

СПОСОБ ЦИТОАНАТОМИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Дубровский Максим Леонидович¹,

к. с.-х. н., доцент кафедры биотехнологий,
селекции и семеноводства с.-х. культур;

Папихин Роман Валериевич,

к. с.-х. н., доцент кафедры биотехнологий,
селекции и семеноводства с.-х. культур;

Кирина Ирина Борисовна,

к. с.-х. н., зав. кафедрой биотехнологий,
селекции и семеноводства с.-х. культур;

Титова Лариса Викторовна,

к. с.-х. н., доцент кафедры биотехнологий,
селекции и семеноводства с.-х. культур;

Белосохов Федор Григорьевич,

к. с.-х. н., доцент кафедры биотехнологий,
селекции и семеноводства с.-х. культур,

Мичуринский государственный аграрный университет,
г. Мичуринск, Россия

Аннотация: разработан и апробирован метод морфологического и анатомического анализа пыльцевых зерен растений разных таксономических групп с помощью люминесцентной микроскопии. Для их окрашивания используют комплексный флуоресцентный краситель, состоящий из 20 объемных частей 0,00001%-ного водного раствора Ноеchst 33258 и 1 части 2%-ного спиртового раствора пиронина Б.

Ключевые слова: люминесцентная микроскопия, флуорохромы, пыльца, апертуры, цитоанатомический анализ.

¹ Дубровский М.Л., element68@mail.ru; Папихин Р.В., rom10@mail.ru

Генеративная сфера имеет важнейшее значение в жизнедеятельности растений. Чередование гаметофитного и спорофитного поколений в жизненном цикле растений оказывается возможным только благодаря образованию генеративных клеток и их участию в процессе оплодотворения [3, 4]. Вследствие рекомбинации генов в процессе мейоза при микро- и макроспорогенезе, а также случайного характера слияния рекомбинантных мужской и женской гамет при оплодотворении оказывается возможным появление гибридного потомства, обладающего значительным генетическим разнообразием и тем самым служащего исходным материалом для отбора – естественного в природной среде или направленного по хозяйственно-биологическим признакам в селекционном процессе [1, 5, 6, 11, 12].

В настоящее время существуют различные способы цитоанатомического изучения пыльцы растений. Одним из эффективных методов ее исследования является люминесцентная микроскопия, которая предполагает окрашивание пыльцы флуоресцентными красителями (флуорохромами) с последующим анализом ее флуоресценции, индуцированной падающим светом определенного диапазона длин волн. Для микропрепаратов пыльцы растений наиболее часто применяют такие флуорохромы, как акридиновый оранжевый, анилиновый синий, диацетат флуоресцеина, примулин [2, 7, 8, 10], которые способны к избирательному окрашиванию структур пыльцевых зерен, позволяющему повысить разрешающую способность их цитоанатомической диагностики. Однако некоторые из этих красителей не обеспечивают достаточной контрастности препаратов пыльцы, что не позволяет провести быстрый анализ ее морфологических особенностей.

С целью совершенствования методик цитологического изучения растений нами был разработан и апробирован прием морфологического и анатомического анализа пыльцевых зерен с помощью люминесцентной микроскопии. Это имеет важное научное и практическое значение, так как позволяет комплексно изучить количественные и качественные показатели мужского гаметофита растений, косвенно свидетельствующие о

функционировании их генеративной сферы. Генотипы, характеризующиеся высоким морфологическим качеством пыльцы, как правило, характеризуются наименьшим количеством нарушений микроспорогенеза. Особенно это важно для выявления нарушений в генеративной сфере растений при их интродукции, а также у отдаленных гибридов и полиплоидных форм.

На основе использования флуоресцентного красителя оригинального состава нами был разработан способ оценки морфологии пыльцевых зерен растений (патент РФ на изобретение № 2563356), заключающийся в их окрашивании и индукции флуоресценции в падающем свете с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа. Предварительно готовят красящий раствор, состоящий из 20 объемных частей 0,00001%-ного водного раствора красителя Hoechst 33258 и 1 части 2%-ного спиртового раствора пиронина Б, и хранят его в холодильнике до применения.

