



Введение + методы

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

# Что мы сегодня будем обсуждать?

- Что является предметом изучения?
- Почему это важно?
- Кто и когда впервые поставил вопрос и начал искать ответы?
- Какая техника используется для исследования?
- Как подготавливают материал для исследования?

# Размножение растений. О чём идёт речь?



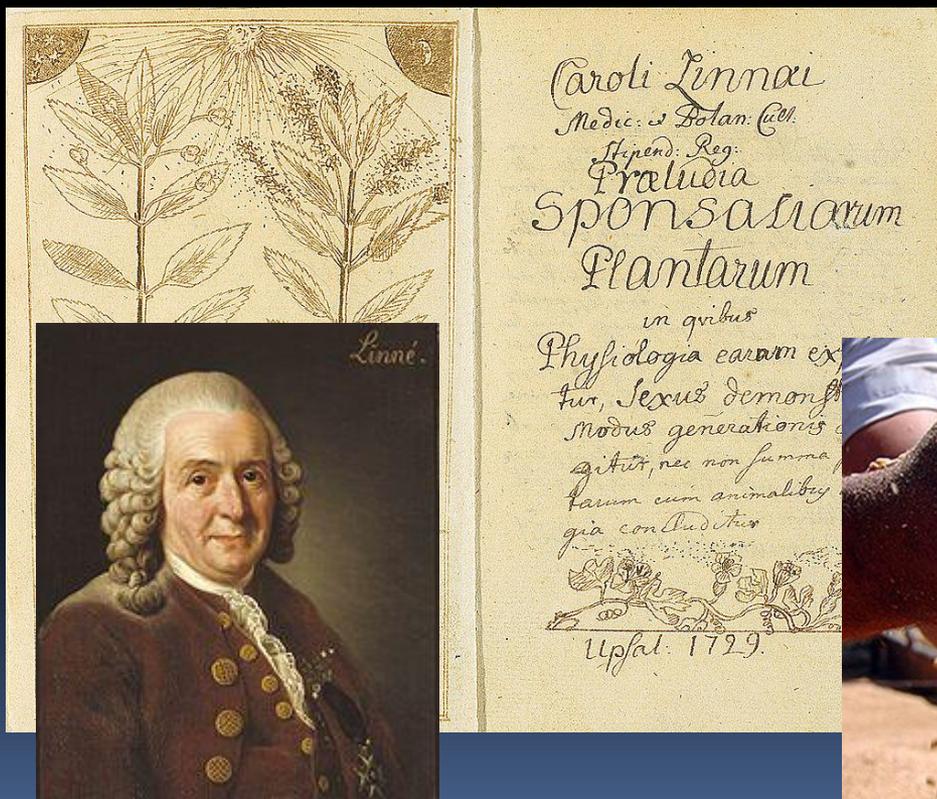
- Растения размножаются половым и бесполом путём: смена поколений.

- Растения также размножаются вегетативно (без смены поколений).

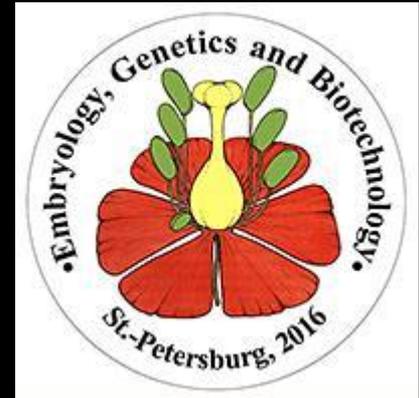
- В нашем курсе речь пойдёт о половом/гаплоидном поколении растений: ♂ и ♀ гаметофитах и их взаимодействии

# Почему важно изучать размножение растений?

- Фундаментальный интерес
- Практический интерес



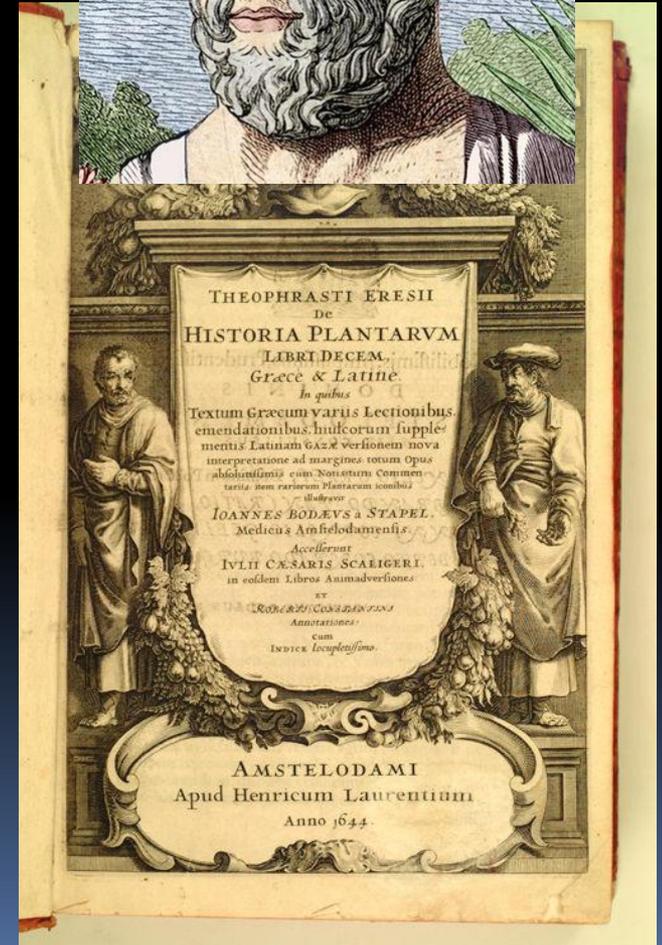
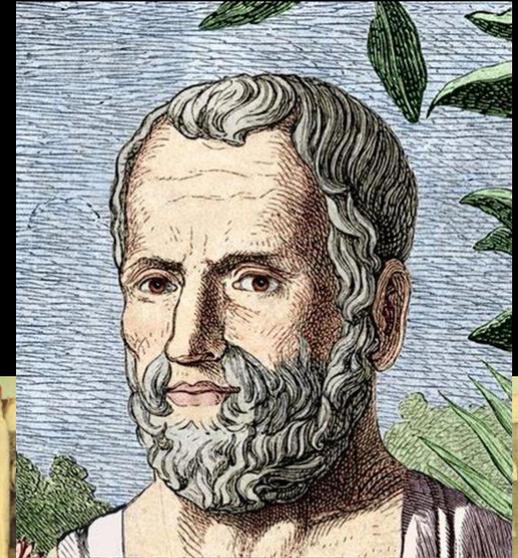
# Какая наука его изучает?



- Размножение растений можно рассматривать с позиции **ботаники** (описание, видовая специфичность) и **физиологии** (механизмы, процессы).
- В настоящее время существует раздел ботаники «**эмбриология растений**», который изучает особенности размножения и раннего развития растений.
- Мы будем придерживаться физиологического подхода.

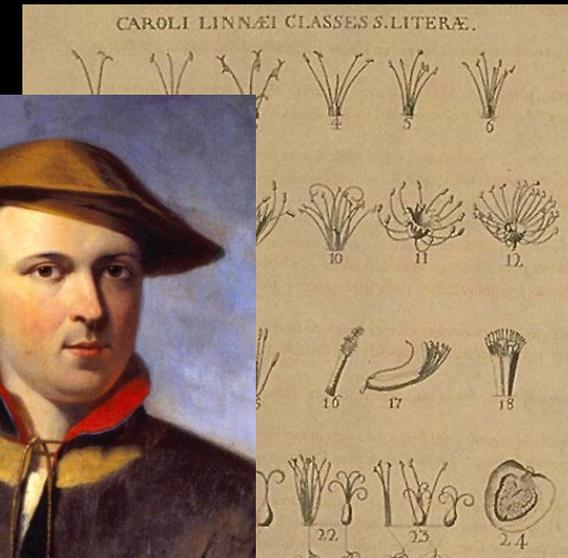
# Как всё начиналось?

- Теофраст – «отец ботаники» (прим. 370 - 288 до н.э.) написал «Историю растений» и «Причины растений», в которых даются основы классификации и физиологии растений.
- Он сразу обозначил ключевые физиологические вопросы, в том числе, об органах растений (включая генеративные) и их функциях, возможных механизмах зарождения/размножения растений и т.п.
- Таким образом, ботаника на всех этапах развития включала в себя репродуктивную физиологию в той или иной форме



# Линней и размножение растений

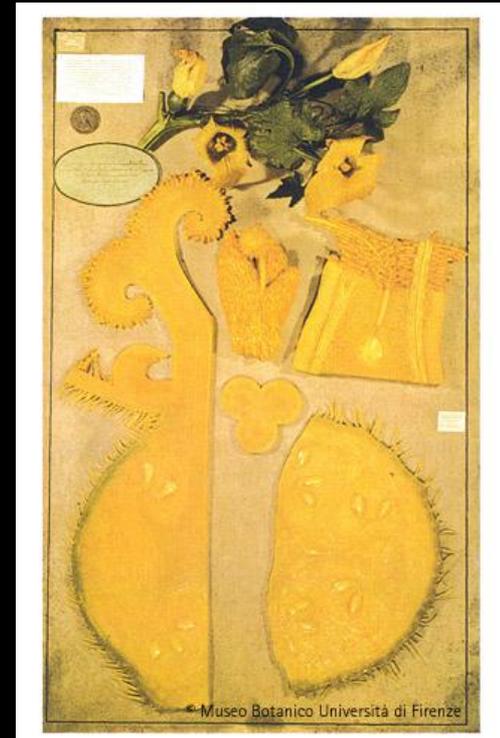
- Первая научная работа К. Линнея называлась «Введение в половую жизнь растений» («Введение к помолвкам растений») 1729 г.
- В нём были изложены основные идеи его будущей половой классификации растений.
- Рукопись представляла собой обзор мнений по вопросу пола у растений античных и современных авторов, а также описание функций различных частей цветка в соответствии с идеями Вайяна (о вспомогательной роли лепестков и основополагающая роль тычинок-«женихов» и пестиков-«невест»).

