

## ДОСТОВЕРНОСТЬ МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ КАЧЕСТВА ПЫЛЬЦЫ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ

М.В. Сурсо

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова Уральского отделения Российской академии наук», Россия, 163020, г. Архангельск, пр. Никольский, д. 20

surso@fciarctic.ru

Приведены результаты определения жизнеспособности пыльцы хвойных видов растений косвенными методами. Предложенные методологические подходы позволили исключить возможные ошибочные оценки при интерпретации результатов тестирования жизнеспособности пыльцы. Установлено, что флуоресцентные методы чаще всего завышают фактическую жизнеспособность пыльцы, определенную прямыми методами. Большинство из использованных в опытах флуорохромов малоприспособны для оценки жизнеспособности пыльцы. Визуальная оценка общей и специфичной ферментативной активности пыльцы показала результаты, близкие к ее фактической жизнеспособности. Методы, в основе которых лежит выявление ферментативной активности могут быть рекомендованы для экспресс-диагностики качества пыльцы хвойных растений.

**Ключевые слова:** пыльца, жизнеспособность, хвойные, флуоресценция, ферменты

**Ссылка для цитирования:** Сурсо М.В. Достоверность методов экспресс-диагностики качества пыльцы хвойных растений // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2024. Т. 28. № 1. С. 56–67.  
DOI: 10.18698/2542-1468-2024-1-56-67

Жизнеспособность пыльцы определяется ее способностью к прорастанию в пыльцевые трубки нормальной длины и, преимущественно, выражается долей проросших *in vitro* пыльцевых зерен. Проращивание пыльцы на искусственных средах — прямой и наиболее надежный метод оценки ее качества, имеющий, однако ряд недостатков: субстрат может зарастать мицелием грибов, спорами которых часто заражена пыльца; возникают так называемые «популяционные эффекты» [1]; равномерность высева во многом предопределяется навыками исследователя; требуется проведение продолжительных наблюдений.

### Цель работы

Цель работы — оценка достоверности результатов определения жизнеспособности пыльцы хвойных видов растений косвенными методами.

Косвенные (непрямые) методы определения качества пыльцы приобрели популярность вследствие простоты применения и быстрого получения конечных результатов. Однако они отражают не фактическую жизнеспособность пыльцы, а лишь ее доброкачественность. Связь между доброкачественностью ( $Q$ ), жизнеспособностью ( $V$ ) и фертильностью ( $F$ ) пыльцы можно выразить простым соотношением:  $Q \geq V \geq F$ .

Наибольшее распространение получили косвенные методы, основанные на выявлении в пыльце активности ферментов: пероксидазы [2, 3],

сукцинатдегидрогеназы [4], галактозидазы [5] и др. Многие авторы, использовавшие эти методы в своих исследованиях, отмечали несколько завышенные, по сравнению с традиционным проращиванием, результаты [6, 7], другие считают их не вполне надежными и не имеющими положительной корреляции с тестами на проращивание *in vitro* [8, 9]. Методы, основанные на окрашивании пыльцы традиционными гистологическими красителями [10–13], также чаще всего завышают результаты и лишь дают представление об особенностях морфологической структуры пыльцевых зерен. Иногда косвенные методы остаются единственно возможными при определении качества пыльцы, например, лиственницы (*Larix sibirica* Ledeb.), проращивание которой затруднено из-за длительного латентного периода [14].

Широкое распространение приобрели люминесцентные методы определения качества пыльцы растений. Наиболее популярными флуоресцентными красителями на настоящее время остаются акридиновый оранжевый [15], флуоресцеин диацетат [16, 17] и его модификации и некоторые другие. С развитием техники флуоресцентной микроскопии этот перечень постоянно пополняется.

Для оценки качества пыльцы, наряду с визуальными можно использовать методы, основанные на корреляции физико-химических свойств протоплазмы пыльцы с ее фактической жизнеспособностью [18].

Основную проблему при интерпретации результатов оценки качества пыльцы косвенными методами представляет отсутствие четких критериев селективности красителей к пыльце с разной жизнеспособностью. Использование в качестве контроля образцов пыльцы, некротированной термическим шоком или химическим воздействием не вполне корректно, поскольку такие воздействия могут вызывать деформацию внутренних структур пыльцевого зерна и дезинтеграцию высокомолекулярных соединений.

В настоящей работе в качестве контроля селективности красителей была использована пыльца различных видов хвойных растений, которая хранилась в течение длительного (от 26 до 33 лет) времени при температуре +1...+2 °С в эксикаторах над безводным хлоридом кальция. При таких условиях пыльца, например, сосны может сохранять жизнеспособность в течение 10 лет и более (табл. 1). Через 15 лет пыльца полностью утрачивает способность к прорастанию, хотя все ее морфологические структуры сохраняются.

Т а б л и ц а 1

**Результаты проращивания пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) после разных сроков хранения**

**Results of common pine (*Pinus sylvestris* L.) pollen germination after different storage periods**

Продолжительность хранения, лет	Проращивание на минеральной среде Нигаарда		Проращивание на агаровом субстрате (концентрация сахарозы 10 %)	
	M ± mM	CV, %	M ± mM	CV, %
0	66,4 ± 5,4	12,6	91,5 ± 2,5	5,4
2	14,0 ± 2,5	21,4	59,1 ± 6,3	18,5
3	0	—	36,9 ± 1,8	6,5
4	0	—	28,6 ± 7,0	34,5
6	0	—	20,2 ± 0,9	8,9
10	0	—	13,6 ± 1,4	7,2
15	0	—	0	—

Такой методологический подход позволил исключить возможные ошибочные оценки при интерпретации результатов тестирования жизнеспособности пыльцы.

**Материалы и методы**

Проращивание пыльцы хвойных видов растений проводили в чашках Петри на среде, содержащей 1%-й агар и 5- или 10%-ю сахарозу в термостате при температуре +26,5 °С. Продолжительность проращивания свежесобранной пыльцы ели составила 72 ч, сосны — 96, можжевельника — 168 ч. Пыльца сосны и ели считалась проросшей, если длина пыльцевой

трубки более чем в 2 раза превышала высоту тела зерна. Жизнеспособность пыльцы можжевельника определялась как сумма половины количества пыльцевых зерен, сформировавших внутри гидрофильной капсулы двухклеточный микрогаметофит тубелькообразной формы, и всего количества пыльцевых зерен, сформировавших пыльцевые трубки, кончики которых вышли из гидрофильной капсулы наружу. Сроки проращивания старой пыльцы не регламентировались и определялись темпами развития микрофлоры на поверхности среды. Проращивание завершали после существенного зарастания среды мицелием при отсутствии видимых признаков жизнеспособности пыльцы.

Растворы красителей для флуоресцентной микроскопии готовили с учетом рекомендаций компаний-производителей и литературных данных. Окрашенные препараты пыльцы просматривали и фотографировали на люминесцентном микроскопе Altam Lum 1 Led с соответствующими светофильтрами.