Hoechst 33258, или бисбензимидаз Н 33258 (Bisbenzimidazole Н 33258) – флуоресцентный краситель состава $C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl \cdot 5H_2O$ с молекулярной массой $M_r=623,96$. В цитологических и гистологических исследованиях часто применяется для окрашивания ядер и хромосом, что обусловлено его связыванием с ДНК, максимум его эмиссии составляет 465 нм при длине волны возбуждающего света 360 нм. Несвязанный с ДНК (т.е. чистый) раствор Hoechst 33258 имеет зеленую флуоресценцию с максимумом эмиссии в диапазоне 510-540 нм и способен контрастировать оболочку клеток растений, что было установлено при изучении первичных растительных клеточных стенок [9], – данное свойство Hoechst 33258 было использовано в нашем методе.

Ранее флуоресцентные красители пиронин Б и Hoechst 33258 не применяли для окрашивания оболочек пыльцевых зерен ни в одной из существующих цитологических методик. При окрашивании пыльцы каждым из данных флуорохромов в отдельности контрастной картины удовлетворительного качества не наблюдается. Только совместное применение пиронина Б и Hoechst 33258 при окрашивании пыльцы позволяет получить

контрастные люминесцентные изображения, обладающие приемлемой для морфоцитологического анализа четкостью. При этом через окрашенную пиронином Б экзину становятся невидимыми ядра пыльцы, что снижает вероятность их ошибочной идентификации в качестве апертур.

Для приготовления микропрепарата выделенную из пыльников и слегка подсушенную пыльцу растений окрашивают на предметном стекле в капле красителя, накрывают покровным стеклом, выдерживают в течение 5-30 мин. до контрастного окрашивания. Цитологический анализ пыльцы проводят с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа в диапазоне длин волн возбуждающего света 340-380 нм и с использованием запирающего фильтра, пропускающего длинноволновую часть спектра более 510 нм. Благодаря эпиллюминесценции наблюдают контрастное избирательное окрашивание оболочки пыльцевых зерен – желто-зеленый оттенок апертур, обусловленный флуоресценцией несвязанного с ДНК раствора Hoechst 33258, на общем оранжево-красном фоне экзины, окрашенной пиронином Б. При необходимости производят фотодокументирование полученных изображений окрашенных пыльцевых зерен, видимых в поле зрения микроскопа.

Данный метод позволяет за небольшой промежуток времени изучить несколько морфологических признаков пыльцевых зерен – общие линейные размеры или диаметр; количество в оболочке ростовых пор (апертур), их тип, размеры, взаимное расположение и возможные аномалии их морфологии. Пыльцевые зерна мелкой фракции, в большинстве являющиеся гипоанеуплоидными, окрашиваются в насыщенно-красный цвет без флуоресценции апертур и выделяются среди общего количества морфологически нормальной пыльцы. С помощью разработанного красителя возможна диагностика апертур у пыльцы различных сельскохозяйственных культур, в том числе плодовых и ягодных растений, для выявления их морфологических аномалий, что является косвенным признаком предшествующих нарушений микроспорогенеза и может свидетельствовать о потенциальных нарушениях дальнейшего прорастания пыльцевых трубок.

Экспериментально установлена возможность применения данного способа окрашивания препаратов пыльцевых зерен у растений разных систематических групп – как дикорастущих, так и возделываемых человеком: зерновые (на примере озимой ржи), плодовые (яблоня), ягодные (смородина), цитрусовые (лимон), цветочно-декоративные культуры (лилия, бегония). Универсальность предлагаемого метода связана с единым принципом морфоанатомического строения пыльцы покрытосеменных растений и общим принципом действия используемых красителей на окрашиваемые структуры пыльцевого зерна. При использовании данного способа анализа пыльцевые зерна с одной апертурой – однопоровые и однобороздные – приобретают наиболее четкую картину окрашивания. Многоапертурная пыльца имеет более информативное изображение в полярной проекции вследствие отображения всех апертур, в экваториальной проекции возможно наблюдение лишь части апертур. Тем не менее данный способ позволяет с минимальными затратами времени изучать особенности апертур у пыльцевых зерен различных типов, принадлежащих растениям разных систематических групп.

