
FORESTRY

DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2022.5.25.05>

Surso M.V. *

Federal Center for Integrated Arctic Studies of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia

* Corresponding author (surso[at]fciarctic.ru)

Received: 11.08.2022; Accepted: 22.08.2022; Published: 19.09.2022

QUALITY EVALUATION OF CONIFEROUS SPECIES POLLEN BY STAINING POLLEN GRAINS WITH FLUORESC EIN DIACETATE

Research article

Abstract

The results of a comparative study of pollen quality parameters of pine (*Pinus sylvestris* L.), spruce (*Picea abies* (L.) Karst. x *P. obovata* Ledeb.) and juniper (*Juniperus communis* L.) by *in vitro* germination and staining pollen grains with fluorescein diacetate are presented. Methods for calculating the pollen quality index of coniferous species differing in the biology of pollen germination are proposed. In 91% of cases, a high ($50 < r < 75$) or very high ($r \geq 75$) positive correlation was observed between the pollen vitality index determined by germination and its merit factor of all studied species. It is shown that the staining of pollen grains with fluorescein diacetate can be used as an express method for assessing pollen of coniferous species' quality.

Keywords: spruce, juniper, pine, pollen, vitality, fluorescein diacetate.

Сурсо М.В. *

Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

* Корреспондирующий автор (surso[at]fciarctic.ru)

Получена: 11.08.2022; Доработана: 22.08.2022; Опубликована: 19.09.2022

ОЦЕНКА ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ПЫЛЬЦЫ ХВОЙНЫХ ВИДОВ МЕТОДОМ ОКРАШИВАНИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН ФЛУОРЕСЦЕИН ДИАЦЕТАТОМ

Научная статья

Аннотация

Приведены результаты сравнительного изучения показателей качества пыльцы сосны (*Pinus sylvestris* L.), ели (*Picea abies* (L.) Karst. x *P. obovata* Ledeb.) и можжевельника (*Juniperus communis* L.) методом проращивания *in vitro* и окрашиванием пыльцевых зерен флуоресцеин диацетатом. Предложены способы расчета показателя доброкачественности пыльцы хвойных видов, различающихся по биологии прорастания пыльцы. В 91 % случаев между показателем жизнеспособности пыльцы, определенным путем проращивания и ее доброкачественностью всех изученных видов наблюдалась высокая ($50 < r < 75$), или очень высокая ($r \geq 75$) положительная корреляция. Показано, что окрашивание пыльцевых зерен флуоресцеин диацетатом можно использовать в качестве экспресс-метода оценки доброкачественности пыльцы хвойных видов.

Ключевые слова: ель, можжевельник, сосна, пыльца, жизнеспособность, флуоресцеин диацетат.

1. Введение

Проращивание пыльцы на искусственных средах является традиционным прямым способом определения ее жизнеспособности. О жизнеспособности пыльцы судят по количеству проросших пыльцевых зерен, сформировавших пыльцевые трубки. По длине пыльцевых трубок можно судить об энергии их роста. По характеру флуоресценции структур пыльцевых трубок, окрашенных ядерными флуоресцентными красителями, можно судить о потенциальной оплодотворяющей способности (фертильности) пыльцы (рис.1).

