcati C.R. Differences of the stem vascular system across populations of two tropical species under contrasting water conditions. *IAWA Journal*, 2021, vol. 21, no. 1, pp. 1–18. DOI: 10.1163/22941932-bja10077.
 25. Chamberlain C.J. *Methods in plant anatomy*. 4th ed. Chicago: University of Chicago Press, 1935. 334 p.
 26. Franklin G.L. Preparation of sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, 1945, 155, P. 51.
 27. Dickson A. Mosaic, block-face microscopy for measuring cell dimensions, cell collapse, and spatial relationships in wood. *IAWA Journal*, 2021, vol. 32, no. 14, pp. 1–13. DOI: 10.1163/22941932-bja10072.
 28. Frankiewicz K.E., Oskolski A.A., Reduron J.-P., Banasiak Ł., Reyes-Betancort J.-A., Trzeciak P., Spalik K. Stem anatomy of Apioideae (Apiaceae): effects of habit and reproductive strategy. *IAWA Journal*, 2021, vol. 277, no. 1693, pp. 1–20. DOI: 10.1163/22941932-bja10078.
 29. Gärtner H., Schweingruber F.H. *Microscopic preparation techniques for plant stem analysis*. Birmensdorf: Verlag Dr. Kessel, 2013. 78 p.
 30. Ge Wang, Sheldon Q. Shi, Jinwu Wang, Yan Yu, Shuangping Cao, Haitao Cheng.. Tensile properties of four types of individual cellulosic fibers. *Wood and Fiber Science*, 2011, Vol. 43 (4), pp. 353–364.
 31. Hamann T., Smets E., Lens F. A comparison of paraffin and resin-based techniques used in bark

- anatomy. *Taxon*, 2011, vol. 60, no. 3, pp. 841–851. DOI: 10.1002/tax.603016.
32. Johansen D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.
33. Keating R.C. *Preparing plant tissues for light microscopy study: a compendium of simple techniques*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2014. 154 p.
34. Kopanina A.V., Talskikh A.I., Vlasova I.I., Kotina E.L. Age-related pattern in bark formation of *Betula ermanii* growing in volcanic environments from southern Sakhalin and Kuril Islands (North-east Asia). *Trees*, 2022, pp. 1–25. DOI: 10.1007/s00468-021-02257-x.
35. Sabinelli V., Ceccantini G. *Axial and radial wood maturation in three mistletoe 'giants' (Loranthaceae)*. *IAWA Journal*, 2022, vol. 32, no. 2, pp. 1–16. DOI: 10.1163/22941932-bja10081.
36. Tomlinson P.B., Horn J.W., Fisher J.B. *The anatomy of palms: Arecaceae–Palmae*. Oxford University Press, 2011. 276 p. DOI: 10.1093/acprof:osobl/9780199558926.001.0001.
37. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Specific microtechniques for bark tissues of woody plants, in *Plant anatomy: traditions and perspectives. Materials of the International Symposium dedicated to the 90th anniversary of Prof. Ludmila Ivanovna Lotova*. Moscow: MAKS Press, 2019, part 1, pp. 274–278.
38. Vlasova I.I., Kopanina A.V. Peculiarities of selecting woody plants for anatomy analysis in various environments. *IOP Conference Series Earth Environmental Science*, 2021, vol. 946 (1). 012048.

FEATURES OF THE OF WOODY PLANTS BARK MACERATION

I.I. Vlasova, A.V. Kopanina, A.I. Talskikh, E.O. Vatserionova

The article describes problems in preparing the woody plants bark for maceration and the ways to solve them by modifying methodological approaches. During maceration of the bark and its constituent tissues of woody plants, certain difficulties arise, especially with phloem, since this tissue is less lignified and stable than xylem, which remains relatively unchanged in its structure during ontogenesis. This fact requires an individual approach not only to different types, but also to each specific case. We use separation, that is, the selection of necessary tissue sections and tissue types (soft and hard) at each stage of maceration: selection of definite fragments for analysis, varying the exposure time for a certain type, collection and tissue fragment site, centrifugation of both hard, soft and liquid fractions. We separate, if possible, the periderm and wood, macerating only the part necessary for microscopic analysis of the bark internal structure. They are conductive phloem to reveal the characteristics of conducting living elements, non-conductive phloem for the study of sclerified elements, and elements of the cortex for the study of parenchyma, primary mechanical elements, etc. The macerating liquid includes distilled water, concentrated acetic acid, and hydrogen peroxide. We place the prepared samples, tightly closed with a ground lid, in a thermostat with a temperature of 50 °C. The exposure time in the thermostat can vary from several hours to several days. Then we thoroughly wash the macerated matter with distilled water before the odor of acetic acid disappears, with the following centrifuging and preparing the slides for analysis.

Keywords: maceration, microscopic analysis, internal structure of the cortex /

Reference: Vlasova I.I., Kopanina A.V., Talskikh A.I., Vatserionova E.O. Features of the of woody plants bark maceration. *Regional'nye problemy*, 2022, vol. 25, no. 1, pp. 31–43. (In Russ.). DOI: 10.31433/2618-9593-2022-25-1-31-43.