Предлагаемый способ может иметь важное значение для селекции растений при определении морфологического качества пыльцевых зерен у выборки генотипов как одного из косвенных признаков нормального протекания процесса микроспорогенеза, а также уровня ploидности исследуемых растений. Количество апертур в оболочке пыльцевых зерен – один из детерминированных на генетическом уровне маркеров уровня ploидности у растений одного таксона. При кратном увеличении базового числа хромосом генотипа возрастает количество апертур в его пыльцевых зернах. Вследствие этого, данный признак часто используют для предварительного отбора экспериментально полученных полиploидных форм из всей выборки подвергаемого полиploидизации растительного материала одного вида, сорта или генетической линии.

При использовании данного метода окрашивании отмечены сходные аномалии в количестве, взаимном расположении и размерах апертур у

пыльцевых зерен триплоидных генотипов яблони домашней *Malus domestica* L. (на примере сорта Рождественское, $2n=3x=51$) и вишни обыкновенной *Cerasus vulgaris* Mill. (на примере элитной формы Восторг, $2n=3x=24$). Пыльца данных триплоидов из-за нарушений при ее образовании отличается наличием 3-6 апертур (при норме 3 шт.) в форме борозд различной ширины, удаленных на различном расстоянии друг от друга и в отдельных случаях соединенных между собой тонкими поперечными бороздами (рис. 1).

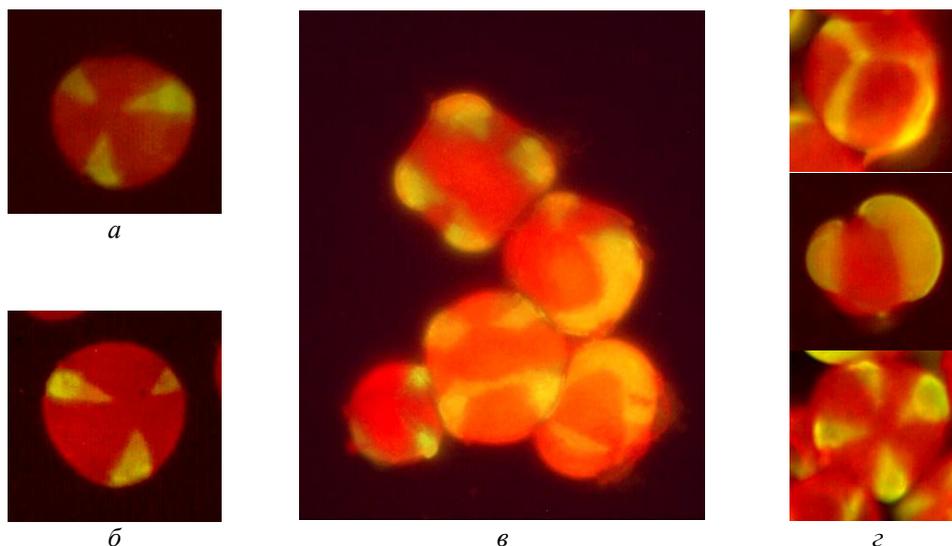


Рисунок 1 – Флуоресцентное окрашивание пыльцы форм яблони и вишни разного уровня плоидности:

a – тетраплоидный сорт вишни Владимирская ($2n=4x=32$); *б* – диплоидный сорт яблони Антоновка обыкновенная ($2n=2x=34$); *в* – триплоидная форма вишни Восторг ($2n=3x=24$); *г* – триплоидный сорт яблони Рождественское ($2n=3x=51$)

Таким образом, разработанный метод позволяет ускорить анализ морфологии пыльцевых зерен растений разных систематических групп, их размеров и характера расположения апертур благодаря получению контрастных изображений при эпифлуоресценции микропрепаратов.

Список литературы

1. Анализ общей антиоксидантной активности пыльцы генотипов груши и вишни в связи с показателями ее экологической устойчивости / М.Л. Дубровский, О.Ю. Дубровская, Р.Е. Кириллов, А.В. Кружков // Плодоводство и ягодоводство России. - 2017. - Т. 48. - № 1. - С. 87-91.
2. Воронова О.Н., Гаврилова В.А. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в

селекционной работе // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – № 180 (1). – С. 95-104.