**Принятые обозначения:**

- DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол;
- FDA — флуоресцеин диацетат;
- EthD-III — этидиум гомодимер III;
- Hoechst 33342 — тригидрат тригидрохлорида 2'-[4-этоксифенил]-5-[4-метил-1-пиперазинил]-2,5'-би-1H-бензимидазола;
- DMCO — диметилсульфоксид;
- МТТ — 3-(4, 5-диметилтиазолил 1-2) 2, 5-дифенил-тетразолий;
- ADH — алкогольдегидрогеназа (EC 1.1.1.1.);
- GDH — глутаматдегидрогеназа (EC 1.4.1.2.);
- MDH — малатдегидрогеназа (EC 1.1.1.37.);
- SkDH — шикиматдегидрогеназа (EC 1.1.1.25.);
- АО — акридиновый оранжевый.

Стоковый 14,3 мМ раствор DAPI готовили растворением 5 мг этого красителя в 1 мл диметилформамида. Для приготовления промежуточного 300 мкМ раствора DAPI к 2,1 мкл стокового раствора добавляли 100 мкл фосфатного буфера, pH 7,4. Рабочий раствор 300 нМ DAPI готовили разбавлением промежуточного раствора в фосфатном буфере в пропорции 1:1000. Окрашивание пыльцы проводили в рабочем растворе в течение нескольких минут в темноте при комнатной температуре.

Стоковый раствор флуоресцеин диацетата (5 мг FDA в 1 мл ацетона) хранили при температуре -20 °С. Перед использованием стоковый раствор FDA разбавляли деионизированной дистиллированной водой в соотношении 1:1000. Окрашивание пыльцы проводили на вращающемся шейкере в темноте при комнатной температуре в течение 10...20 минут.

Стоковый раствор Hoeschst 33342 готовили растворением 10 мг красителя в 1 мл ДМСО. Для приготовления рабочего раствора стоковый раствор Hoeschst 33342 разбавляли фосфатным буфером, рН 7,4 в соотношении 1:10 000. Окрашивание пыльцы производили в рабочем растворе красителя в течение 20...30 мин в темноте при температуре 37 °С. Перед просмотром пыльцу трижды промывали в фосфатном буфере, нагретом до 37 °С.

Стоковый раствор акридинового оранжевого представлял 0,1%-й водный раствор красителя. Перед использованием его разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:10 000. Для окрашивания пыльцы к объему водной суспензии пыльцы добавляли равный объем рабочего раствора АО. Окрашивание проводили в темноте в течение 10...20 мин при комнатной температуре на вращающемся шейкере.

Рабочий раствор кальцеина АМ готовили растворением 10 мкл заводского препарата кальцеина АМ (Biotium), нагретого до комнатной температуры, в 10 мл фосфатного буфера. Окрашивание пыльцы проводили в течение 30...40 мин в темноте при температуре 37 °С. Перед просмотром пыльцу трижды промывали в фосфатном буфере, нагретом до 37 °С.

Для оценки числа апоптотических и некротических пыльцевых зерен использовали многокомпонентный препарат Apoptotic, Necrotic and Healthy Cells (Biotium). Однократный связывающий буфер готовили добавлением к одному объему пятикратного связывающего буфера аннексина V четырех объемов дистиллированной воды. В исследуемый образец пыльцы добавляли 100 мкл связывающего буфера, 5 мкл аннексина V CF ® 488A и 5 мкл EthD-III. Краситель Hoeschst 33342 в состав препарата не вводили. Суспензионную культуру инкубировали в течение 15...30 мин в темноте при комнатной температуре на вращающемся шейкере.

Для выявления активности ферментов: ADH, GDH, MDH и SkDH в пыльце готовили инкубирующие растворы по протоколам для изоферментного анализа [19]. Навески реактивов при этом увеличивали вдвое. К водной суспензии пыльцы добавляли равный объем инкубирующего раствора. Полученную смесь инкубировали в течение 2–3 ч в темноте на вращающемся шейкере при температуре 35 °С. Для выявления общей активности дегидрогеназ пыльцу инкубировали в таких же условиях в течение 1–2 ч в 5%-м водном растворе сахарозы, содержащем тетразолиевый краситель МТТ в концентрации 0,2 мг/мл. Затем каплю суспензии, содержащей небольшое количество пыльцы, переносили на предметное стекло и высушивали в термостате при температуре 35 °С.

На высушенный образец наносили каплю 50%-го глицерола, пыльцу равномерно распределяли по поверхности предметного стекла и накрывали покровным стеклом [20–22]. По нашим наблюдениям, процедура высушивания препаратов при окрашивании пыльцы красителем МТТ является излишней. К тому же при этом часто происходит деформация внутренних структур пыльцевых зерен, поэтому в дальнейшем ограничились инкубированием пыльцы в растворе красителя. Препараты, окрашенные на ферменты, просматривали и фотографировали на прямом лабораторном микроскопе Axio Scope A1 (Zeiss).

## Результаты и обсуждение

Примеры флуоресценции образцов свежесобранной и старой пыльцы можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.), ели (*Picea abies* L. (Karst.) x *P. obovata* Ledeb.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), окрашенных флуорохромами, приведены в табл. 2–4.

Окрашивание пыльцы флуоресцеин диацетатом широко распространенная процедура для оценки качества пыльцы [23–31]. Метод основан на способности FDA проникать сквозь мембраны внутрь живых клеток и в его преобразовании во флуоресцирующие производные [32].

Доброкачественная свежесобранная пыльца ( $q_2$ ) сосны, ели и можжевельника имела яркую флуоресценцию всего тела зерна или его центральной части. В сомнительных случаях ( $q_1$ ) слабая флуоресценция наблюдалась в центральной части тела зерна, в месте локализации вегетативного ядра (у видов Pinaceae) или ядра микроспоры (у можжевельника). Полное отсутствие флуоресценции свидетельствовало о явно некачественной пыльце. Доброкачественность пыльцы  $Q$  в каждом образце определяли как  $\Sigma (0,5q_1 + q_2)$  [31]. В большинстве случаев результаты проращивания и окрашивания свежесобранной пыльцы красителем FDA оказались весьма близкими (табл. 5).