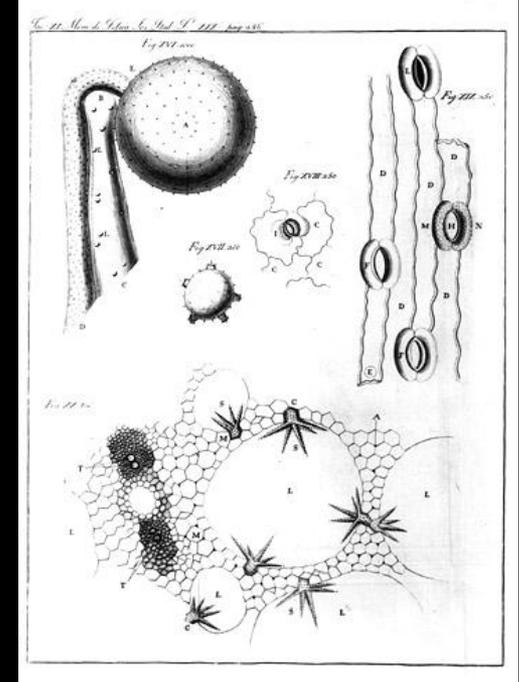
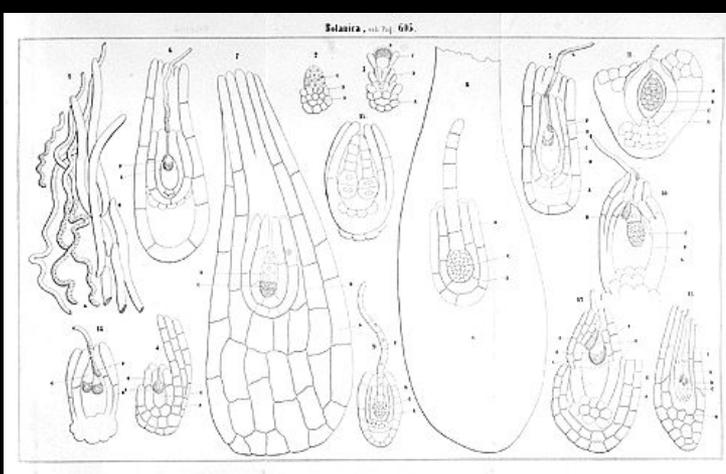


# История фитоэмбриологии

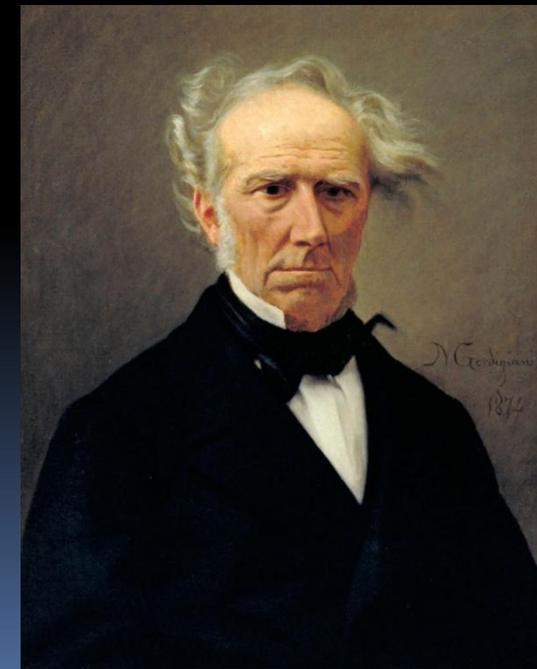
Что обеспечило развитие представлений о репродукции растений?

- развитие микроскопической техники и
- укоренение идей о «происхождении организма из зародыша», о необходимости мужского и женского начал



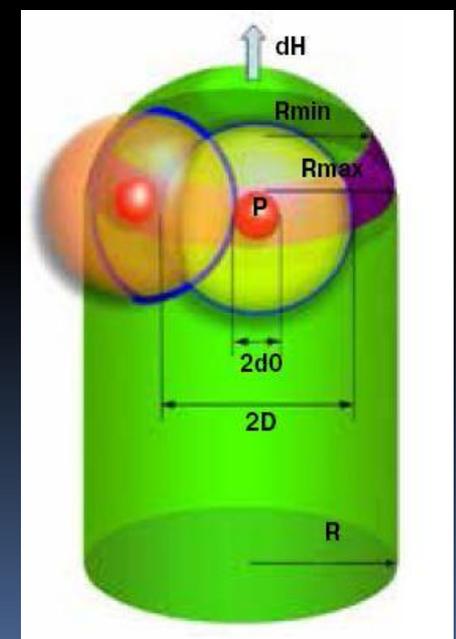


- Жан Батист Амичи первым наблюдал пыльцевую трубку (1823), «зародышевый пузырёк» (яйцеклетку) и высказал правильное предположение о развитии зародыша под влиянием оплодотворяющего начала, принесённого пыльцевой трубкой (1843).
- Однако, неясным оставалось 2 вопроса: (а) какой из элементов является мужским, а какой – женским, и (б) из какого элемента развивается зародыш?
- Путаницу вносил Маттиас Шлейден, который настаивал на главенстве мужского начала (в соответствии с патриархальными устоями).



# Методы

- Наблюдение и описание
- Эксперимент
- Моделирование



# Классическая световая микроскопия

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

- Морфологические исследования на живых, но чаще фиксированных объектах
- Фиксация обеспечивает стабильность проб и улучшала их оптические свойства.
- Предел разрешающей способности: полупериод волны излучения. Диапазон длин волн 200—700 нм
- → можно различать структуры с расстоянием между точками до  $\sim 0,20$  мкм → максимальное увеличение  $\sim 2000 \times$

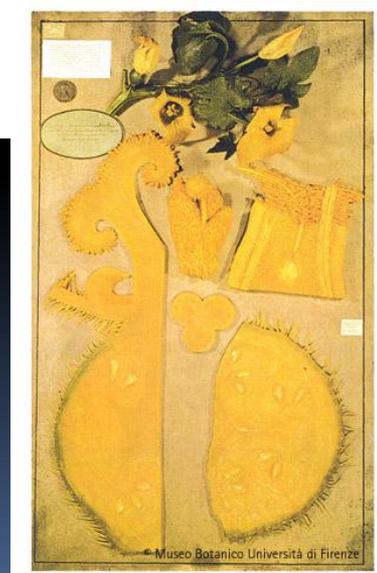
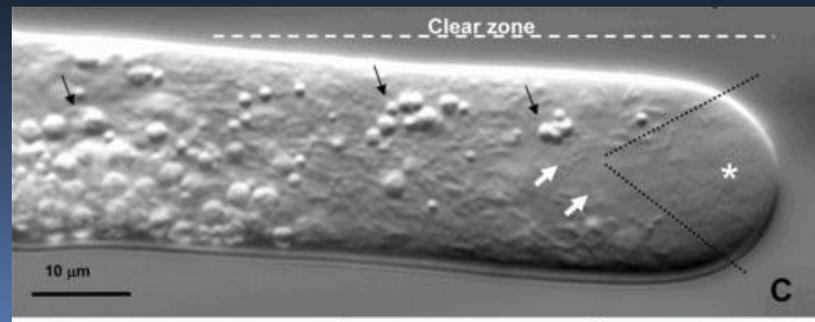
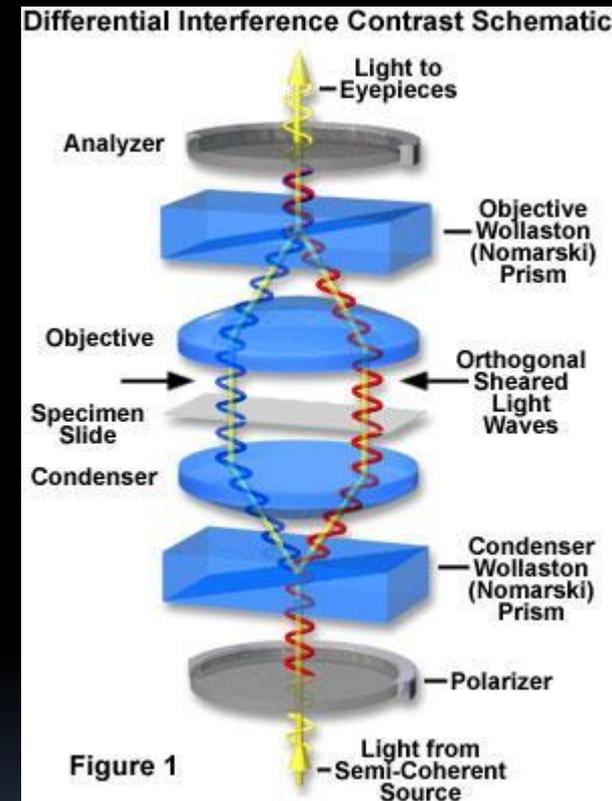


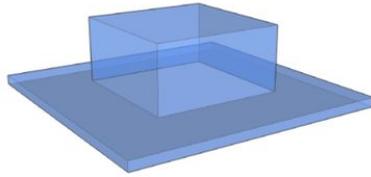
photo by A. Meschieri

# Световая микроскопия. Работа с неокрашенными препаратами.

- Классический фазовый контраст (тонкие прозрачные объекты)
- дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия (DIC, Differential Interference Contrast или микроскопия Номарского) – подходит как для тонких, так и для более толстых объектов.
- Принцип – разделение 2 лучей с их последующей интерференцией.



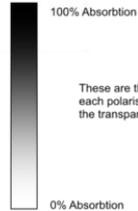
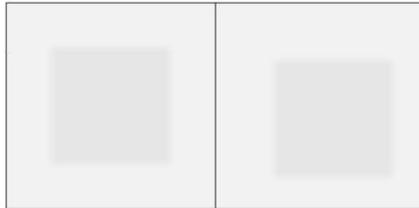
## Differential Interference Contrast Light Microscopy Example



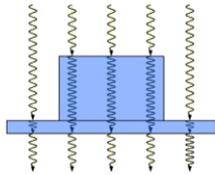
This transparent sample is illuminated by two slightly offset light sources, one at 0° polarisation and the other at 90° polarisation.

0° Polarisation

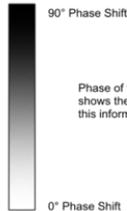
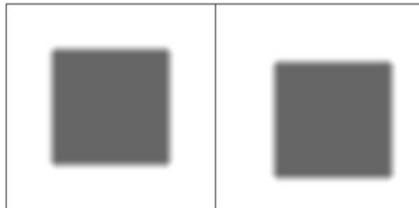
90° Polarisation



These are the two visible images due to each polarisation. These are not useful as the transparent sample is not well visualised.

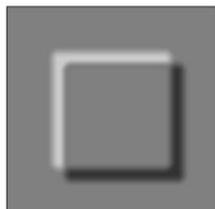


Passage of light through the optically dense sample causes shortening of the wavelength, so a change in phase (phase change greatly exaggerated).



Phase of the two polarisations. This clearly shows the transparent sample, however this information is not visible to the human eye.

Polarisations rotated to allow interference and images overlaid.

