

МЕТОДИКА
ИССЛЕДОВАНИЙ

ОБЗОР МЕТОДОВ ПОДГОТОВКИ ПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР
ВИДОВ *HELIANTHUS* (ASTERACEAE)

© 2023 г. А. А. Бабро^{1,*}, О. Н. Воронова^{1,**}

¹Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376, Россия

*e-mail: ABabro@binran.ru

**e-mail: o_voronova@binran.ru

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Методам обработки материала и окраски постоянных и временных препаратов для световой микроскопии посвящено большое количество исследований, но в процессе работы часто возникает необходимость в адаптации стандартных методов и схем к особенностям представителей определенных таксонов. При исследовании эмбриологии подсолнечника не все стандартные процедуры окрашивания дают желаемые результаты визуализации. В настоящей работе представлен обзор методов обработки материала для исследования репродуктивных структур у представителей рода *Helianthus* L. (*H. ciliaris* DC, *H. tuberosus* L., *H. maximiliani* Schrad., *H. annuus* L.), а также их модификации с целью получения максимально качественного представления о строении исследуемых структур.

В результате подбора параметров (условия и длительность обработки красителями, очередность их воздействия и др.) модифицированы классические методики и подобраны протоколы окраски, оптимальные для анализа строения большинства репродуктивных структур и стадий их развития (окраска толуидиновым синим, реактивом Шиффа с подкраской алциановым синим или толуидиновым синим, сафранином с подкраской алциановым синим).

Ключевые слова: *Helianthus*, методы окраски постоянных препаратов, методы просветления

DOI: 10.31857/S0006813623100022, **EDN:** ZZFBVW

Методам обработки материала и окраски постоянных и временных препаратов посвящено большое количество исследований, многие из них отличаются универсальностью и подходят для различных видов и для визуализации широкого круга структур. Однако в процессе работы исследователь может столкнуться с необходимостью адаптации стандартных методов и схем к особенностям представителей определенных таксонов и к конкретным научным задачам.

Еще в конце XIX века М. Goldflus (1899) и С.Г. Навашин (Nawaschin, 1900), используя метод световой микроскопии, описали общее строение зародышевого мешка подсолнечника. В работе Goldflus упоминается об окраске фуксином и йодной зеленью, в работе Навашина о методиках не говорится. В тексте и в пояснениях к рисункам в более ранних статьях этого автора говорится о просветлении жавелевой водой, глицеринном, фиксации в спирте, окраске гематоксилином по Деляфильду, водным синим (для обнаружения пыльцевых трубок по зернам крахмала и каллоз-

ным пробкам); фуксином с метиленовым синим; гематоксилином с сафранином (Nawaschin, 1895); использовании фиксатора Флемминга и тройной окраске по Флеммингу (Nawaschin, 1898). Указанные красители известны и в большинстве доступны и в настоящее время (Barykina et al., 2000; Selivanov, 2003).

В дальнейшем формирование и развитие репродуктивной системы подсолнечника изучалось с использованием световой микроскопии разными авторами (Ustinova, 1951a, b, 1954, 1955, 1964a, b, 1970; Benetskaya, 1952, 1954; Ilyina, 1957; Dziubenko, 1959; Movsesyan, 1961; Maheswari, 1963; Pirev, 1966; Efremov, 1967; Marchenko, 1968; Tatintseva, 1971; Belyaeva, 1975; Pustovoit et al., 1976; Konstantinova, 1980; Fedorenko et al., 1980, 1986; Toderich, 1988; Kovacik, Vlckova, 1988; Atlagic, 1990, 1996; Popielarska, 2005; Gotelli et al., 2010; Ochogavía et al., 2018). Наиболее часто использовались методы окраски по Фельгену; окраски растворами гематоксилина, приготовленными разными способами; сафранином (в сочетании с

другими красителями для подкраски цитоплазмы и клеточных оболочек); основным фуксином, генциан-фиолетом, толуидиновым синим и др.; при исследовании микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна, а также для оценки качества пыльцы, применялся раствор ацетокармина, иногда анилиновый синий и его производные (табл. 1).

До широкого распространения техники микрофотографирования результаты исследования были наглядно представлены в публикациях в виде рисунков, и оценить качество изображения при использовании тех или иных методов окраски не представлялось возможным, если только автор сам не обсуждал подобные вопросы. Более того, в некоторых ранних работах вообще отсутствует раздел “Материалы и методы”.