3. Дубровский М.Л. Устойчивость пыльцы генотипов груши, вишни и черешни к катионам свинца в условиях *in vitro* / М.Л. Дубровский // Плодоводство и виноградарство Юга России. - 2016. - № 41 (5). -С. 47-58.

4. Дубровский М.Л. Сравнительный анализ жизнеспособности пыльцы генотипов земляники / М.Л. Дубровский, И.В. Лукьянчук // Сб.: Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XIV Международной научной конференции, 2017. - С. 306-308.

5. Дубровский М.Л. Экзогенное влияние низкомолекулярных антиоксидантов на функциональную активность пыльцы груши и вишни при осмотическом стрессе / М.Л. Дубровский // Сб.: Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XIV Международной научной конференции, 2017. - С. 611-614.

6. Изучение функциональной активности пыльцы клоновых подвоев яблони / Р.В. Папихин, М.Л. Дубровский, А.В. Кружков, Д.О. Горлов // Селекция и сорторазведение садовых культур. - 2019. - Т. 6. - № 2. - С. 63-66.

7. Методические рекомендации по применению цитологических методов в плодоводстве / Под общ. ред. Н.П. Романовой. – М., 1988. – 52 с.

8. Морфометрический анализ пыльцевых зерен клоновых подвоев яблони / М.Л. Дубровский, А.В. Кружков, Н.Л. Чурикова, Р.В. Папихин, Д.О. Горлов // Селекция и сорторазведение садовых культур. - 2019. - Т. 6. - № 2. - С. 16-19.

9. Hernandez L.F. et al. Fluorescent staining of primary plant cell walls using bis-benzimide (33258 Hoechst) fluorochrome // Stain Technol. – 1988. – Vol. 63. – P. 190.

10. Atlagić J., Terzić S., Marjanović-Jeromela A. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species // Industrial Crops and Products. – 2012. – Vol. 35. – № 1. – P. 88-91.

11. Papikhin R.V. Cytological features of male gametophyte formation from

distant hybrids *Pyrus* x *Malus* and *Ribes* x *Grossularia* / R.V. Papikhin, M.L. Dubrovsky // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. - 2018. - T. 10. - № 10. - C. 2524-2527.

12. Papikhin R.V. The statistical analysis of cytomorphological traits in the distant apple and pear F1 and F2 hybrids (*Malus* x *Pyrus*) from artificial and spontaneous outcrosses / R.V. Papikhin, M.L. Dubrovsky // Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. "Advances in Intelligent Systems Research". - 2019. - C. 363-367.

METHOD FOR CYTOANATOMICAL ANALYSIS OF PLANT POLLEN BY FLUORESCENT MICROSCOPY

Dubrovsky Maksim Leonidovich,

Candidate of agricultural sciences, Associate professor of the Department of biotechnologies, breeding and seed production of agricultural crops;

Papikhin Roman Valeriyevich,

Candidate of agricultural sciences, Associate professor of the Department of biotechnologies, breeding and seed production of agricultural crops;

Kirina Irina Borisovna,

Candidate of agricultural sciences, Head of the Department of biotechnologies, breeding and seed production of agricultural crops;

Titova Larisa Viktorovna,

Candidate of agricultural sciences, Associate professor of the Department of biotechnologies, breeding and seed production of agricultural crops;

Belosokhov Fedor Grigoriyevich,

Candidate of agricultural sciences, Associate professor of the Department of biotechnologies, breeding and seed production of agricultural crops,

Michurinsk State Agrarian University,
Michurinsk, Russia

Abstracts: The method of morphological and anatomical analysis of pollen grains of plants of different taxonomic groups using fluorescent microscopy was developed and tested. For pollen staining, the complex fluorescent dye is used, consisting of 20 volume parts of a 0.00001% aqueous solution of Hoechst 33258 and 1 part of a 2% alcohol solution of pyronin B.

Keywords: fluorescent microscopy, fluorochromes, pollen, apertures, cytoanatomical analysis.