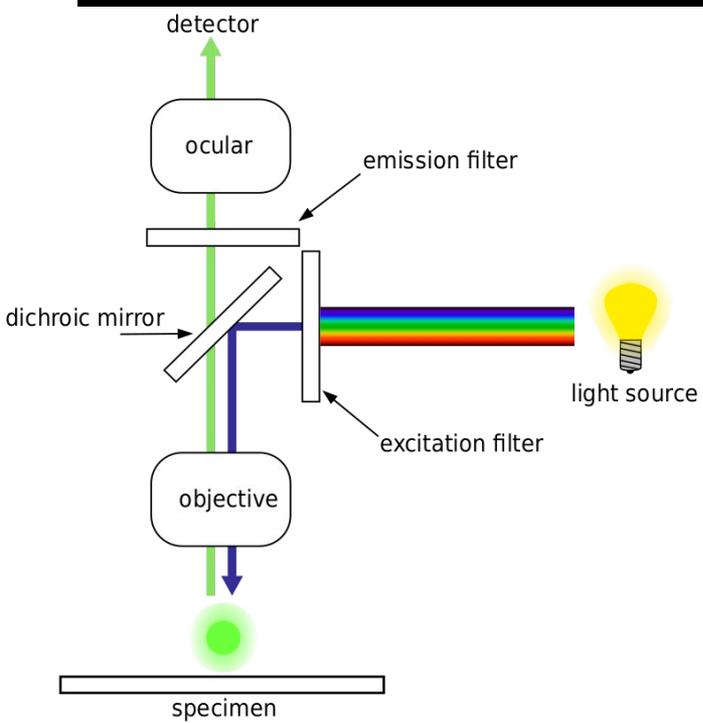


Visible image after interference of the two polarisations. The phase difference becomes visible through interference and this clearly shows the shape of the transparent sample.

# DIC. Some more

- Луч поляризуется.
- Два луча идут параллельно.
- За счет отклонения лучей в толще препарата от параллели создается эффект объемного изображения.

# Флуоресцентная микроскопия



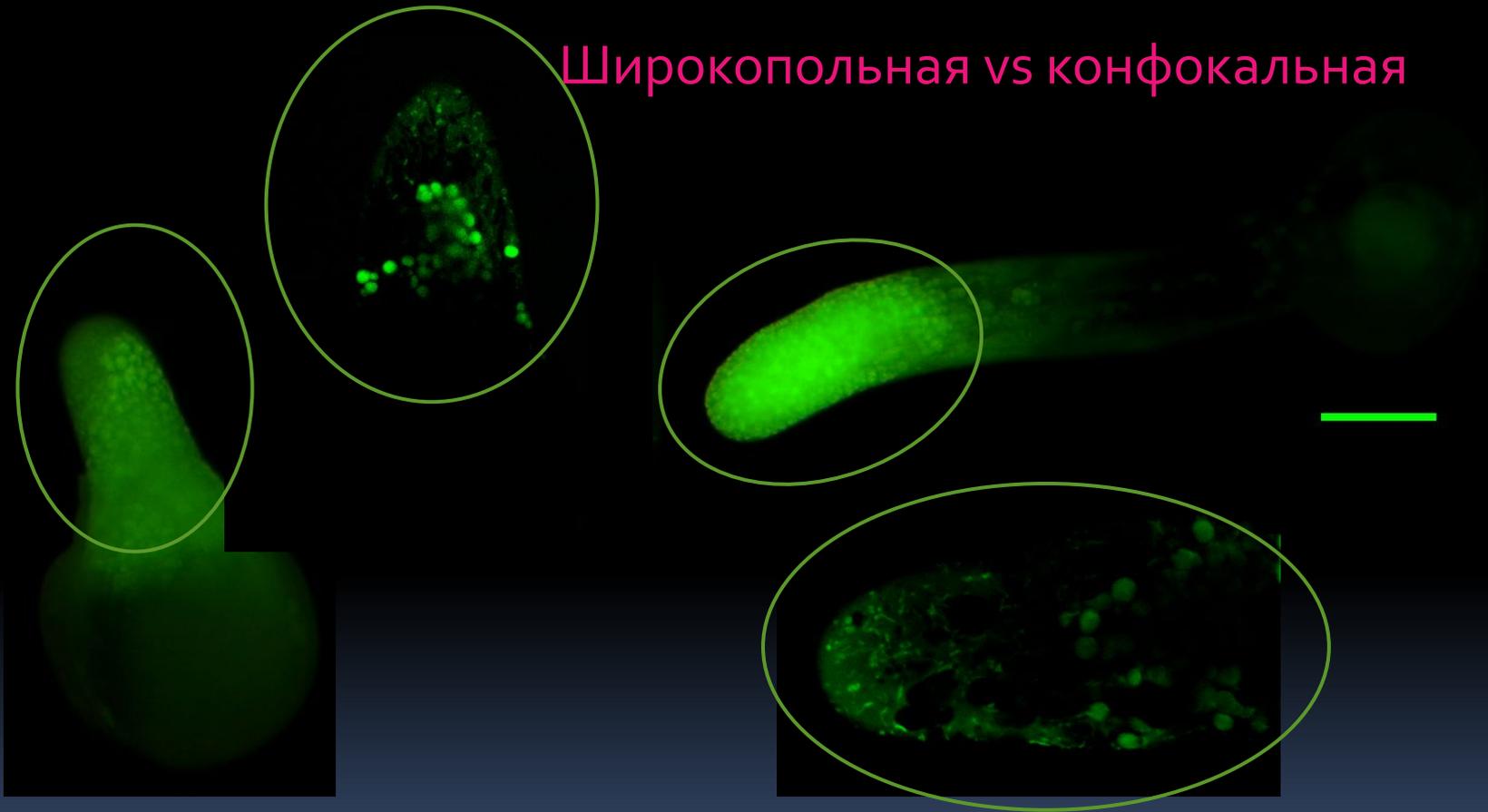
- Светят молекулы – *флуорофоры*
- Яркое свечение на темном фоне обеспечивает повышение отношения сигнал/шум по сравнению с просветными красителями
- Возможность компьютерного улучшения и анализа изображения
- Возможность прижизненного наблюдения!

# Флуоресцентная микроскопия

Широкопольная	Конфокальная
<ul style="list-style-type: none"><li>• флуоресценция возбуждается светом лампы с помощью набора фильтров</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• флуоресценция возбуждается лазерным лучом</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Широкий спектр возбуждения, возможность использования большого количества различных красителей</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Длина волны возбуждения зависит от типа лазера, узкий спектр. Каждый лазер покупается отдельно.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Возбуждение лампой более щадящее, не так быстро выцветает. Важно для живых объектов.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Лазер дает мощное возбуждение, красители ярко светят, но быстро выцветают. Объект может погибнуть.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Препарат освещается на всю толщину, на камеру попадает «суммарное» изображение.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Возбуждается тонкий слой объекта, изображение более четкое, остальные слои не засвечиваются и могут быть использованы для 3D реконструкции.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Изображение получается быстро (широкий луч)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Изображение получается долго (сканируется узким лучом)</li></ul>

# Флуоресцентная микроскопия

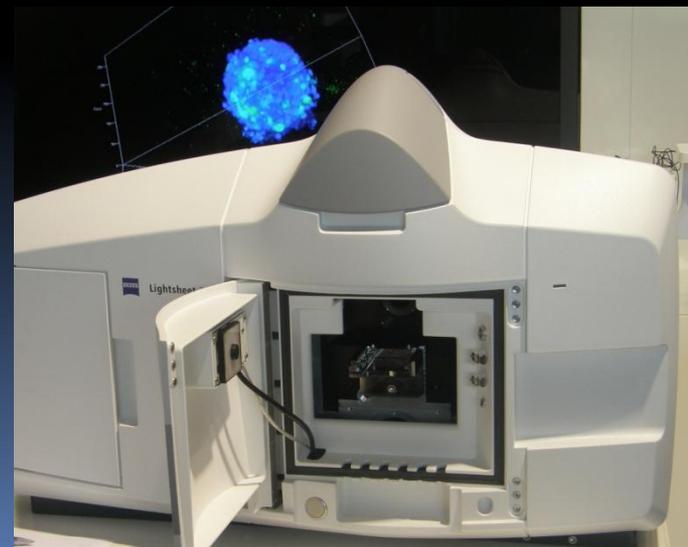
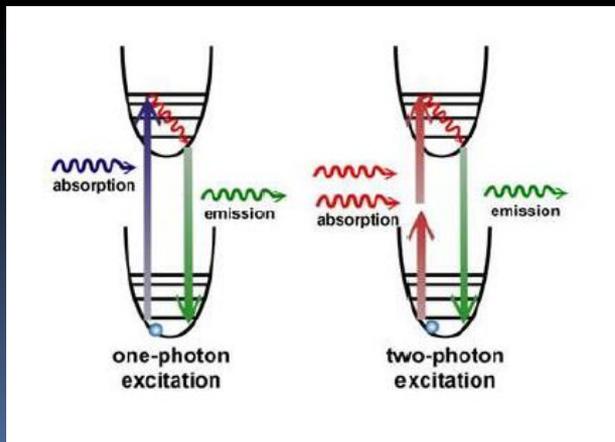
Широкопольная vs конфокальная



# Современные разновидности

## Мультифотонная конфокальная микроскопия

- Обеспечивает глубокое проникновение в толщу тканей
- Позволяет получать 3D изображение
- Позволяет работать с крупными объектами, например, с пестиками *in vivo*.
- Меньше выцветания и токсичности для объекта
- *Требует инфракрасного лазера*



# Современные разновидности

## Микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence)

- Применяют для изучения примембранного слоя клетки, контактирующей с покровным стеклом.
- Толщина слоя, в котором возбуждается флуоресценция, составляет около 100 нм. Прекрасное разрешение по оси Z.
- Меньше выцветания и стресса