Особняком на фоне других публикаций стоит работа J. Telżyńska и H. Telżyński (Telżyńska, Telżyński, 1973), где представлены качественные, четкие микрофотографии, которые достойно смотрятся и в настоящее время. Авторы работы использовали различные методы окраски и привели свои выводы о качестве окраски (табл. 1).

Самым масштабным исследованием по эмбриологии подсолнечника, проведенным на нескольких видах (*H. rigidus* Desf., *H. scaberimus* Benth., *H. petiolaris* Nutt., *H. occidentalis* Riddell, *H. mollis* Lam., *H. debilis* Nutt. и три сорта *H. annuus*) с использованием светового микроскопа, в этот период была диссертация К.Н. Тодерич (Toderich, 1988), но в ней нет подробных описаний методов.

Эмбриологическое исследование подсолнечника мы начинали с использования преимущественно окраски гематоксилином по Гейденгайну (модификация – Zhinkina, Voronova, 2000) или гематоксилином по Эрлиху с подкрашиванием алциановым синим, но столкнулись с тем, что алциановый синий не дает достаточную интенсивность цвета, а гематоксин зачастую, наоборот, перекрашивает содержимое клеток некоторых структур. Например, цитоплазма пыльцевых зерен и клеток яйцевого аппарата окрашивалась так интенсивно, что в них не просматривались ядра. Затем были применены для подсолнечника методы окраски толуидиновым синим (Permyakov, 1988; Voronova, 2008), здесь также выявилась проблема избыточного окрашивания цитоплазмы, особенно для меристематических мелкоклеточных тканей. Применение тройной окраски (Kamelina et al., 1992) с использованием гематоксилина также показало негативный перекрашивающий эффект этого красителя на препараты, а следование классической методике окраски сафранином (Prozina, 1960) не позволило получить качественные препараты из-за вымывания красителя. В связи с этим была проведена модификация ряда методов окраски для их оптимального применения к объекту исследования.

Для исследования пыльцы были опробованы различные методы и способы окраски: прорастивание пыльцы (Voronova et al., 2011), окраска гематоксилином Карацци и Гарриса (“Биовитрум”), по П.И. Диакону (Diakon, 1962), по Александеру (Alexander, 1969; Atlagić, 1990, 1996; Atlagić et al., 2012); в том числе упрощенный (Peterson, Slovin, 2010). Для нашей работы был выбран ацетокарминовый метод (Prozina, 1960; Voronova, Gavrilova, 2019) как наиболее простой, доступный, позволяющий быстро получить качественную окраску.

В статье представлены методические обобщения, сделанные на основании исследований, проводившихся в течение ряда лет на культурных формах однолетнего подсолнечника *H. annuus* L. и диких многолетних видах *Helianthus ciliaris* DC, *H. tuberosus* L., *H. maximiliani* Scharad. Большинство методик целенаправленно отработывалось на примере *H. ciliaris*, а затем было успешно применено при исследовании других видов подсолнечника.

Обзор методов окраски препаратов и их модификация для изучения эмбриологии подсолнечника

Окраска толуидиновым синим

Для окраски препаратов толуидиновый синий чаще всего используется в виде водного раствора (на дистиллированной воде или, для регионов с мягкой водой, на водопроводной), а также приготовленный на буферных растворах с pH от 5 до 9 (O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982). Parker et al. (1982) предлагают использовать краситель в концентрации 0.05%, тогда как другие исследователи применяли более высокие концентрации, например 2%-ный раствор толуидинового синего, приготовленный на 2%-ной (Permyakov, 1988) или 1%-ной (Voronova, 2008) уксусной кислоте.

Мы применяли метод окраски толуидиновым синим в фосфатном буфере с pH 6.8. Следует отметить, что при его использовании необходимо исключить обезвоживание препаратов в 96° спирте, заменив этот процесс сушкой в термостате, иначе краситель сильно вымывается. При окрашивании водным раствором толуидинового синего обработка препаратов в спирте, напротив, необходима для удаления излишков красителя.

При сравнении постоянных препаратов подсолнечника, окрашенных водным (рис. 1а) и забуференным (рис. 1б) растворами толуидинового синего были отмечены некоторые различия в яркости и оттенках полученного цвета, но в целом существенной разницы в результатах не наблюдалось.