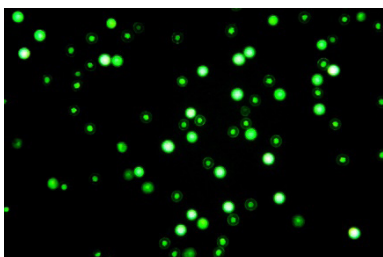
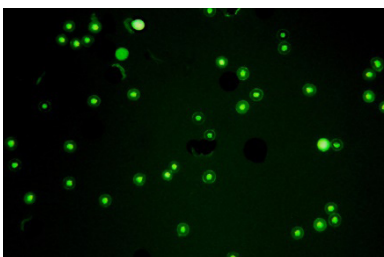
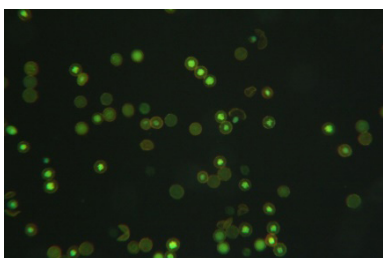
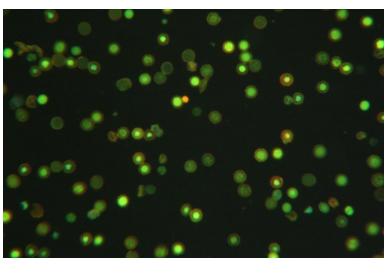
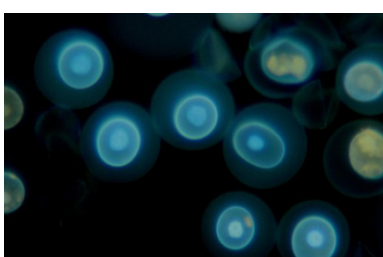
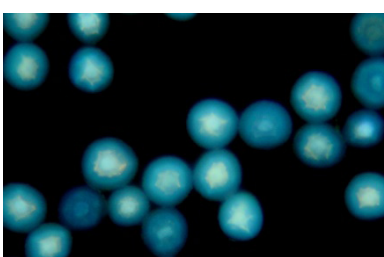
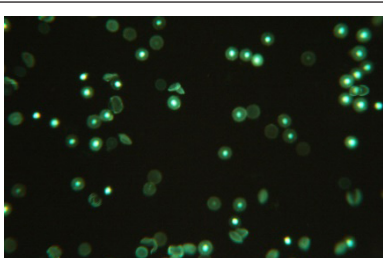
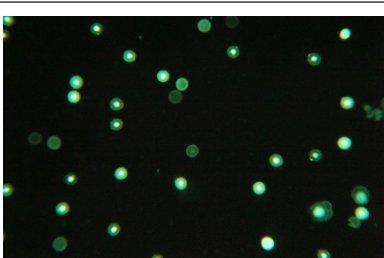
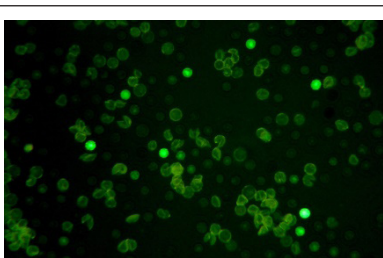
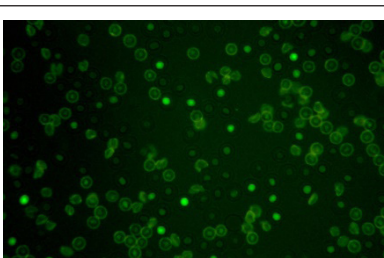
Окрашивание красителем FDA старой (нежизнеспособной) пыльцы показало, что у небольшого числа пыльцевых зерен некоторых видов хвойных растений способность к флуоресценции сохранилась.

Другой флуорохром, который часто используется для оценки качества пыльцы — акридиновый оранжевый, избирательно реагирующий с ДНК и РНК клетки. В концентрациях, необходимых для возбуждения люминесценции, АО обладает минимальной токсичностью, что делает его почти идеальным витальным красителем. По наблюдениям Г.М. Козубова [15], при окрашивании пыльцы сосны акридиновым оранжевым в жизнеспособных пыльцевых зернах наблюдалась

Т а б л и ц а 2

**Характер флуоресценции свежесобранной и старой пыльцы можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.)**

Fluorescence character of freshly collected and old pollen of ground cedar (*Juniperus communis* L.)

Краситель	Свежесобранная жизнеспособная пыльца	Старая нежизнеспособная пыльца
FDA		
Акридиновый оранжевый		
DAPI		
Hoechst 33342		
Кальцеин АМ		

ярко-зеленая флуоресценция ядер и оранжевая — цитоплазмы. У пыльцевых зерен с пониженной жизнеспособностью наблюдалась однотонная зеленовато-желтая флуоресценция ядер и цитоплазмы. Из табл. 2–5 следует, что с годами спо-

собность к флуоресценции структур пыльцевых зерен, окрашенных АО, не снижается и никак не связана с жизнеспособностью пыльцы.


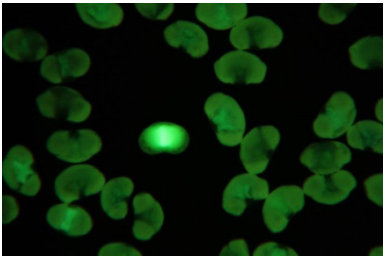
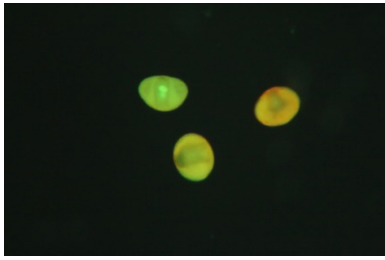
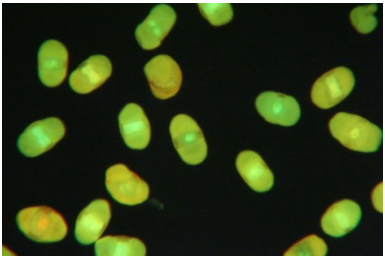
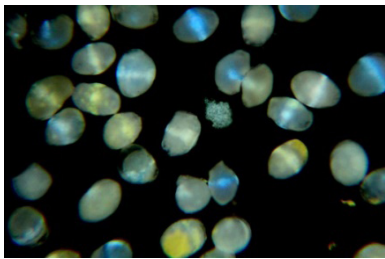
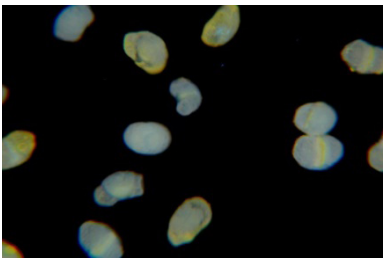
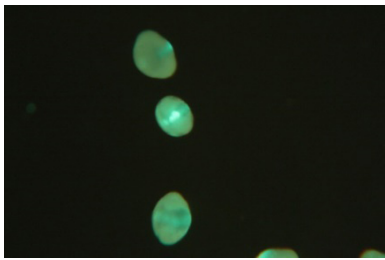
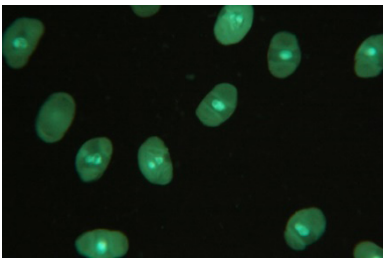
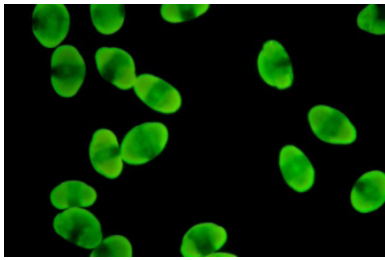
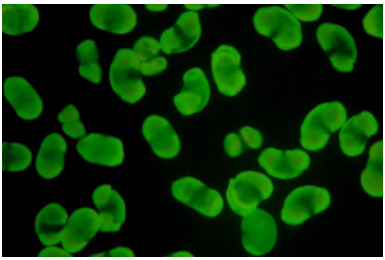
Одним из наиболее популярных ядерных флуоресцентных красителей в настоящее время