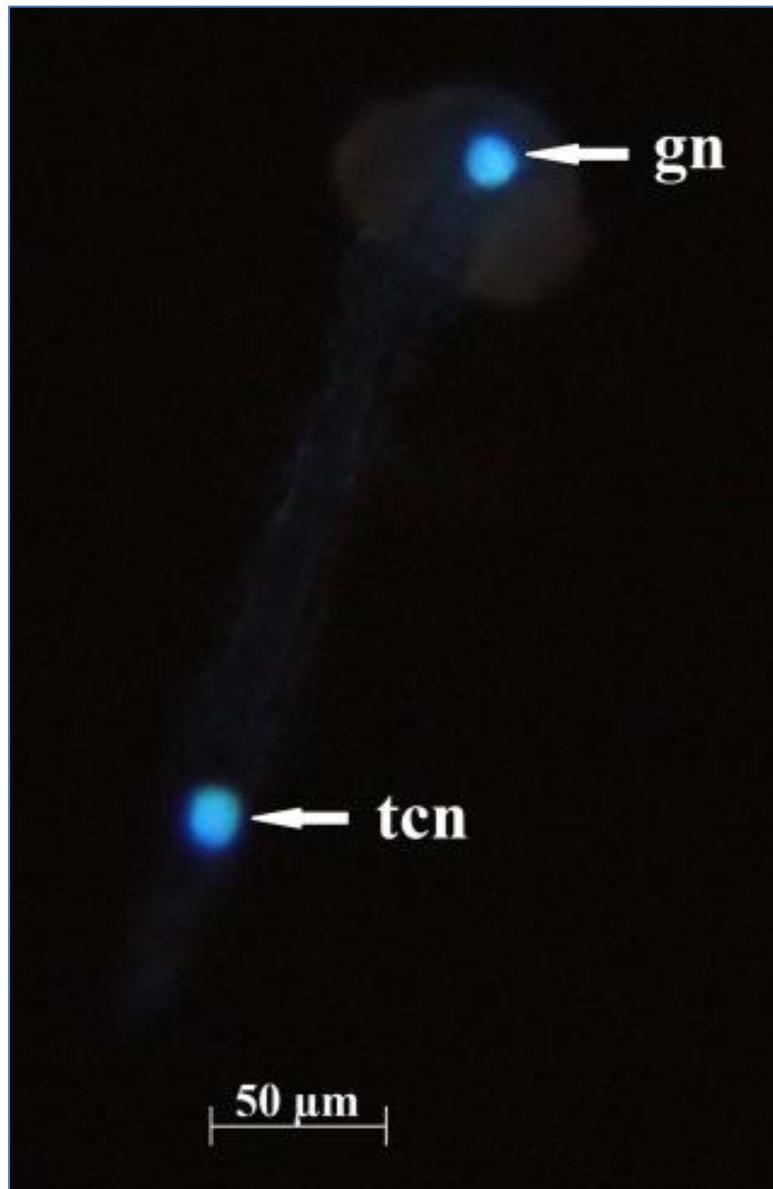


Рис. 1 – Пыльцевая трубка сосны обыкновенной, окрашенная DAPI:
gn – генеративное ядро; *tcn* – ядро клетки трубки

Однако, помимо трудоемкости и длительности эксперимента, определение жизнеспособности пыльцы путем проращивания имеет ряд других недостатков. Обычно с этой целью в качестве основной культуральной среды используют агаровый субстрат с добавлением сахарозы. В большинстве случаев образцы пыльцы, собранные в природных популяциях, уже заражены спорами грибов, и даже при самом тщательном соблюдении условий стерильности избежать развития мицелия на этих средах чаще всего не удастся. У большинства хвойных видов развитие пыльцевых трубок происходит крайне медленно, и сильно разросшийся мицелий может затруднять, или даже делать невозможным их рост. Подобрать оптимальный состав среды, который для разных видов может различаться, также непросто. Так, по нашим данным, пыльцевые трубки сосны лучше растут на средах, содержащих галактозу, или – глюкозу. Но даже при использовании высоко оптимизированных сред пыльцевые трубки *in vitro* редко достигают их длины *in vivo*, а у тех видов, для развития пыльцевых трубок которых необходим период зимнего покоя, это невозможно *a priori*. Однако, в экспериментально определенных условиях исследования *in vitro* актуальны и для ситуации *in vivo* [8], [15].

Косвенные методы определения качества пыльцы обычно основаны на корреляции цветных реакций морфологических структур пыльцевых зерен при воздействии на них специфичных или универсальных красителей, а также физико-химических свойств самой пыльцы или экстрактов из нее с фактической жизнеспособностью пыльцы и, с определенными оговорками, эти методы могут быть использованы лишь для определения доброкачественности пыльцы. Однако иногда косвенные методы являются единственно приемлемыми при определении качества пыльцы [3].

Окрашивание пыльцы флуоресцеин диацетатом (FDA) является широко распространенной процедурой для оценки качества пыльцы [1], [4], [5] [16]. Метод основан на способности FDA проникать сквозь мембраны внутрь живых клеток и в преобразовании FDA в его флуоресцирующие производные [10], [14]. Как и почти любой другой косвенный метод определения качества пыльцы в случаях ее средней и низкой жизнеспособности окрашивание FDA почти всегда дает несколько завышенные результаты, высокой – заниженные [2]. Следует отметить, что и результаты проращивания пыльцы не всегда совпадают с ее фактической жизнеспособности, и это необходимо учитывать при интерпретации результатов исследований.

Целью исследования являлось изучение возможности использования FDA для оценки качества пыльцы хвойных видов.