Widefield

TIRF



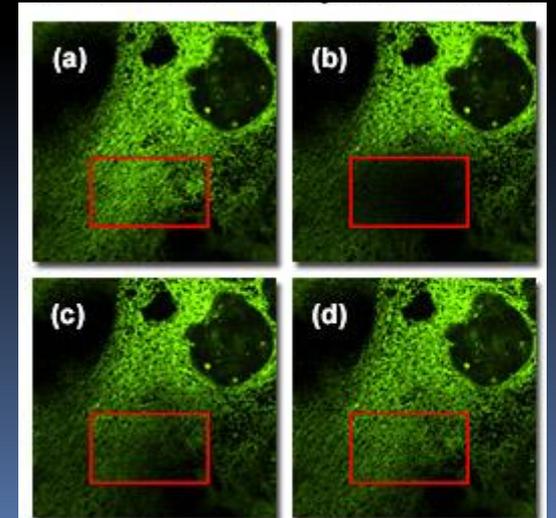
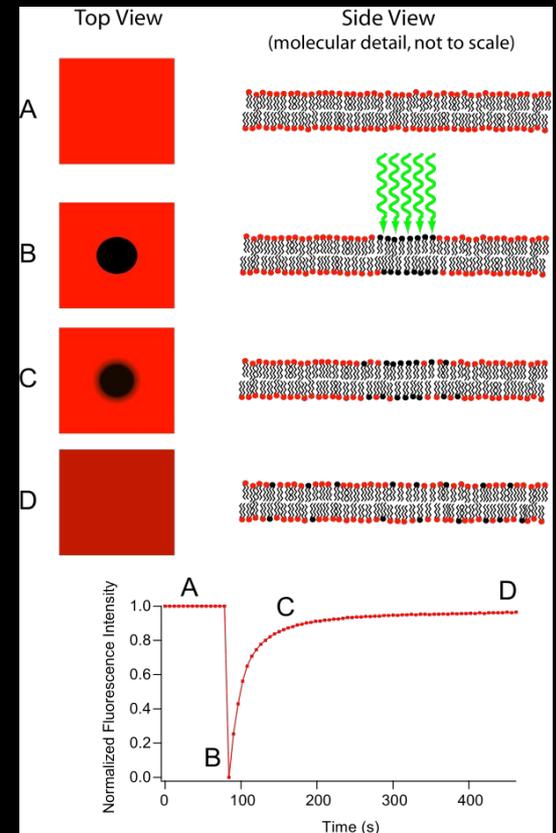
Leica TIRF microscopy



# Современные

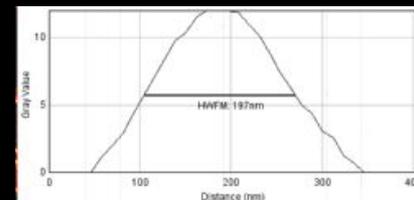
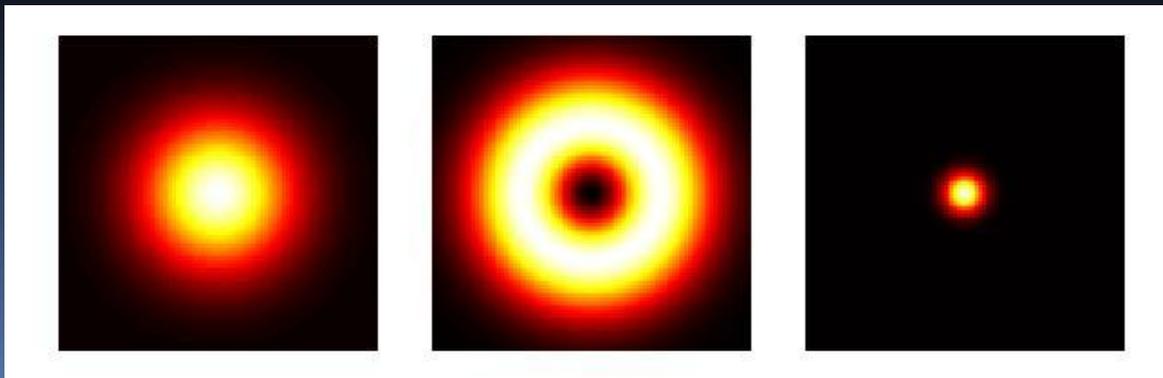
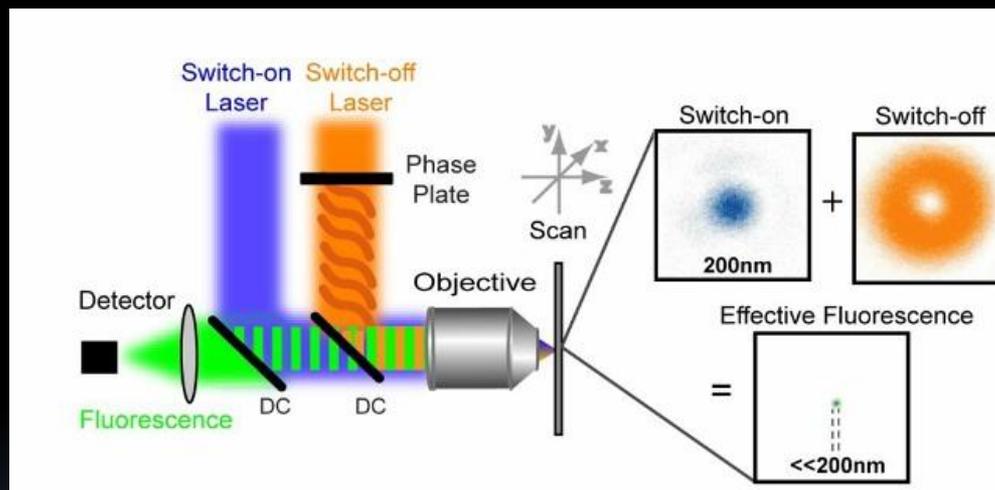
## Восстановление флуоресценции разновидности после фотовыжигания FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

- Применяется для исследования подвижности биоорганических молекул
- Сфокусированный лазерный луч высокой интенсивности выжигает молекулы флуорофора в небольшой области клетки. После этого молекулы из необлученной зоны диффундируют в облученную, флуоресценция восстанавливается.
- По скорости этого процесса можно судить о подвижности молекул.

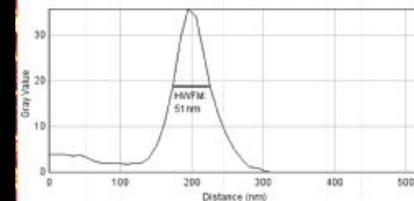


# Микроскопия сверхвысокого разрешения

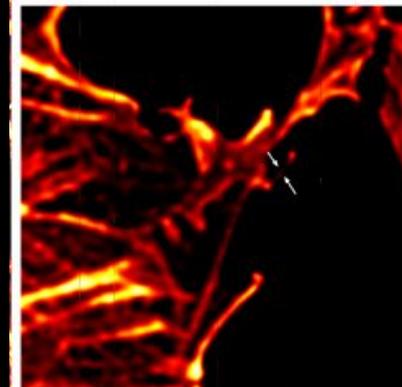
STED (Stimulated Emission Depletion  
microscopy)



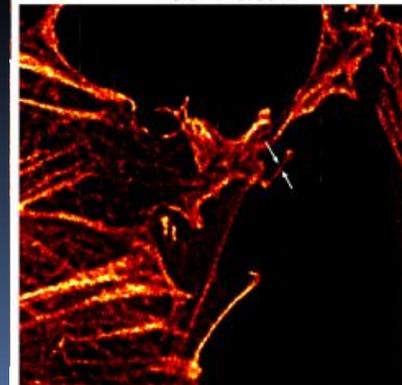
Confocal



STED



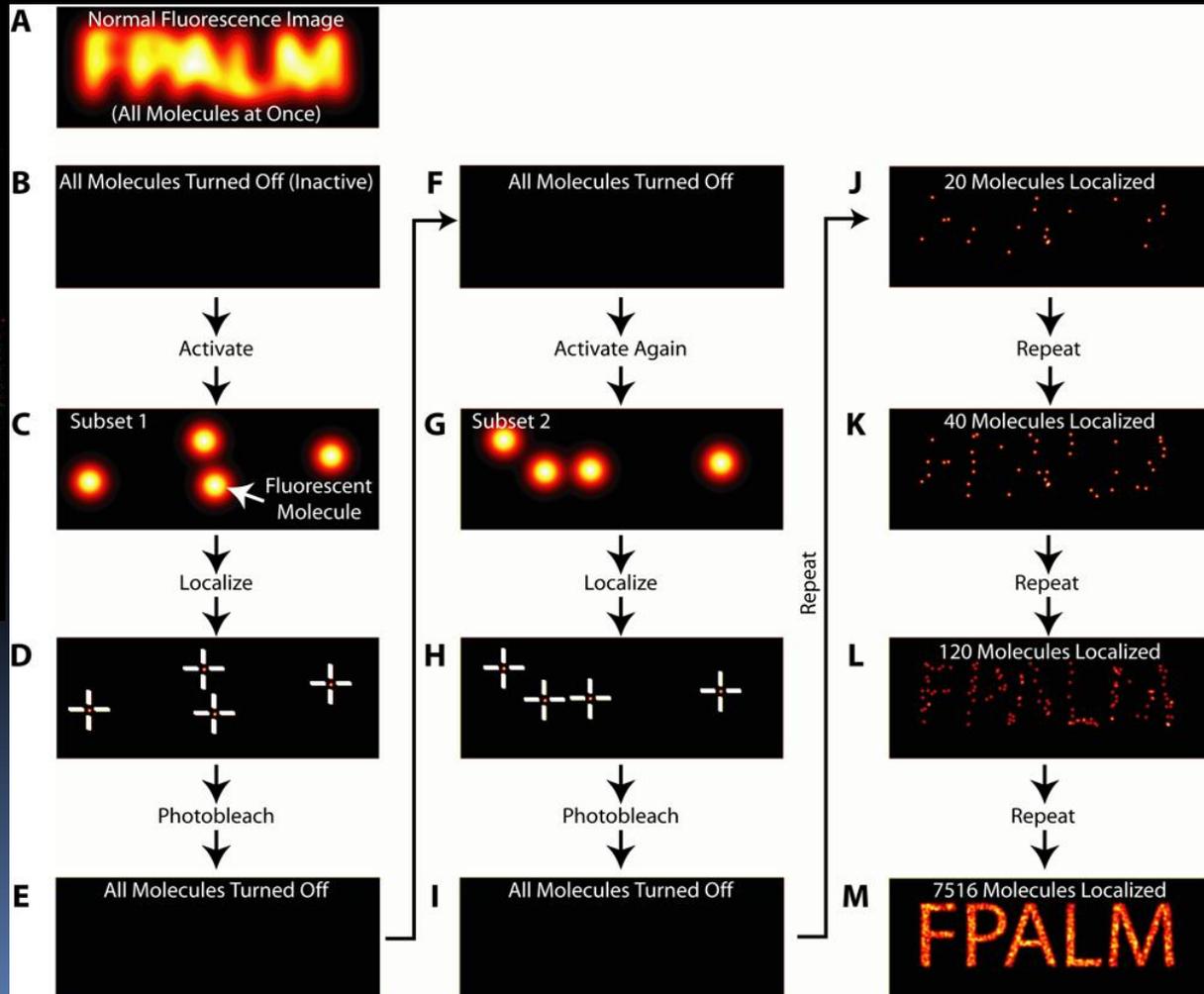
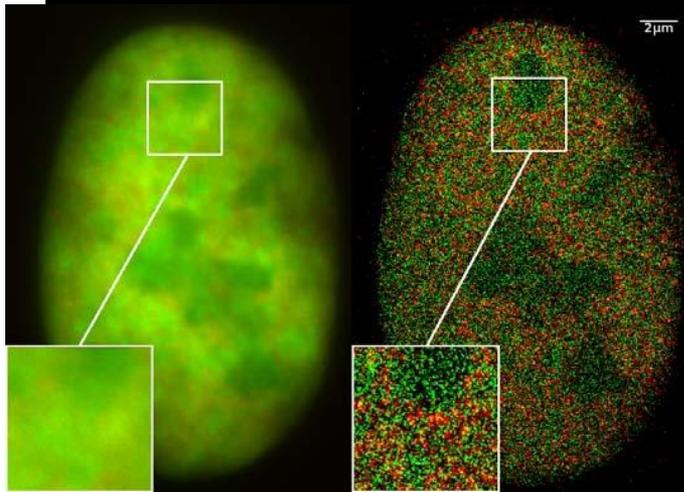
Confocal