Т а б л и ц а 3

**Характер флуоресценции свежесобранной и старой пыльцы ели (*Picea abies* L. (Karst.) x *P. obovata* Ledeb.)**

**Fluorescence character of freshly collected and old pollen of spruce (*Picea abies* L. (Karst.) x *P. obovata* Ledeb.)**

Краситель	Свежесобранная жизнеспособная пыльца	Старая нежизнеспособная пыльца
FDA		
Акридиновый оранжевый		
DAPI		
Hoechst 33342		
Кальцеин AM		

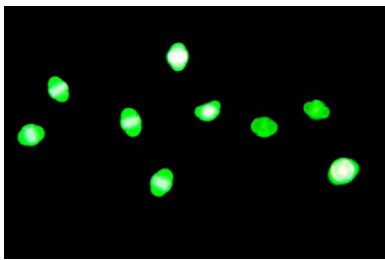
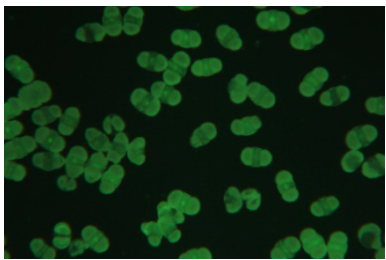
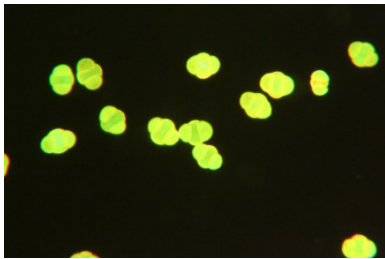
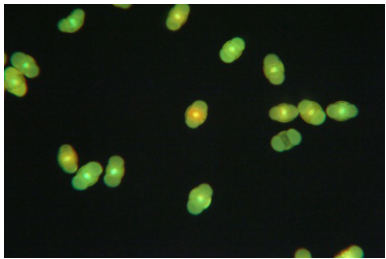
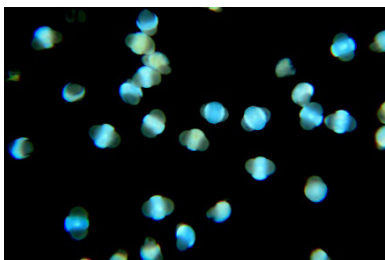
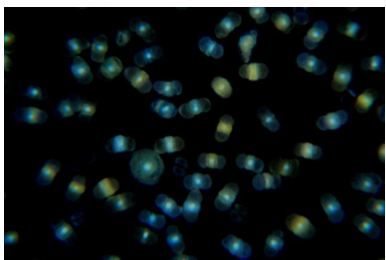
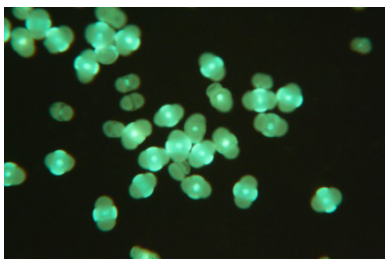
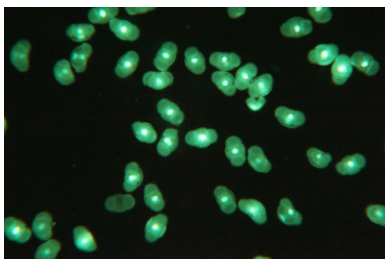
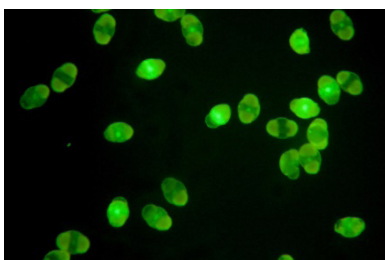
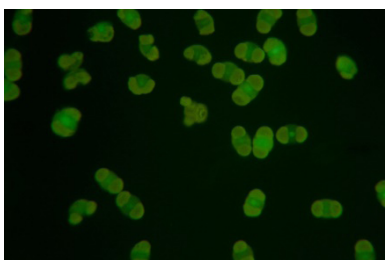
является DAPI. При связывании с ДНК он излучает синюю флуоресценцию [33]. У свежесобранной пыльцы, окрашенной DAPI, наблюдается яркая синяя флуоресценция ядер и цитоплазмы (см. табл. 2–4). Показатели жизнеспособности

свежесобранной пыльцы, полученные путем проращивания и методом окрашивания DAPI довольно близки (см. табл. 5). При окрашивании старой нежизнеспособной пыльцы выявились неоднородные результаты. Пыльцевые зерна

Таблица 4

**Характер флуоресценции свежесобранной и старой пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)**

**Fluorescence character of freshly collected and old pollen of common pine  
сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)**

Краситель	Свежесобранная жизнеспособная пыльца	Старая нежизнеспособная пыльца
FDA		
Акридиновый оранжевый		
DAPI		
Hoechst 33342		
Кальцеин АМ		

сосны обыкновенной и близкой к ней горной сосны сохранили яркую флуоресценцию ядер, тогда как в пыльце ели, пихты, можжевельника, сосен Банка и погребальной ядерная флуоресценция не проявлялась. В старой пыльце можжевельника

проявлялись некрозы ядер микроспор при сохранении флуоресценции цитоплазмы (см. табл. 2).

Другим популярным ядерным красителем является Hoechst 33342, который, связываясь с ДНК, при возбуждении ультрафиолетовым

## Результаты окрашивания пыльцы хвойных видов растений флуорохромами

## Results of pollen staining of coniferous plant species with fluorochromes

Вид	Продолжительность хранения пыльцы, лет	Жизнеспособность фактическая, %	Тест на доброкачественность, %				
			Ноеchst 33342	Акридиновый оранжевый	Кальцеин АМ	FDA	DAPI
<i>Picea abies</i> x <i>P. obovata</i>	0	62,5 ± 9,8	43,4 ± 8,8	37,7 ± 12,0	40,4 ± 14,4	70,2 ± 12,9	61,2 ± 10,1
<i>Pinus sylvestris</i>	0	92,1 ± 2,2	95,5 ± 3,4	64,4 ± 14,4	77,6 ± 12,2	98,0 ± 1,8	90,8 ± 4,4
<i>Juniperus communis</i>	0	66,8 ± 7,7	87,3 ± 7,4	43,8 ± 13,0	23,3 ± 7,8	62,5 ± 14,4	59,9 ± 8,0
<i>Picea abies</i> x <i>P. obovata</i>	30	0	84,4 ± 9,5	56,4 ± 11,9	0	< 0,1	0
<i>Picea obovata</i>	33	0	78,7 ± 11,3	55,5 ± 10,5	0	0	0
<i>Abies sibirica</i>	33	0	23,0 ± 7,8	85,4 ± 11,7	0	0	0
<i>Pinus sylvestris</i>	26	0	93,3 ± 5,4	69,6 ± 13,4	0	0	75,7 ± 11,1
<i>Pinus banksiana</i>	32	0	97,4 ± 2,2	65,4 ± 18,7	33,0 ± 9,4	< 0,1	35,6 ± 7,7
<i>Pinus mugo</i>	26	0	95,5 ± 3,4	75,5 ± 15,5	73,1 ± 15,5	0,6 ± 0,2	88,4 ± 10,4
<i>Pinus</i> x <i>funnebris</i>	26	0	87,4 ± 6,0	43,3 ± 16,4	67,7 ± 17,6	1,1 ± 0,4	0
<i>Pinus sibirica</i>	26	0	67,1 ± 8,9	94,4 ± 2,5	20,5 ± 5,5	0	0
<i>Juniperus communis</i>	26	0	59,5 ± 6,6	44,4 ± 9,3	18,7 ± 6,0	5,5 ± 1,5	0,5 ± 0,2