2. Методы

Максимально зрелые микростробилы (мужские побеги с микростробилами) сосны, ели и можжевельника собраны в природных (не нарушенных) старовозрастных популяциях этих видов в западной части Беломорско-Кулойского плато, расположенном на севере европейской части территории России (север Архангельской области) в 2018–2022 гг. Климатические условия района характеризуются частыми возвратами холодов в поздневесенний и раннелетний периоды, что может оказывать неблагоприятное влияние на прохождение критически значимых этапов микроспорогенеза (особенно мейоза микроспороцитов) и, как следствие, на качество продуцируемой пыльцы. Ежегодно пыльцу собирали с одних и тех же участков и, по возможности, с одних и тех же деревьев. Количество образцов (деревьев) варьировало от 10–12 до 30–40. В 2019 и 2020 гг. количество микростробилов у ели было крайне малым, или они полностью отсутствовали. В 2019 году пыльца ели была собрана лишь с 2-х деревьев. Ветви с микростробилами можжевельника срезали с мужских растений, произрастающих на открытых солнцу участках. После извлечения индивидуальные образцы пыльцы хранили до использования в эксикаторах над хлористым кальцием в холодильнике. Пыльцу проращивали во влажных камерах (в чашках Петри) при +26,5°C в течение 72 (ель), 96 (сосна) или 168 часов (можжевельник). Состав среды: 1%-ный агар + 5%-ная сахароза. Пыльцу ели и сосны считали проросшей, если длина пыльцевой трубки более чем в два раза превышала высоту тела зерна. Жизнеспособность пыльцы можжевельника определяли по предложенной нами эмпирической формуле:

$$L = 0,25L_1 + 0,5 L_2 + L_3 (\%) \quad (1)$$

где L_1 – количество пыльцевых зерен, сформировавших гидрофильную капсулу, в центре которой располагается одноклеточная микроспора, L_2 – количество пыльцевых зерен, сформировавших двухклеточный микрогаметофит тупелькообразной формы, целиком вмещающийся в гидрофильную капсулу, L_3 – количество пыльцевых зерен, проросших в пыльцевую трубку, кончик трубки вышел наружу через оболочку капсулы.

Стоковый раствор флуоресцеин диацетата (5 мг FDA в 1 мл ацетона) хранили при -20°C. Перед использованием стоковый раствор разбавляли diH_2O в соотношении 1:1000. Окрашивание производили в темноте при +26°C в течение 30 мин. Окрашивание DAPI проводили по методике, изложенной в работе Ю. Као с соавторстве.[7]. Время экспозиции при окрашивании подбирали эмпирически. Окрашенные образцы пыльцы трижды промывали в diH_2O , просматривали и фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Альтами Lum1 Led.

3. Результаты и обсуждение

Результаты проращивания пыльцы приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Взаимосвязь между показателями жизнеспособности и доброкачественности свежесобранной пыльцы сосны, ели и можжевельника

Год сбора пыльцы	Жизнеспособность, L, %		Доброкачественность, F, %		Коэффициент корреляции, r	
	$L \pm m_L$	CV, %	$F \pm m_F$	CV, %	$r \pm m_r$	CV, %
Сосна						
2018	12,9 ± 9,4	87,8	18,5 ± 7,1	44,6	45,5 ± 12,1	20,3
2019	92,1 ± 2,2	4,9	98,0 ± 13,8	19,1	90,0 ± 17,5	7,5
2020	34,0 ± 18,7	47,5	41,0 ± 17,4	30,2	65,0 ± 26,5	19,1
2021	55,4 ± 10,0	23,5	65,5 ± 9,2	11,9	73,9 ± 10,7	15,9
2022	82,3 ± 7,7	6,5	88,1 ± 14,4	13,2	92,8 ± 10,0	9,3
Ель						
2018	72,9 ± 10,8	19,4	65,9 ± 12,9	22,4	51,3 ± 24,7	47,4
2019	62,5	–	70,2	–	–	–
2020	–	–	–	–	–	–
2021	8,1 ± 2,3	35,5	12,9 ± 4,2	33,2	59,3 ± 12,3	34,7
2022	14,4 ± 3,3	29,7	22,5 ± 7,2	30,4	66,3 ± 10,4	28,7
Можжевельник						
2018	60,4 ± 12,8	23,1	75,0 ± 20,2	27,3	72,5 ± 21,4	33,7
2019	66,8 ± 7,7	17,0	62,5 ± 14,4	25,0	81,0 ± 24,0	26,9
2020	80,4 ± 3,6	4,6	91,5 ± 14,8	8,3	82,8 ± 17,2	28,2
2021	26,8 ± 7,4	46,0	34,2 ± 8,3	23,1	62,5 ± 13,4	31,5
2022	43,5 ± 6,4	34,3	54,4 ± 9,1	35,3	67,2 ± 12,8	24,7

Примечание: жизнеспособность пыльцы определялась путем проращивания, доброкачественность – методом окрашивания FDA

Жизнеспособность пыльцы у всех видов сильно различается по годам. В годы с неблагоприятными погодными условиями в период микроспорогенеза, дозревания и пыления усиливаются различия в показателях жизнеспособности пыльцы у разных деревьев. И, наоборот, в благоприятные годы эти различия нивелируются.