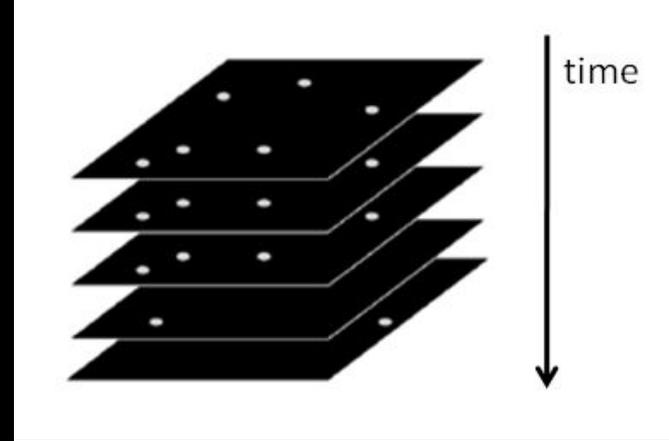
STED

# Микроскопия сверхвысокого разрешения

- PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)



# PALM. Some more



- Разновидность широкополосной микроскопии
- Метод года-2008 по версии *Nature Methods*
- Основа метода – возбуждение (активация) отдельных молекул флуорофора по очереди, с последующим выжиганием.
- Две молекулы можно различить, потому что они светят **не одновременно**

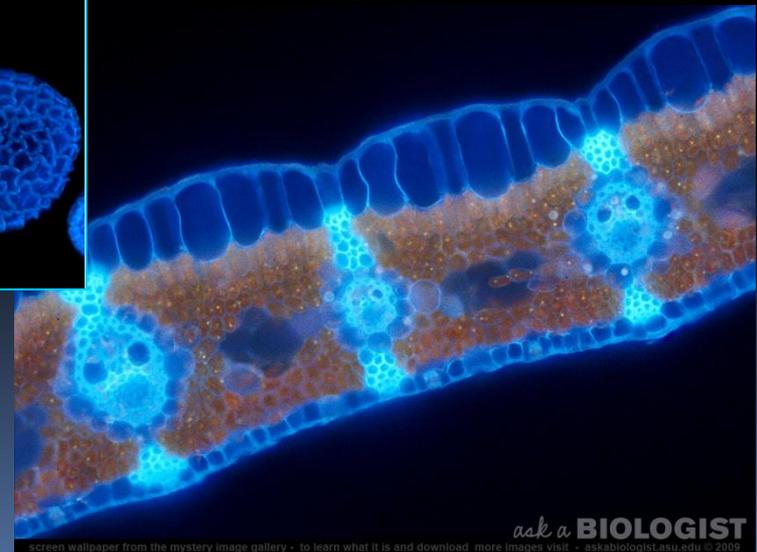
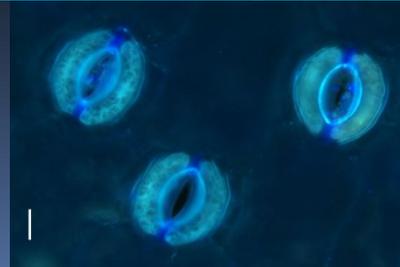
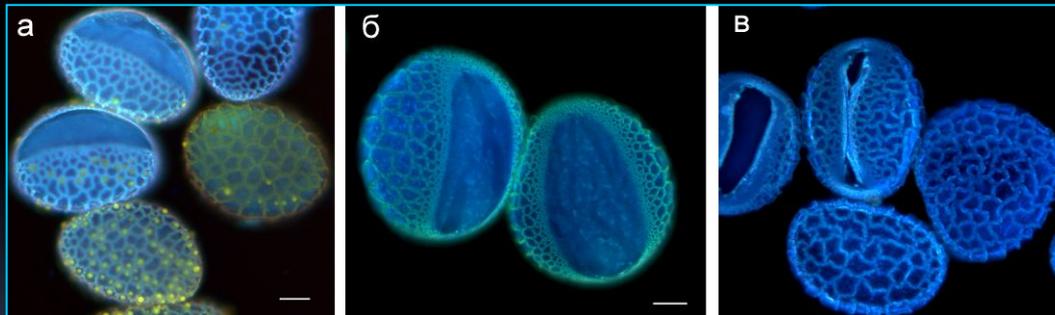
# Подготовка проб для флуоресцентной микроскопии

В каких случаях мы можем увидеть флуоресценцию?

- Автофлуоресценция
- Красители
- Антитела с флуоресцентной меткой
- Флуоресцентные белки

# Автофлуоресценция

- Автофлуоресценция свойственна многим растительным тканям.
- Для репродуктивных структур наиболее важна автофлуоресценция - клеточной оболочки
- Как правило, в ультрафиолете светят фенольные соединения

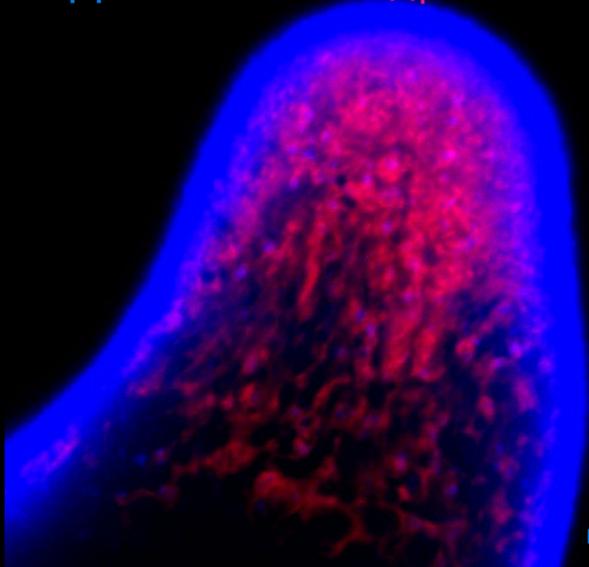


# Флуоресцентные красители

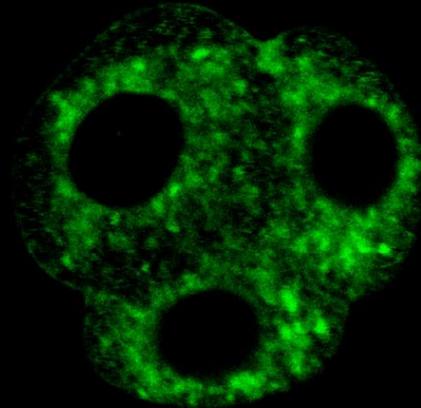
- Прижизненные и для фиксации
- Красители для визуализации (качественные) и (полу)количественной оценки
- Красители на ядро (ДНК), митохондрии, Гольджи, цитоскелет
- Красители на мембранный потенциал, АФК, внутриклеточные ионы, pH

# Увидеть органеллы

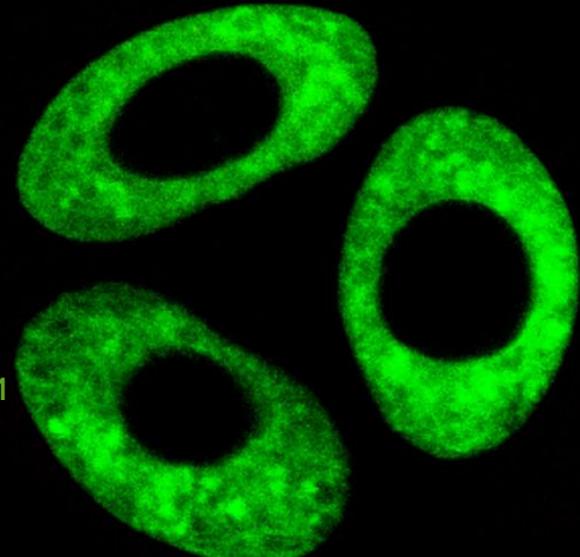
ДНК и митохондрии



ДНК, ядрышко и митохондрии

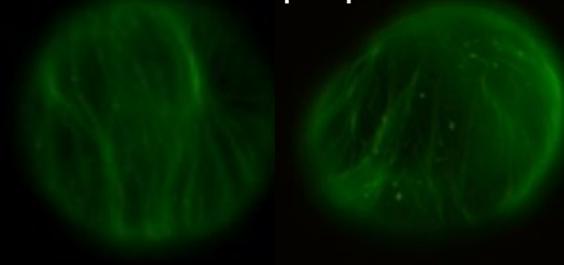
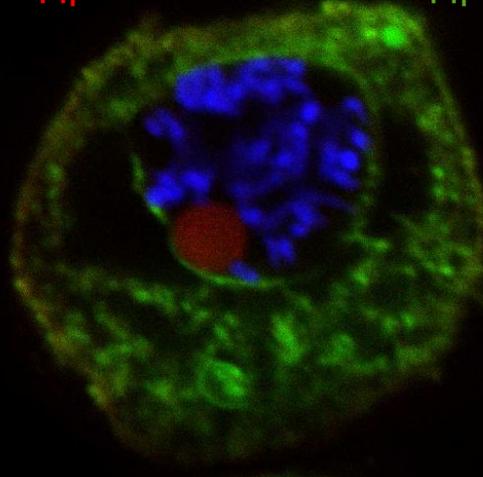
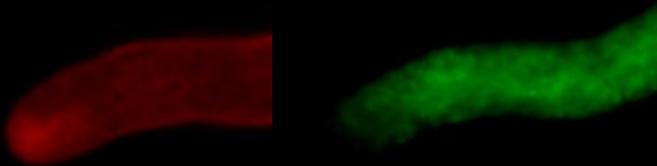