светом излучает синюю флуоресценцию. Результаты окрашивания свежесобранной и старой пыльцы этим красителем не коррелируют с жизнеспособностью пыльцы, определенной путем проращивания (см. табл. 5). Во всех случаях наблюдался высокий уровень ядерной флуоресценции, что связано с сохранностью ДНК.

Широко используемым маркером для исследования целостности клеточных мембран и количественного определения живых клеток является кальцеин АМ. Как и АО, он не токсичен и в малых концентрациях является идеальным витальным красителем [34, 35]. Результаты, полученные при окрашивании пыльцы этим красителем, неоднозначны (см. табл. 2–5). Так, в старой пыльце ели, пихты и сосны обыкновенной флуоресценция отсутствовала, тогда как в старой пыльце других видов уровень флуоресценции все еще оставался довольно высоким. Корреляция между жизнеспособностью свежесобранной пыльцы, определенной путем проращивания и методом окрашивания кальцеином АМ низкая или средняя.

Гибель клеток происходит в результате двух основных взаимосвязанных процессов: апоптоза и некроза. Апоптоз — это активная, генетически регулируемая стадия дезинтеграции клетки. Чаще всего апоптоз предшествует некрозу, приводящему к разрушению клеточных мембран и органелл клетки. Для количественного опреде-

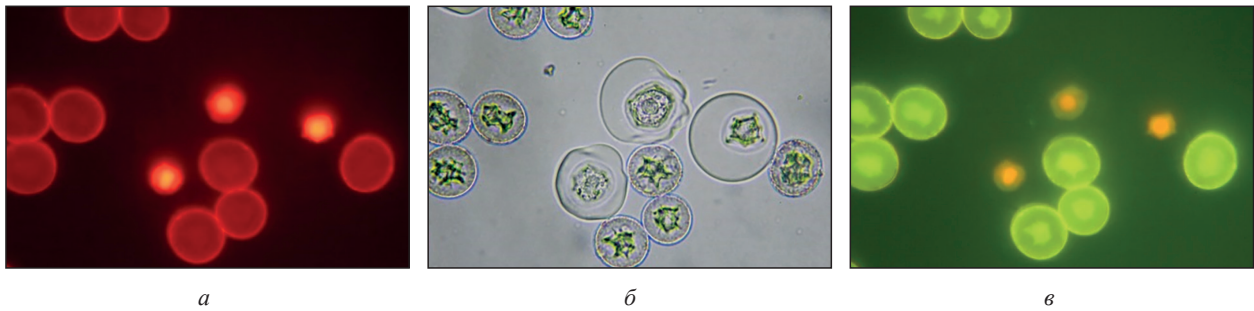
ления апоптотических и некротических пыльцевых зерен в старой пыльце использовали входящие в набор красителей Apoptotic, Necrotic and Healthy Cells (Biotium) аннексин V и EthD-III. Человеческий антикоагулянт аннексин V представляет собой кальций — зависимый фосфолипид — связывающий белок массой 35 кДа, окрашивающий апоптотические клетки в зеленый цвет (рис. 1, в).

Гомодимер этидия III (EthD-III) представляет собой высоко положительно заряженный зонд нуклеиновой кислоты, который непроницаем для живых клеток и ранних апоптотических клеток, но окрашивает некротические клетки и поздние апоптотические клетки красной флуоресценцией (см. рис. 1, а). Выполненное на примере старой (нежизнеспособной) пыльцы можжевельника исследование показало приемлемые результаты при изучении апоптозов и некрозов пыльцевых зерен.

При выявлении в пыльце активности дегидрогеназ (общей или специфичной) с использованием в качестве красителя МТТ цитоплазма и ядра потенциально жизнеспособных пыльцевых зерен окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Нежизнеспособная пыльца остается неокрашенной (рис. 2).

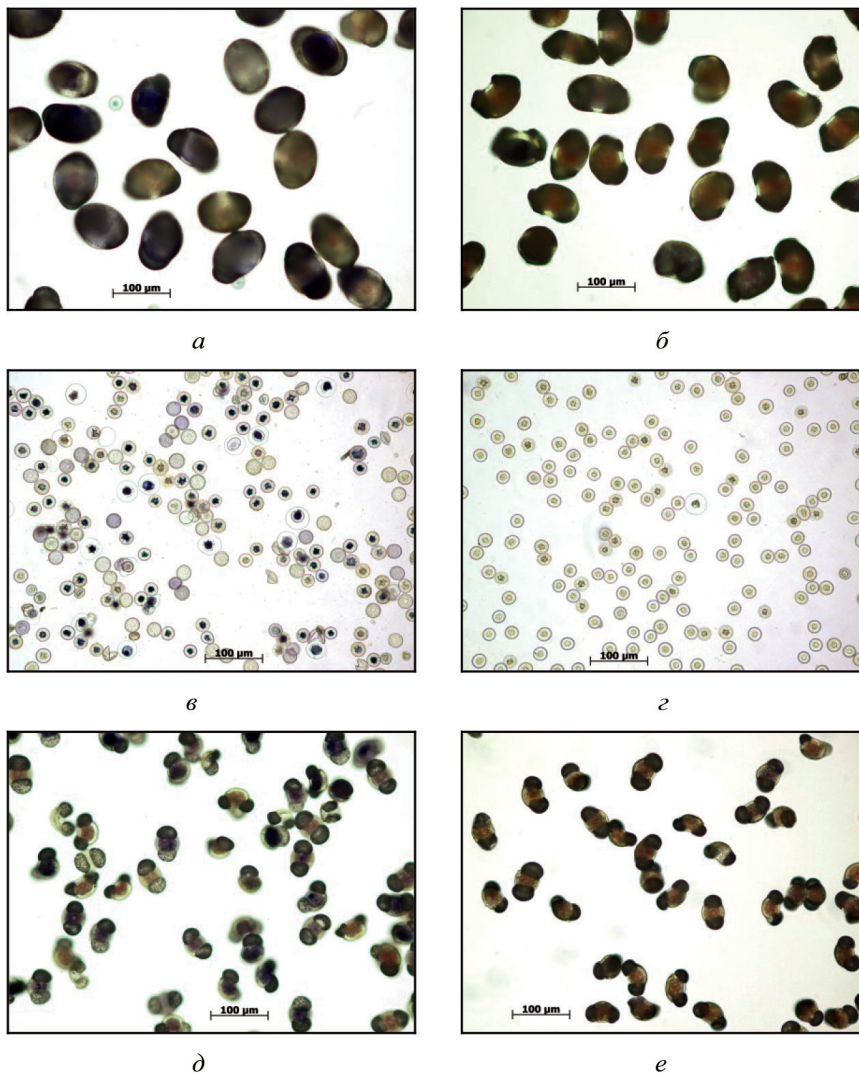
Полученные результаты довольно близки к фактической жизнеспособности пыльцы (табл. 6).