Результаты окрашивания пыльцевых зерен ели, сосны и можжевельника флуоресцеин диацетатом показаны на рисунке 2.

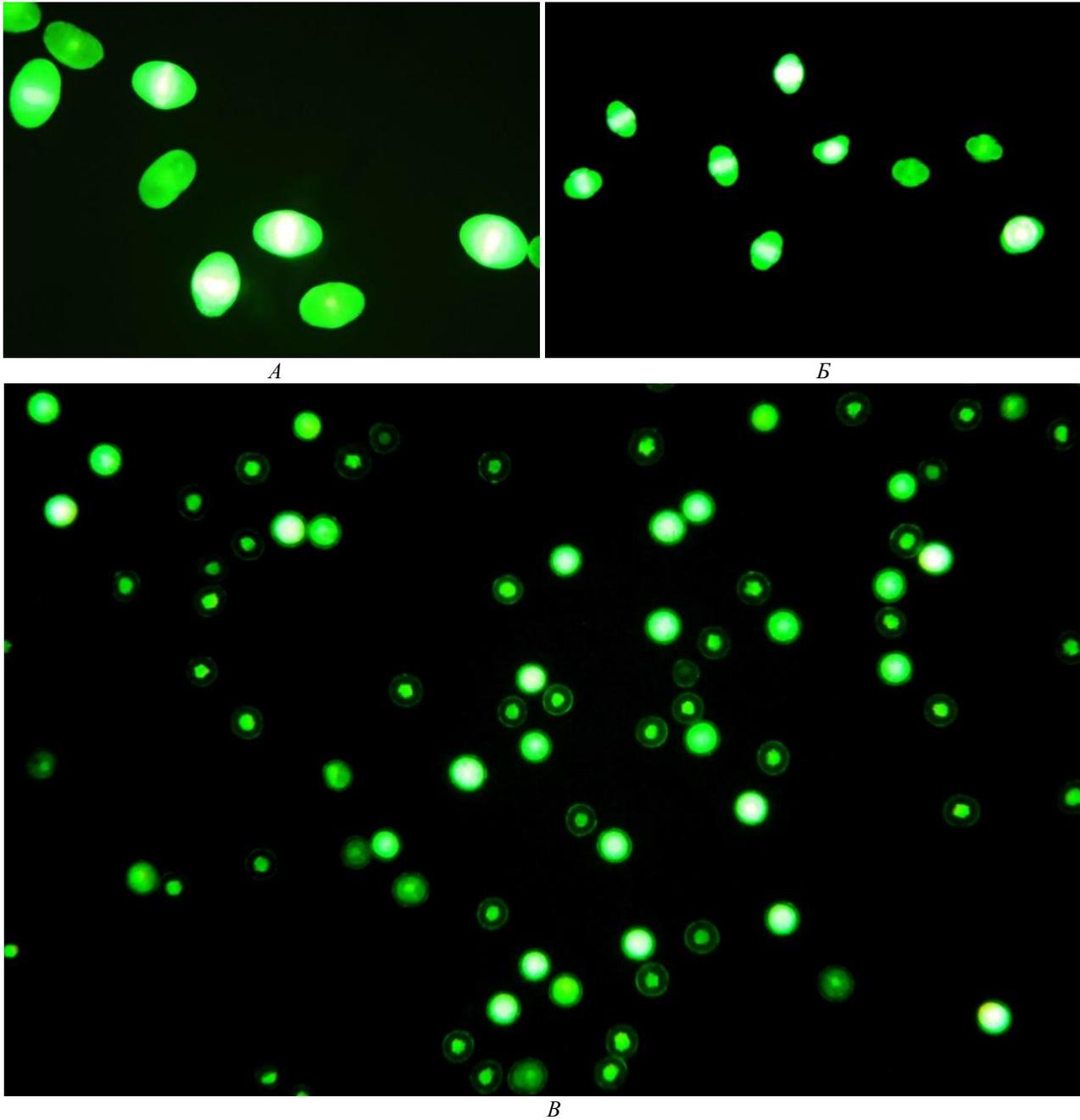


Рис. 2 – Результаты окрашивания пыльцы ели (А), сосны (Б) и можжевельника (В) флуоресцеин диацетатом (относительные размеры пыльцевых зерен пропорциональны их фактическим значениям)