митохондрии



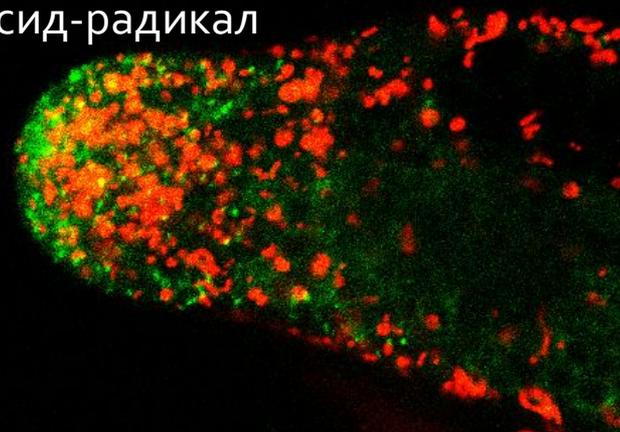
актиновые микрофиламенты

везикулы и митохондрии

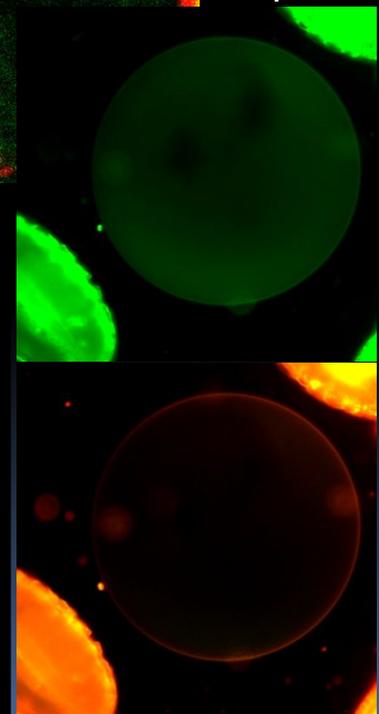


# Полуколичественные и количественные красители

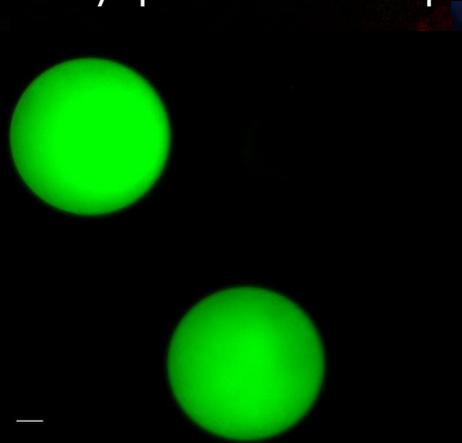
Активные формы кислорода: суммарные, перекись, супероксид-радикал



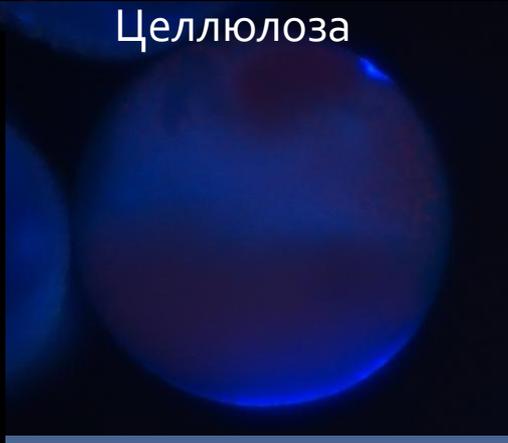
Мембранный потенциал



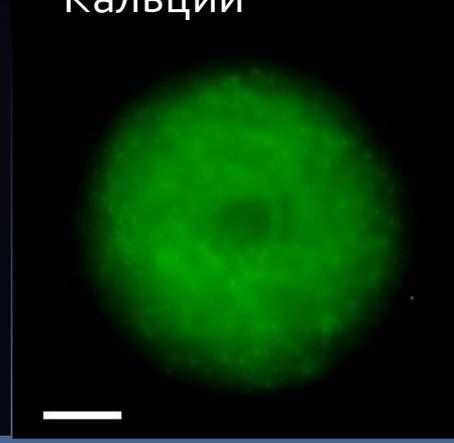
Внутриклеточный pH



Целлюлоза

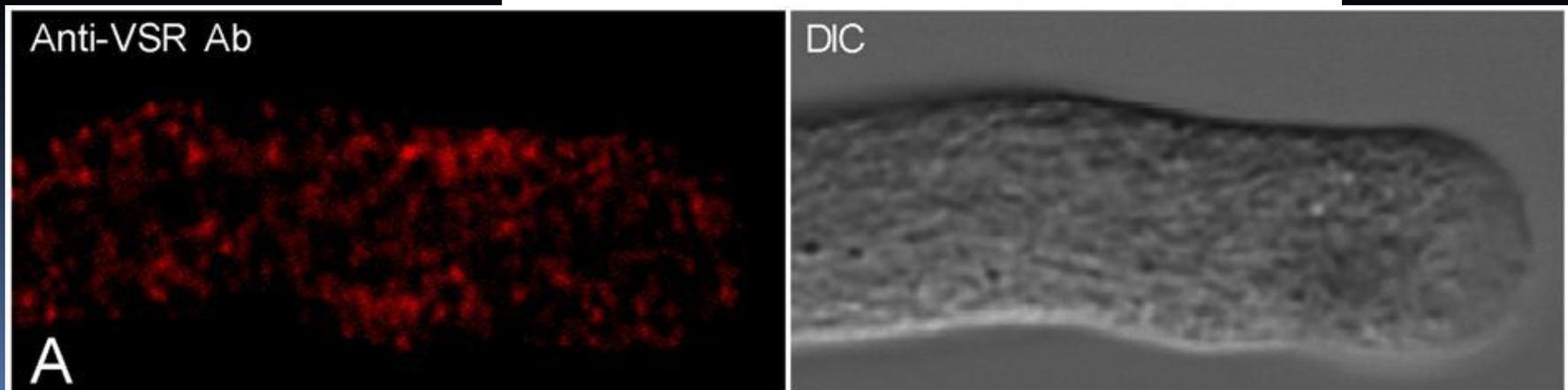
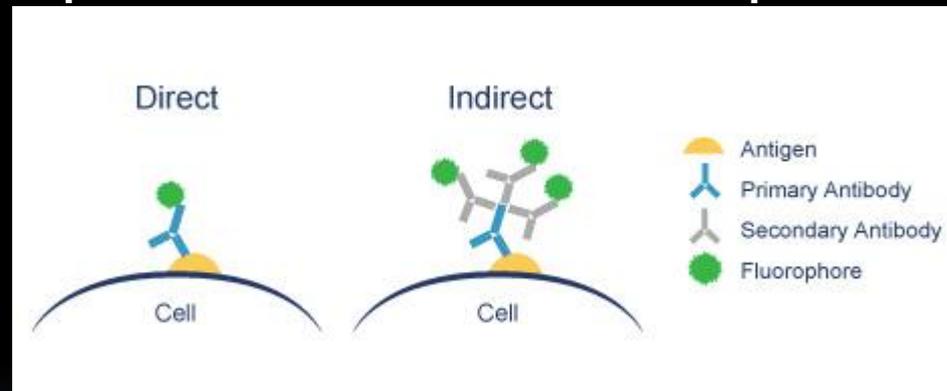


Кальций



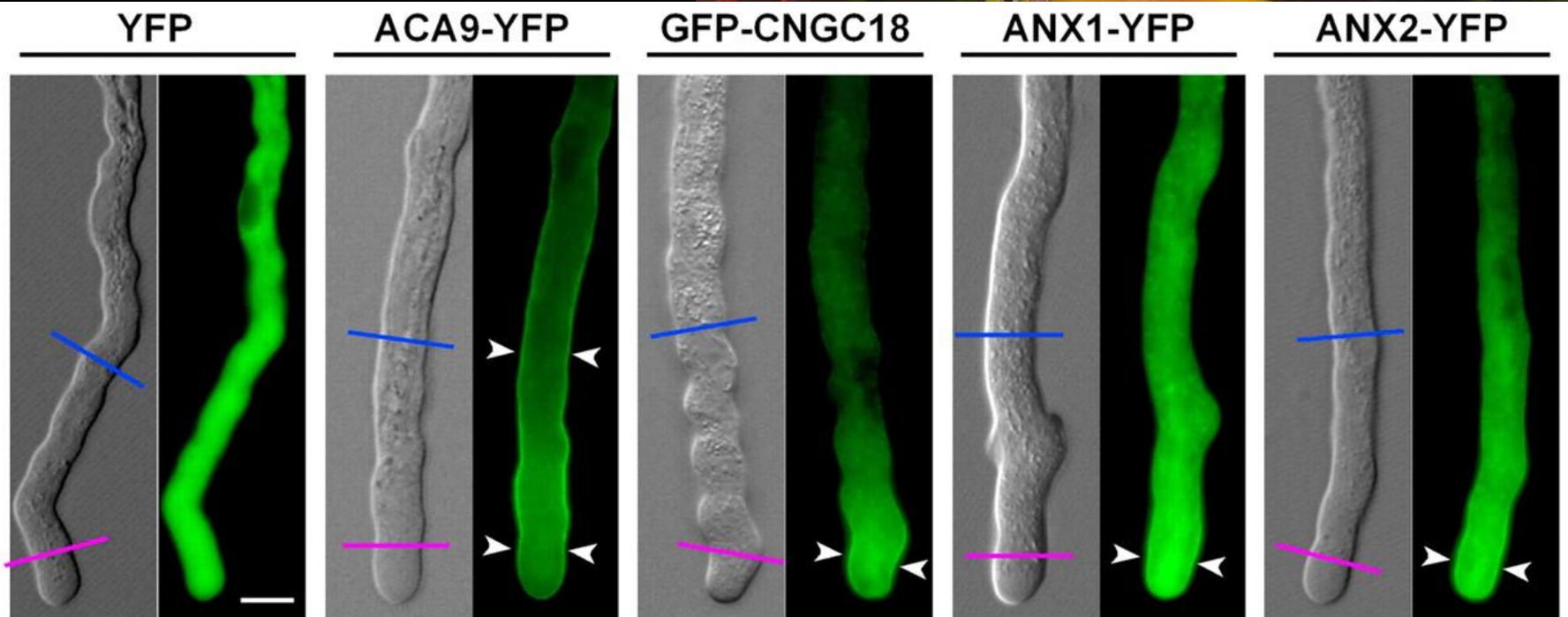
# Иммунофлуоресценция

- Первичная/прямая (метка на первичном антителе)
- Вторичная/непрямая (метка на вторичном антителе)