**Рис. 1.** Апоптоз (в) и некроз (а) старой пыльцы можжевельника (окрашивание аннексином V и EthD-III): б — проходящий белый свет; а, в — флуоресценция (а — светофильтр 460...550 нм, в — светофильтр 330...400 нм)

**Fig. 1.** Apoptosis (в) and necrosis (а) of old juniper pollen (staining with annexin V and EthD-III): б — transmitted white light; а, в — fluorescence (а — light filter 460...550 nm, в — light filter 330...400 nm)



**Рис. 2.** Результаты тестирования пыльцы на алкогольдегидрогеназу: а — ель (свежая); б — ель (после 30 лет хранения); в — можжевельник (свежая); г — можжевельник (после 26 лет хранения); д — сосна обыкновенная (свежая); е — сосна обыкновенная (после 26 лет хранения)

**Fig. 2.** Results of pollen testing for alcohol dehydrogenase: а — fir (fresh); б — fir (after 30 years of storage); в — juniper (fresh); г — juniper (after 26 years of storage); д — Scots pine (fresh); е — common pine (after 26 years of storage)



## Результаты тестирования пыльцы на ферменты

## Results of pollen enzyme testing

Вид хвойных растений	Продолжительность хранения пыльцы, лет	Жизнеспособность фактическая, %	Тест на доброкачественность, %		
			ADH	GDH	MTT
<i>Picea abies</i> x <i>P. obovata</i>	0	62,5 ± 9,8	77,5 ± 11,1	49,7 ± 9,4	75,7 ± 10,4
<i>Pinus sylvestris</i>	0	92,1 ± 2,2	87,4 ± 6,1	75,3 ± 7,7	95,5 ± 1,8
<i>Juniperus communis</i>	0	66,8 ± 7,7	59,9 ± 8,0	65,6 ± 8,6	59,6 ± 8,4
<i>Picea abies</i> x <i>P. obovata</i>	30	0	0	0	0
<i>Picea obovata</i>	33	0	0	0	0
<i>Abies sibirica</i>	33	0	0	0	0
<i>Pinus sylvestris</i>	26	0	0	0	0
<i>Pinus banksiana</i>	32	0	0	0	0
<i>Pinus mugo</i>	26	0	0	8,7 ± 4,4	0
<i>Pinus x funebris</i>	26	0	0	14,4 ± 6,5	0
<i>Pinus sibirica</i>	26	0	0	0	0
<i>Juniperus communis</i>	26	0	4,4 ± 2,1	7,2 ± 4,1	0

Остаточная активность ADH в старой пыльце можжевельника и GDH в старой пыльце сосен горной и погребальной и можжевельника сохранилась и после полной утраты жизнеспособности пыльцы. При выявлении в пыльце активности MDH и SkDH часто наблюдалось интенсивное фоновое окрашивание пыльцевых зерен, поэтому эти ферменты были исключены из дальнейшего анализа.

## Выводы

Использование в качестве контроля старой нежизнеспособной пыльцы позволило исключить ошибочные интерпретации результатов тестирования жизнеспособности пыльцы хвойных видов косвенными методами. Флуоресценция пыльцевых зерен хвойных часто никак не связана с их способностью к формированию пыльцевых трубок. Такие флуорохромы, как акридиновый оранжевый, Hoechst 33342, кальцеин АМ мало пригодны для тестирования жизнеспособности пыльцы. Наиболее близкие к фактической жизнеспособности результаты были получены при окрашивании пыльцы флуоресцеин диацетатом. При этом окрашивание FDA чаще всего дает несколько завышенные результаты, особенно при окрашивании пыльцы, имеющую низкую фактическую жизнеспособность. Количественное определение апоптотических и некротических пыльцевых зерен в образцах пыльцы возможно с использованием аннексина V и EthD-III, входящих в набор красителей Apoptotic, Necrotic and Healthy Cells (Biotium). Окрашивание пыльцы на такие ферменты, как алкогольдегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа показало результаты,

весьма близкие к ее фактической жизнеспособности, определенной путем прорастивания *in vitro*. Наиболее близкие к фактической жизнеспособности результаты были получены при выявлении общей активности дегидрогеназ путем окрашивания пыльцы тетразолием MTT. Методы, основанные на выявлении общей и специфичной ферментативной активности можно признать вполне надежным для экспресс-диагностики качества пыльцы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федеральному исследовательскому центру комплексного изучения Арктики Уральского отделения Российской академии наук (№ гос. регистрации — 122011400384-2).

## Список литературы

- [1] Tanaka K., Naganuma S. The pollen germination and pollen tube development in *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. IX. Population effects // Sci. Repts. Nicosaci Univ., 1974, v. 21, no. 2, pp. 71–79.
- [2] Шардаков В.С. Реакция на пероксидазу как показатель жизнеспособности пыльцы растений // Доклады АН СССР, 1040. Т. 26. Вып. 3. С. 273–276.
- [3] King J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability // Stain. Technol., 1960, v. 35, no. 4, pp. 225–227.
- [4] Диакону П. О методе определения жизнеспособности пыльцы при помощи 2,3,5-трифенилтетразолхлорида // Цитология и генетика, 1968. Т. 2. № 5. С. 476–477.
- [5] Rodriguez-Riano T., Dafni A. A new procedure to assess pollen viability // Sex Plant Reprod, 2000, v. 12, pp. 241–244.
- [6] Мауринь А.М., Кауров И.А. Сравнение методов определения жизнеспособности пыльцы древесных пород // Ботанический журнал, 1956. Т. 41. № 1. С. 81–84.
- [7] Кауров И.А. Качество пыльцы и семян интродуцированных дальневосточных древесных пород // Ботанический журнал, 1959. Т. 44. № 8. С. 1162–1170.