Доброкачественные пыльцевые зерна (f_2) сосны и ели имеют яркую флуоресценцию всего тела зерна. В сомнительных случаях (f_1) слабая флуоресценция наблюдается в центральной части тела зерна, в месте локализации вегетативного ядра (ядра клетки трубки). Доброкачественность пыльцы (F) в каждом образце определяли как $\Sigma (0,5 f_1 + f_2)$.

Однозначно доброкачественные пыльцевые зерна можжевельника (f_3) имеют яркую флуоресценцию всего объема пыльцевого зерна. Менее жизнеспособные пыльцевые зерна (f_2) имеют выраженную флуоресценцию ядра и оболочки микроспоры. Часто при этом флуоресценция оболочки не просматривается или выражена слабее. Сомнительные пыльцевые зерна (f_1) имеют очень слабую, часто размытую флуоресценцию всех структур. Полное отсутствие флуоресценции свидетельствует о явной нежизнеспособности пыльцы. При оценке доброкачественности пыльцы можжевельника использовали тот же подход, что и при определении ее жизнеспособности: $F = \Sigma (0,25 f_1 + 0,5 f_2 + f_3)$.

В 91 % случаев между показателями жизнеспособности и доброкачественности пыльцы всех трех изученных видов, определенными вышеописанными способами наблюдалась высокая ($50 < r < 75$), или очень высокая ($r \geq 75$) положительная корреляция (таблица 1). Таким образом, окрашивание пыльцевых зерен флуоресцеин диацетатом можно использовать в качестве экспресс-метода оценки доброкачественности пыльцы хвойных видов.

Funding

The work was carried out within the framework of the state assignment to the Federal Center for Integrated Arctic Studies of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (state registration № 122011400384–2).

Финансирование

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

Conflict of Interest

None declared.

Конфликт интересов

Не указан.

References

1. Нокс Р.Б. Биология пыльцы / Р.Б. Нокс – М.: Агропромиздат, 1985. – 83 с.
2. Сурсо М.В. Лесобразующие хвойные Европейского Севера России (репродуктивная биология, внутривидовая дифференциация, генетический полиморфизм) / М.В. Сурсо – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 255 с.
3. Тренин В.В. Цитозембриология лиственницы / В.В. Тренин – Л.: Наука, 1986. – 88 с.
4. Atlagić J. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species / J. Atlagić, S. Terzić, A. Marjanović-Jeromela. // Ind. Crops Products. – 2012. – Vol. 35. – pp. 88–91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.06.012
5. Bayazit S. Comparison of pollen production and quality characteristics of cultivated and wild almond species / S. Bayazit, O. Çalişkan, B. Imrak // Chilean Journal of Agricultural Research. – 2011. – Vol. 71 (4). – pp. 536–541.
6. Čalić D. Pollen morphology and variability of *Tulipa hungarica* Borb. / D. Čalić, N. Devrnja, J. Milojević et al. // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11 (3). – pp. 616–620.
7. Cao Y. Distribution of nuclei and microfilaments during pollen germination in *Populus tomentosa* Carr. // Y. Cao, R.-Z. Hao, M.-Q. Liu et al. // Afr. J. Agric. Res. – 2012. – Vol. 7 (17). – P. 2679.
8. da Costa M.L. Growth media induces variation in cell wall associated gene expression in *Arabidopsis thaliana* pollen tube / M.L. da Costa, L.G. Pereira, S. Coimbra // Plants. – 2013. – Vol. 2. – P. 429. DOI: 10.3390/plants2030429
9. Dutta S.K. Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen / S.K. Dutta, M. Srivastava, R. Chaudhary et al. // Scientia Horticulturae. – 2013. Vol. 161. – pp. 193–197.
10. Helpson-Harrison J. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate / J. Helpson-Harrison, Y. Helpson-Harrison // Stain Technol. – 1970. – Vol. 45. – pp. 115–120.
11. Impe D. Assessment of pollen viability for wheat / D. Impe, J. Reitz, C. Köpnick et al. // Front. Plant Sci. – 2020. – Vol. 10. – P. 1588. DOI: 10.3389/fpls.2019.01588
12. Kundu M. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in *Citrus* / M. Kundu, A. Dubey, M. Srivastav et al. // Turk J Biol. – 2014. Vol. 38. – pp. 1–9.
13. Prajapati P.P. Effect of sucrose, boron, calcium, magnesium and nitrate during *in vitro* pollen germination in *Luffa aegyptica* Mill. / P.P. Prajapati, B.K. Jain // Journal of Pure and Applied Sciences. – 2010. – Vol. 18. – pp. 5–8.
14. Noland T. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds / T. Noland, G. Mohammed // New Forests. – 1997. – Vol. 14. – pp. 221–232.
15. Taylor P. Pollen germination and tube growth / P. Taylor, P.K. Hepler // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 1997. – Vol. 48. – P. 461. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.461
16. Vižintin L. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation / L. Vižintin, Bohanec B. // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. – 2004. – Vol. 46. – pp. 177–183.