# Флуоресцентные белки

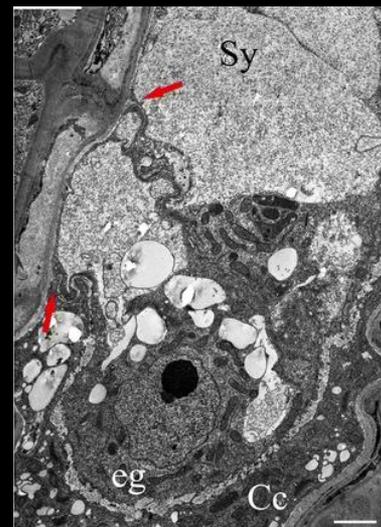
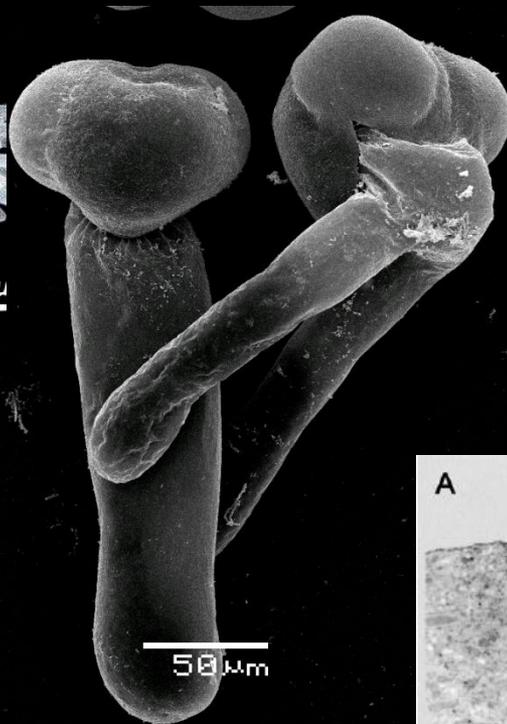
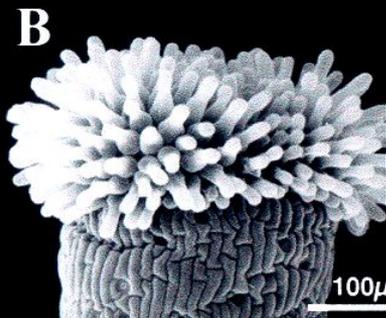
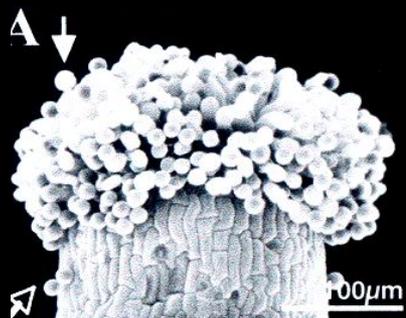
- Самый совершенный метод на настоящий момент
- Требует генетической кухни (трансформация)
- Подходит для хорошо изученных видов



# Так что же лучше?

Красители	Антитела	Белки
<ul style="list-style-type: none"><li>• Относительно просты в применении (окрашивание)</li><li>• Не требуют предварительной подготовки</li><li>• Возможность работы с живым объектом</li><li>• Ограниченный спектр красителей (нельзя смотреть локализацию белков)</li><li>• Выцветают</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Относительно трудны в применении (фиксация, пермеабиллизация, инкубация с АТ)</li><li>• Требуется выделения антигена и производства антител с помощью животных</li><li>• Только для фиксированного препарата</li><li>• Можно смотреть локализацию белков</li><li>• Нет сенсоров параметров гомеостаза</li><li>• Выцветают</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Просты в применении, когда растения уже готовы</li><li>• Требуют предварительной генетической модификации объекта</li><li>• Соответственно, подходят для модельных объектов, геном которых известен</li><li>• Трансформация может оказаться не стабильной</li><li>• Экспрессируются не во всех тканях и могут слабо светить</li><li>• Самый широкий спектр применения: белки и показатели гомеостаза</li><li>• Не выцветают</li></ul>

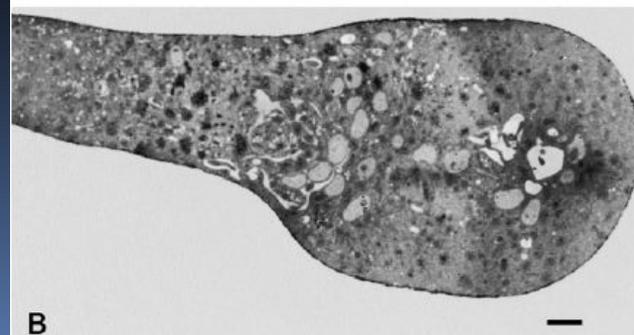
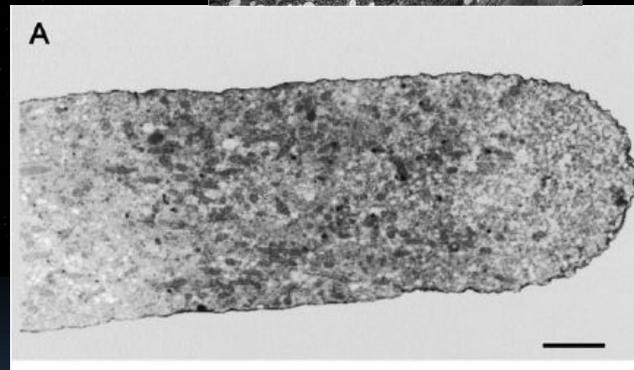
# Электронная микроскопия



■ Сканирующая

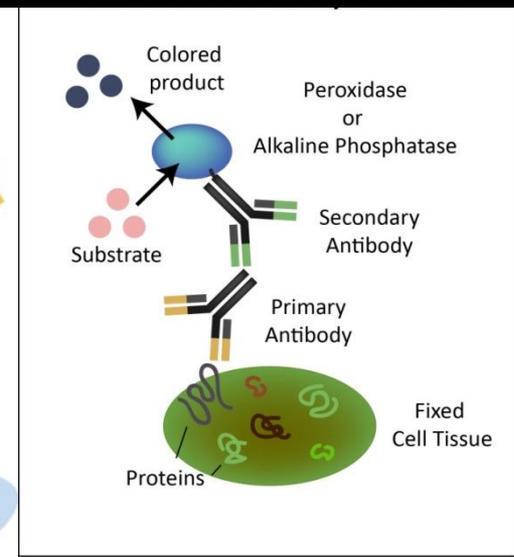
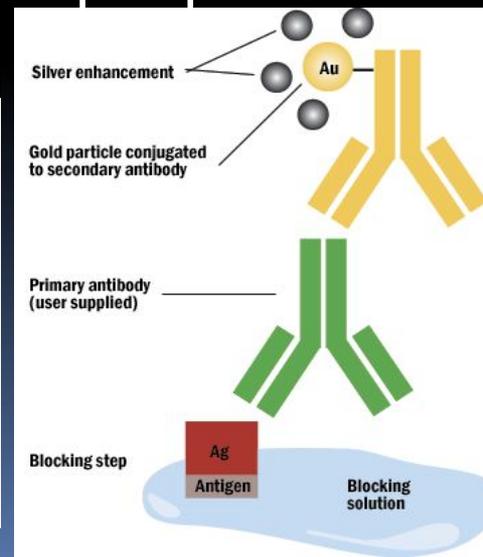
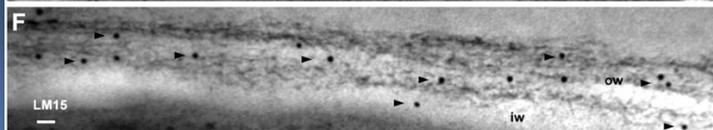
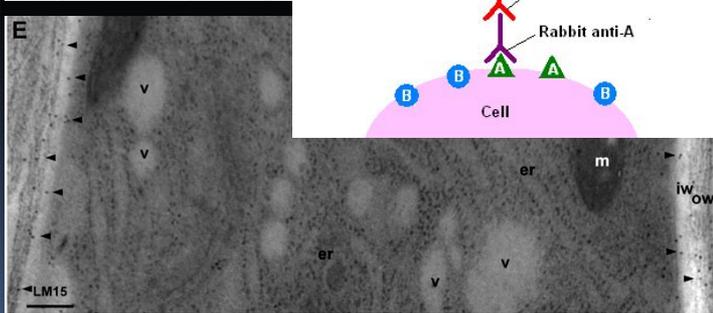
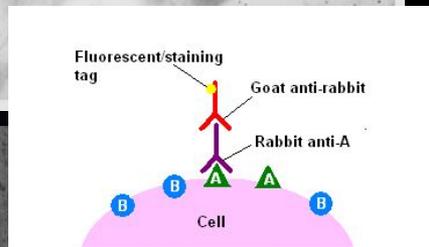
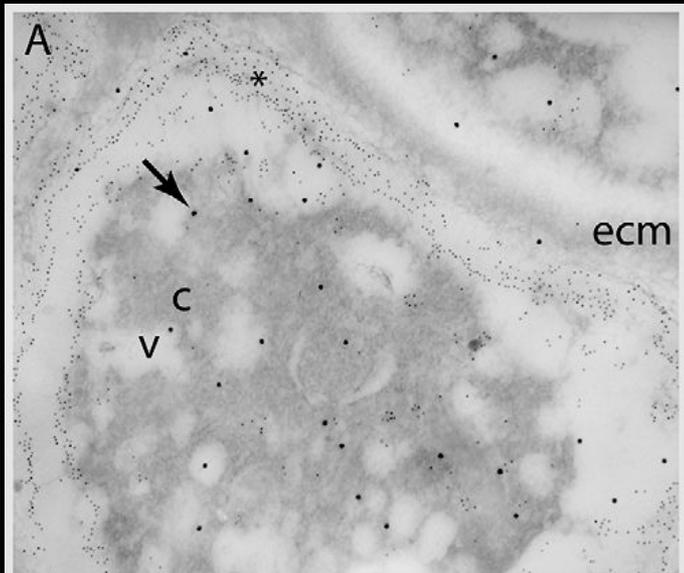