- [8] Parfitt D.E., Ganeshan S. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen // Hort Science, 1989. v. 24 (2), pp. 354–356.
- [9] Bolat I., Pirlak L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits // Turkish J. of Agriculture and Forestry, 1999. v. 23, pp. 383–388.
- [10] Петров А.П., Погорелов С.В. К методике окрашивания зрелой пыльцы галлоцианином // Ботанический журнал, 1987. Т. 72. № 9. С. 1269–1270.
- [11] Vižintin L., Bohanec B. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica, 2004, v. 46, pp. 177–183.
- [12] Erdoğan Ü. Determination of pollen quality and quantity in mulberry (*Morus alba* L.) // Pak. J. Bot., 2015, v. 47 (1), pp. 275–278.
- [13] Mendez N.P., Porquis H.C., Sinamban E.B., Acma F.M. Comparative pollen viability and pollen tube growth of two endemic philippine *Etilingera* (Zingiberaceae, Alpinioideae) // Philippine J. of Systematic Biology, 2017, v. 11 (2), pp. 1–9.
- [14] Тренин В.В. Цитозембриология лиственницы. Л.: Наука, 1986. 88 с.
- [15] Козубов Г.М. Люминесцентный метод изучения пыльцы растений // Ботанический журнал, 1967. Т. 52. № 8. С. 1156–1157.
- [16] Нокс Р.Б. Биология пыльцы. М.: Агропромиздат, 1985. 83 с.
- [17] Tosun F., Koyuncu F. Investigations of suitable pollinator for 0900 *Ziraat* sweet cherry cv.: pollen performance tests, germination tests, germination procedures, *in vitro* and *in vivo* pollinations // Hort. Sci. (Prague), 2007, v. 34 (2), pp. 47–53.
- [18] Foster G.S., Bridgwater F. Viability tests to evaluate pollen reliability in loblolly pine controlled pollinations // For. Sci., 1979, v. 25, no. 2, pp. 270–274.
- [19] Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: Издво Белорусского научно-исследовательского института лесного хозяйства, 1989. 128 с.
- [20] Norton J.D. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 1966, v. 89, pp. 132–134.
- [21] Seday U., Uzun A., Yilmaz C., Eti S. Production and quality of pollen in terms of fruit set on some self-pollinated pomegranate cultivars // Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013, v. 19 (3), pp. 513–517.
- [22] Jyothi K.J., Sunil C.N. Floral phenology and breeding system of *Aponogeton appendiculatus* V. Bruggen (Aponogetonaceae) // The International J. of Plant Reproductive Biology, 2018, v. 10 (2), pp. 161–165. DOI 10.14787/ijprb.2018.10.2
- [23] Bayazit S., Çalişkan O., Imrak B. Comparison of pollen production and quality characteristics of cultivated and wild almond species // Chilean J. of Agricultural Research, 2011, v. 71 (4), pp. 536–541.
- [24] Atlagić J., Terzić S., Marjanović-Jeromela A. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species // Ind. Crops Products, 2012, v. 35, pp. 88–91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.06.012
- [25] Čalić D., Devrnja N., Milojević J. Pollen morphology and variability of *Tulipa hungarica* Borb. // African J. of Biotechnology, 2012, v. 11 (3), pp. 616–620.
- [26] Dutta, S.K., Srivastava M., Chaudhary R. Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen // Scientia Horticulturae, 2013, v. 161, pp. 193–197.
- [27] Kundu M., Dubey A., Srivastav M. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in *Citrus* // Turk J. Biol., 2014, v. 38, pp. 1–9.
- [28] Impe D., Reitz J., Köpnick C. Assessment of pollen viability for wheat // Front. Plant Sci., 2020, v. 10, p. 1588. DOI: 10.3389/fpls.2019.01588
- [29] Helpson-Harrison J., Helpson-Harrison Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate // Stain Technol., 1970, v. 45, pp. 115–120.
- [30] Noland T., Mohammed G. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds // New Forests, 1997, v. 14, pp. 221–232.
- [31] Сурсо М.В. Оценка доброкачественности пыльцы хвойных видов методом окрашивания пыльцевых зерен флуоресцеин диацетатом // J. of Agriculture and Environment, 2022. № 5 (25). С. 1–6.
- [32] Chrzanowski T.H., Crotty R.D., Hubbard J.G., Welch R.P. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in Freshwater // Microb Ecol., 1984, v. 10, pp. 179–185.
- [33] Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells // Methods, 2003, v. 29 (1), pp. 42–50. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00289-X)
- [34] Wang X.M., Terasaki P.I., Jr. Rankin C.W., Chia D., Zhong H.P., Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release / X.M. Wang // Hum Immunol., 1993, v. 37 (4), pp. 264–270. DOI: 10.1016/0198-8859(93)90510-8
- [35] Suuronen E.J., McLaughlin C.R., Stys P.K., Nakamura M., Munger R., Griffith M. Functional innervation in tissue engineered models for *In vitro* study and testing purposes // Toxicological Sciences, 2004, v. 82 (2), pp. 525–533. DOI: 10.1093/toxsci/kfh270

## Сведения об авторе

**Сурсо Михаил Вольдемарович** — д-р с.-х. наук, гл. науч. сотр., ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаврова Уральского отделения РАН», [surso@fciarctic.ru](mailto:surso@fciarctic.ru)

Поступила в редакцию 10.04.2023.

Одобрено после рецензирования 22.05.2023.

Принята к публикации 20.12.2023.

## EXPRESS DIAGNOSTICS METHODS RELIABILITY OF CONIFEROUS SPECIES POLLEN QUALITY

M.V. Surso

Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 20, Nikolsky av., 163020, Arkhangelsk, Russia

surso@fciaarctic.ru

The results of determining the viability of coniferous plant species pollen by indirect methods are presented. The proposed methodological approaches made it possible to exclude possible erroneous estimates when interpreting the results of pollen viability testing. It has been found that fluorescent methods most often overestimate the actual viability of pollen determined by direct methods. Most of the fluorochromes used in the experiments are of little use for assessing the viability of pollen. A visual assessment of the general and specific enzymatic activity of pollen showed results close to its actual viability. Methods based on the detection of enzymatic activity can be recommended for rapid diagnosis of pollen quality of coniferous plants.

**Keywords:** pollen, viability, conifers, fluorescence, enzymes

**Suggested citation:** Surso M.V. *Dostovernost' metodov ekspres-diagnostiki kachestva pyl'tsy khvoynnykh rasteniy* [Express diagnostics methods reliability of coniferous species pollen quality]. *Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin*, 2024, vol. 28, no. 1, pp. 56–67. DOI: 10.18698/2542-1468-2024-1-56-67