References in English

1. Noks R.B. Biologija pyl'cy [Pollen Biology] / R.B. Noks – М.: Агропромиздат, 1985. – 83 p. [in Russian]
2. Surso M.V. Lesobrazujushhie hvojnye Evropejskogo Severa Rossii (reproduktivnaja biologija, vnutrividovaja differenciacija, geneticheskij polimorfizm) [Forest-forming conifers of the European North of Russia (reproductive biology, intraspecific differentiation, genetic polymorphism)] / M.V. Surso – Ekaterinburg: UrO RAN, 2007. – 255 p. [in Russian]
3. Trenin V.V. Citojembriologija listvennicy [Cytoembryology of larch] / V.V. Trenin – L.: Nauka, 1986. – 88 p. [in Russian]
4. Atlagić J. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species / J. Atlagić, S. Terzić, A. Marjanović-Jeromela. // Ind. Crops Products. – 2012. – Vol. 35. – pp. 88–91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.06.012
5. Bayazit S. Comparison of pollen production and quality characteristics of cultivated and wild almond species / S. Bayazit, O. Çalişkan, B. Imrak // Chilean Journal of Agricultural Research. – 2011. – Vol. 71 (4). – pp. 536–541.
6. Čalić D. Pollen morphology and variability of *Tulipa hungarica* Borb. / D. Čalić, N. Devrnja, J. Milojević et al. // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11 (3). – pp. 616–620.
7. Cao Y. Distribution of nuclei and microfilaments during pollen germination in *Populus tomentosa* Carr. // Y. Cao, R.-Z. Hao, M.-Q. Liu et al. // Afr. J. Agric. Res. – 2012. – Vol. 7 (17). – P. 2679.
8. da Costa M.L. Growth media induces variation in cell wall associated gene expression in *Arabidopsis thaliana* pollen tube / M.L. da Costa, L.G. Pereira, S. Coimbra // Plants. – 2013. – Vol. 2. – P. 429. DOI: 10.3390/plants2030429
9. Dutta S.K. Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen / S.K. Dutta, M. Srivastava, R. Chaudhary et al. // Scientia Horticulturae. – 2013. Vol. 161. – pp. 193–197.

10. Helpson-Harrison J. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate / J. Helpson-Harrison, Y. Helpson-Harrison // *Stain Technol.* – 1970. – Vol. 45. – pp. 115–120.
11. Impe D. Assessment of pollen viability for wheat / D. Impe, J. Reitz, C. Köpnick et al. // *Front. Plant Sci.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1588. DOI: 10.3389/fpls.2019.01588
12. Kundu M. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, in vitro germination, and fruit set in Citrus / M. Kundu, A. Dubey, M. Srivastav et al. // *Turk J Biol.* – 2014. Vol. 38. – pp. 1–9.
13. Prajapati P.P. Effect of sucrose, boron, calcium, magnesium and nitrate during in vitro pollen germination in *Luffa aegyptica* Mill. / P.P. Prajapati, B.K. Jain // *Journal of Pure and Applied Sciences.* – 2010. – Vol. 18. – pp. 5–8.
14. Noland T. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds / T. Noland, G. Mohammed // *New Forests.* – 1997. – Vol. 14. – pp. 221–232.
15. Taylor P. Pollen germination and tube growth / P. Taylor, P.K. Hepler // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1997. – Vol. 48. – P. 461. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.461
16. Vižintin L. In vitro manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation / L. Vižintin, Bohanec B. // *Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica.* – 2004. – Vol. 46. – pp. 177–183.