■ Трансмиссионная



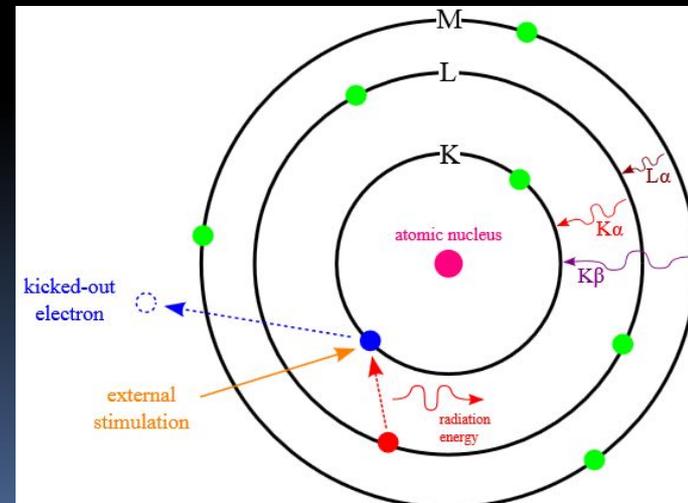
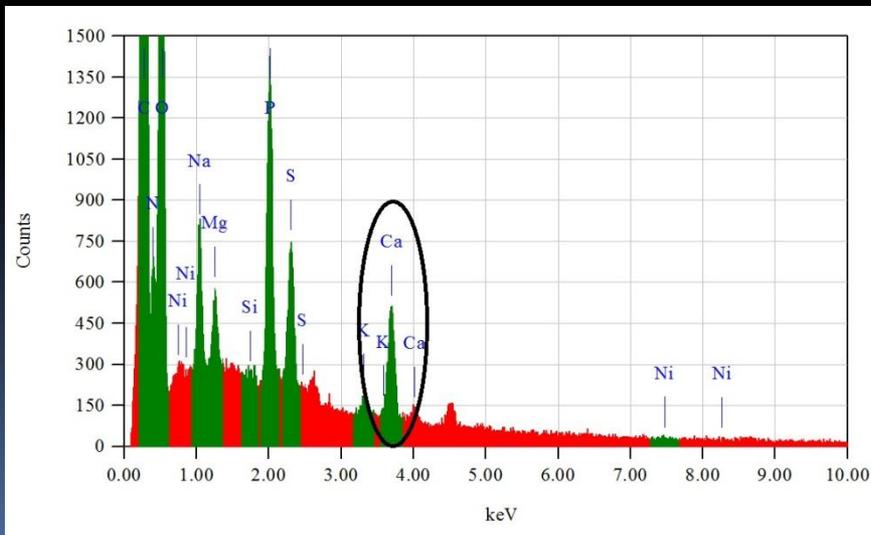
# ИММУНОЦИТО/ГИСТО/ХИМИЯ

- С появлением совершенных методов флуоресцентной микроскопии метка на ТЭМ используется всё реже, т.к. требует трудоёмкой пробоподготовки и трудна в интерпретации.
- Но! ЭМ – это совсем другое разрешение



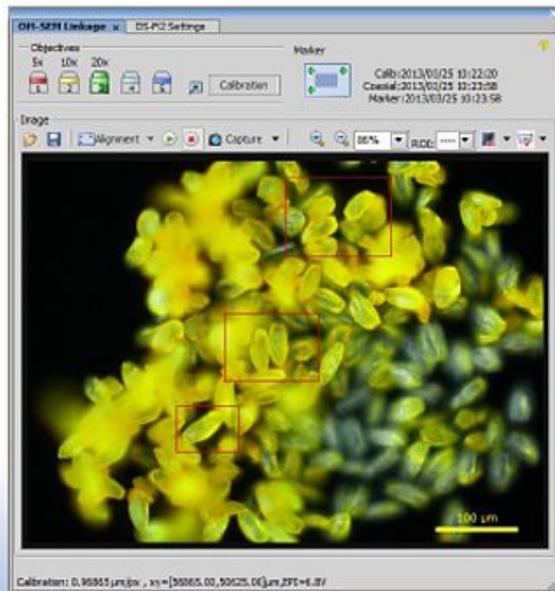
# Рентгеноспектральный микроанализ

- РМА (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) представляет собой гибрид ЭМ и элементного анализ.
- Анализируется спектр, получаемый с выбранного участка препарата, который облучается мощным лучом.

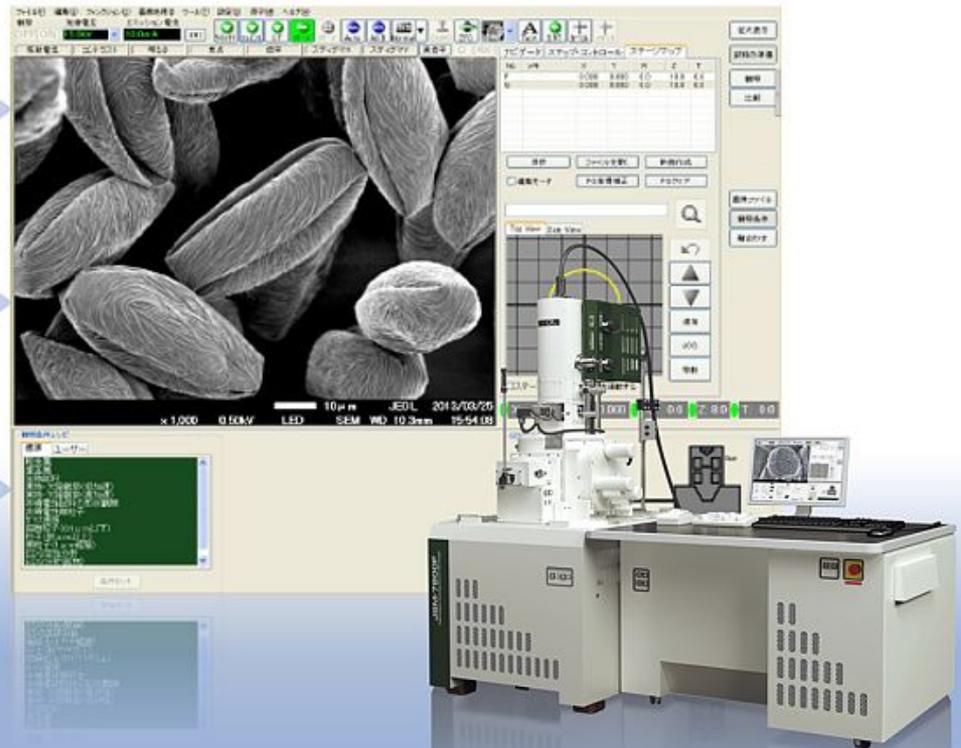


# Correlative microscopy: два взгляда на один препарат

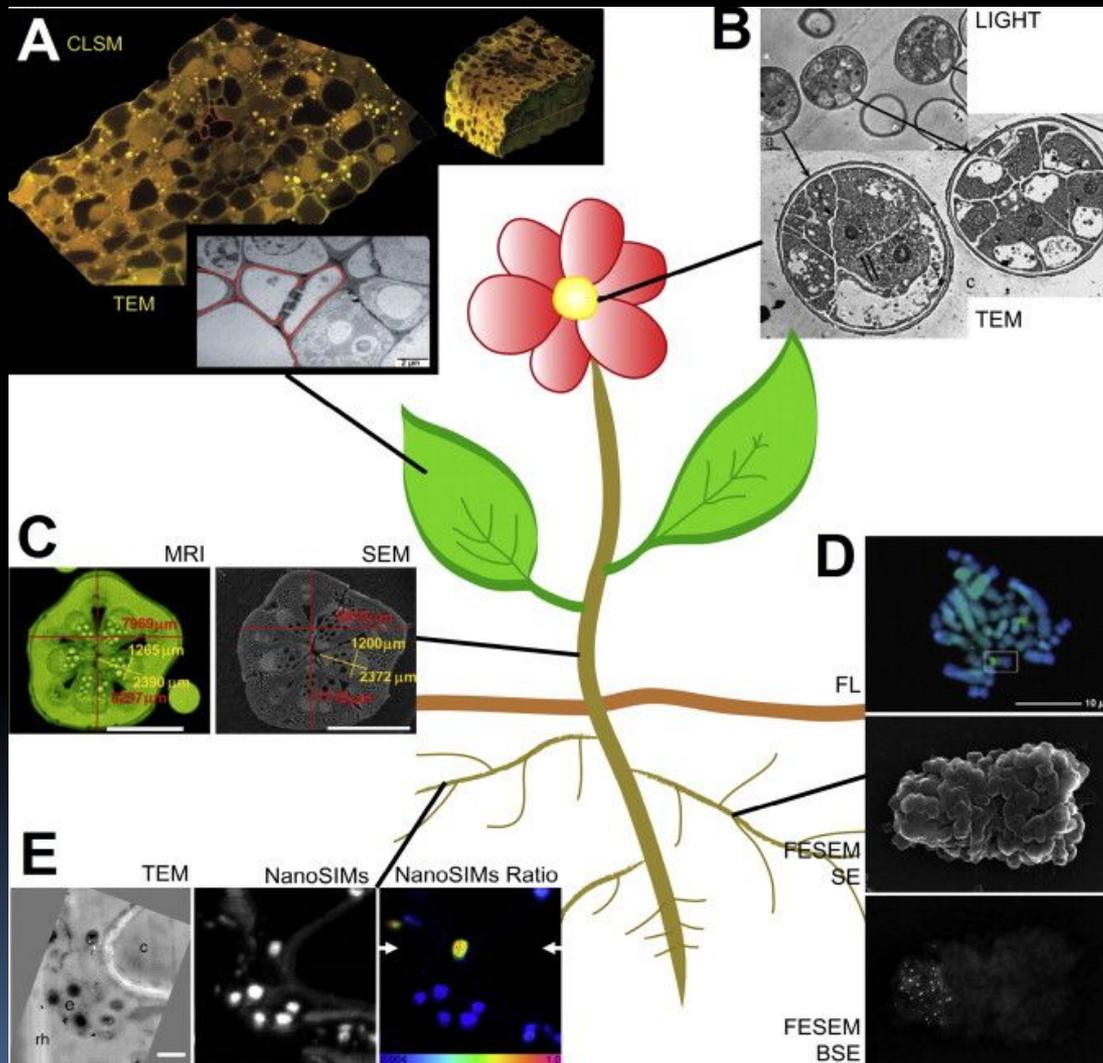
Optical Microscope



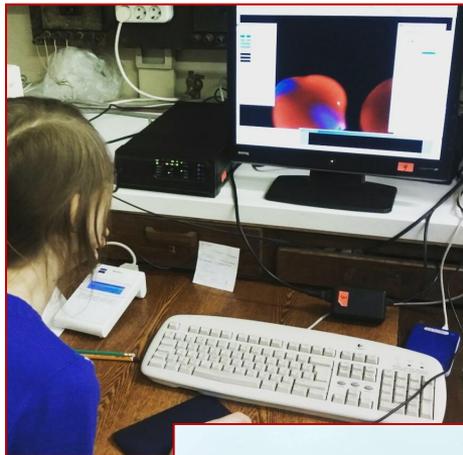
Scanning Electron Microscope



# Что мы можем увидеть? Всё!



# Группа физиологии мужского гаметофита



Саша, магистр 1 года



Аня, бакалавр

Настя, магистр 2 года



Никита Михайлович, аспирант 4 года



Группа в контакте: <http://vk.com/club83308044>