### References

- [1] Tanaka K., Naganuma S. The pollen germination and pollen tube development in *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. IX. Population effects. *Sci. Repts. Hicosaci Univ.*, 1974, v. 21, no. 2, pp. 71–79.
- [2] Shardakov V.S. *Reaktsiya na peroksidazu kak pokazatel' zhiznesposobnosti pyl'tsy rasteniy* [Reaction to peroxidase as an indicator of the viability of plant pollen]. *Doklady AN SSSR* [Reports of the USSR Academy of Sciences], 1940, t. 26, v. 3, pp. 273–276.
- [3] King J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain. Technol.*, 1960, v. 35, no. 4, pp. 225–227.
- [4] Diakonu P. *O metode opredeleniya zhiznesposobnosti pyl'tsy pri pomoshchi 2,3,5-trifeniltetrazolkhlorida* [On the method of determining the viability of pollen using 2,3,5-triphenyltetrazole chloride]. *Tsitologiya i genetika* [Cytology and Genetics], 1968, v. 2, no. 5, pp. 476–477.
- [5] Rodriguez-Riano T., Dafni A. A new procedure to assess pollen viability. *Sex Plant Reprod.*, 2000, v. 12, pp. 241–244.
- [6] Maurin' A.M., Kurov I.A. *Sravnienie metodov opredeleniya zhiznesposobnosti pyl'tsy drevesnykh porod* [Comparison of methods for determining the viability of tree pollen]. *Botanicheskiy zhurnal* [Botanical J.], 1956, v. 41, no. 1, pp. 81–84.
- [7] Kurov I.A. *Kachestvo pyl'tsy i semyan introdutsirovannykh dal'nevostochnykh drevesnykh porod* [Quality of pollen and seeds of introduced Far Eastern tree species]. *Botanicheskiy zhurnal* [Botanical Journal], 1959, t. 44, no. 8, pp. 1162–1170.
- [8] Parfitt D.E., Ganeshan S. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *Hort Science*, 1989, v. 24 (2), pp. 354–356.
- [9] Bolat I., Pirlak L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Turkish J. of Agriculture and Forestry*, 1999, v. 23, pp. 383–388.
- [10] Petrov A.P., Pogorelov S.V. *K metodike okrashvaniya zreloy pyl'tsy gallotsianinom* [On the technique of staining mature pollen with gallocyanin]. *Botanicheskiy zhurnal* [Botanical J.], 1987, t. 72, no. 9, pp. 1269–1270.
- [11] Vižintin L., Bohanec B. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. *Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica*, 2004, v. 46, pp. 177–183.
- [12] Erdoğan Ü. Determination of pollen quality and quantity in mulberry (*Morus alba* L.). *Pak. J. Bot.*, 2015, v. 47 (1), pp. 275–278.
- [13] Mendez N.P., Porquis H.C., Sinamban E.B., Acma F.M. Comparative pollen viability and pollen tube growth of two endemic philippine *Etilingera* (Zingiberaceae, Alpinioideae). *Philippine J. of Systematic Biology*, 2017, v. 11 (2), pp. 1–9.
- [14] Trenin V.V. *Tsitoembriologiya listvenitsy* [Cytoembryology of larch]. Leningrad: Nauka, 1986, 88 p.
- [15] Kozubov G.M. *Lyuminescentnyy metod izucheniya pyl'tsy rasteniy* [Luminescent method for studying plant pollen]. *Botanicheskiy zhurnal* [Botanical Journal], 1967, t. 52, no. 8, pp. 1156–1157.
- [16] Noks R.B. *Biologiya pyl'tsy* [Biology of pollen]. Moscow: Agropromizdat, 1985, 83 p.
- [17] Tosun F., Koyuncu F. Investigations of suitable pollinator for 0900 *Ziraat* sweet cherry cv.: pollen performance tests, germination tests, germination procedures, *in vitro* and *in vivo* pollinations. *Hort. Sci. (Prague)*, 2007, v. 34 (2), pp. 47–53.
- [18] Foster G.S., Bridgwater F. Viability tests to evaluate pollen reliability in loblolly pine controlled pollinations. *For. Sci.*, 1979, v. 25, no. 2, pp. 270–274.
- [19] Goncharenko G.G., Padutov V.E., Potenko V.V. *Rukovodstvo po issledovaniyu khvoynnykh vidov metodom elektroforeticheskogo analiza izofermentov* [Guide to the study of coniferous species by electrophoretic analysis of isoenzymes]. Gomel: Belarusian Research Institute of Forestry, 1989, 128 p.
- [20] Norton J.D. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1966, v. 89, pp. 132–134.
- [21] Seday U., Uzun A., Yilmaz C., Eti S. Production and quality of pollen in terms of fruit set on some self-pollinated pomegranate cultivars. *Bulgarian J. of Agricultural Science*, 2013, v. 19 (3), pp. 513–517.
- [22] Jyothi K.J., Sunil C.N. Floral phenology and breeding system of *Aponogeton appendiculatus* V. Bruggen (Aponogetonaceae). *The International J. of Plant Reproductive Biology*, 2018, v. 10 (2), pp. 161–165. DOI 10.14787/ijprb.2018.10.2
- [23] Bayazit S., Çalişkan O., Imrak B. Comparison of pollen production and quality characteristics of cultivated and wild almond species. *Chilean J. of Agricultural Research*, 2011, v. 71 (4), pp. 536–541.



- [24] Atagić J., Terzić S., Marjanović-Jeromela A. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species. *Ind. Crops Products*, 2012, v. 35, pp. 88–91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.06.012
- [25] Čalić D., Devrnja N., Milojević J. Pollen morphology and variability of *Tulipa hungarica* Borb. *African J. of Biotechnology*, 2012, v. 11 (3), pp. 616–620.
- [26] Dutta, S.K., Srivastava M., Chaudhary R. Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen. *Scientia Horticulturae*, 2013, v. 161, pp. 193–197.
- [27] Kundu M., Dubey A., Srivastav M. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in *Citrus*. *Turk J. Biol.*, 2014, v. 38, pp. 1–9.
- [28] Impe D., Reitz J., Köpnick C. Assessment of pollen viability for wheat. *Front. Plant Sci.*, 2020, v. 10, p. 1588. DOI: 10.3389/fpls.2019.01588
- [29] Helpson-Harrison J., Helpson-Harrison Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, 1970, v. 45, pp. 115–120.
- [30] Noland T., Mohammed G. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds. *New Forests*, 1997, v. 14, pp. 221–232.
- [31] Surso M.V. *Otsenka dobrokachestvennosti pyl'tsy khvoynykh vidov metodom okrashivaniya pyl'tsevykh zeren fluorestsein diacetatom* [Assessment of the good quality of pollen of coniferous species by staining pollen grains with fluorescein diacetate]. *J. of Agriculture and Environment* [J. of Agriculture and Environment], 2022, no. 5 (25), pp. 1–6.
- [32] Chrzanowski T.H., Crotty R.D., Hubbard J.G., Welch R.P. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in Freshwater. *Microb Ecol.*, 1984, v. 10, pp. 179–185.
- [33] Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*, 2003, v. 29 (1), pp. 42–50. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00289-X)
- [34] Wang X.M., Terasaki P.I., Jr. Rankin C.W., Chia D., Zhong H.P., Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release / X.M. Wang. *Hum Immunol.*, 1993, v. 37 (4), pp. 264–270. DOI: 10.1016/0198-8859(93)90510-8
- [35] Suuronen E.J., McLaughlin C.R., Stys P.K., Nakamura M., Munger R., Griffith M. Functional innervation in tissue engineered models for *In vitro* study and testing purposes. *Toxicological Sciences*, 2004, v. 82 (2), pp. 525–533. DOI: 10.1093/toxsci/kfh270

*The work was performed within the framework of the state assignment to the Federal Research Center for Integrated Arctic Studies of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (State registration No. — 122011400384-2).*

## Author's information

**Surso Mikhail Vol'demarovich** — Dr. Sci. (Agriculture), Chief Researcher, Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, [surso@fciarctic.ru](mailto:surso@fciarctic.ru)

Received 10.04.2023.

Approved after review 22.05.2023.

Accepted for publication 20.12.2023.