Практика применения данного красителя показала, что 0.5% раствор толуидинового синего в дистиллированной воде обеспечивает хорошее качество окраски и оптимален для постоянных

Таблица 1. Методы работы с материалом *Helianthus* по данным литературных источников
Table 1. Methods of material processing according to literature (genus *Helianthus*)

Область исследования Area of research	Методы Methods
Микроспорогенез, формирование пыльцы Microsporogenesis, pollen formation	<p>Окраска по Фельгену (Pirev, 1966; Konstantinova, 1980; Tatintseva, 1971; Toderich, 1988)</p> <p>Гематоксилин: по Деляфильду (Maheshwari, 1963); по Гейденгайну (Tatintseva, 1971; Konstantinova, 1980; Toderich, 1988); по Эрлиху (Konstantinova, 1980); с использованием алцианового синего (Konstantinova, 1980)</p> <p>Ацетокармин: временные препараты (Efremov, 1967); по Беллингу (Marchenko, 1968); по Brown-Geitler с обработкой 4% водным раствором железо-аммонийным алюминием на давленных препаратах (Atlagic, 1996)</p> <p>Метилгрюн-пиронин по Унна (Pirev, 1966; Tatintseva, 1971)</p> <p>Сафранин по Картису, генцианвиолет по Ньютоу (Toderich, 1988)</p> <p>Просветление тканей раствором следующего состава: молочная кислота, хлоралгидрат, фенол, гвоздичное масло, ксилол (Herr, 1971) – Ochogavía et al., 2018</p> <p>Feulgen's Stain (Pirev, 1966; Konstantinova, 1980; Tatintseva, 1971; Toderich, 1988)</p> <p>Haematoxylin: Delafield's (Maheshwari, 1963); Heidenhain's (Tatintseva, 1971; Konstantinova, 1980; Toderich, 1988); Erlich's (Konstantinova, 1980); with alcyan blue counter-stain (Konstantinova, 1980)</p> <p>Acetocarmine: temporary mounts (Efremov, 1967); Belling's (Marchenko, 1968); after Brown-Geitler's method following pretreatment with a 4% aqueous solution of ferrous ammonium alum (Atlagic, 1996)</p> <p>Methyl green with pyronine by Unna (Pirev, 1966; Tatintseva, 1971)</p> <p>Curtis's safranin, gentian violet by Newton (Toderich, 1988)</p> <p>Clarification with Herr's solution (lactic acid, chloral hydrate, phenol, clove oil, xylene (Herr, 1971) – Ochogavía et al., 2018)</p>
Пыльцевые зерна, опыление Pollen grains, pollination	<p>Просветление с последующей окраской: ацетокармином (Ustinova, 1951b); лихт-грюн, метиленовым синим (Movsesyan, 1961) – для исследования прорастания пыльцы на пестике</p> <p>Оценка жизнеспособности пыльцы: краситель на основе кислого фуксина (Efremov, 1967), по Александеру (Atlagic, 1996); флюоресцин диацетатом (Popielarska, 2005); лактофенолом с анилиновым синим (Ochogavía et al., 2018)</p> <p>Проращивание пыльцы: на рыльце пестика (Fedorenko et al., 1986); во влажной камере по Транковскому (Toderich, 1988); на искусственной среде (Popielarska, 2005)</p> <p>Метод люминесценции (Fedorenko et al., 1986)</p> <p>Исследование структуры рыльца и столбика – окраска сафранином и фастгрюном (Gotelli et al., 2010); проверка готовности рыльца к опылению 1–2% раствором перманганата калия (Toderich, 1988)</p> <p>Clarification and staining by: acetocarmine (Ustinova, 1951b); light green, methylene blue (Movsesyan, 1961) – to observe pollen germination on the stigma</p> <p>Evaluation of pollen viability: stain based on the acid fuchsine (Efremov, 1967), Alexander's stain (Atlagic, 1996); fluorescein diacetate (Popielarska, 2005); lactophenol with aniline blue (Ochogavía et al., 2018)</p> <p>Pollen germination: on the stigma (Fedorenko et al., 1986); in the humid chamber after Trankovsky (Toderich, 1988); on solid artificial media (Popielarska, 2005)</p> <p>Luminescence method (Fedorenko et al., 1986)</p> <p>Stigma and style structure research: staining with safranin and fast green (Gotelli et al., 2010); stigma's readiness for pollination test: 1–2% potassium permanganate solution (Toderich, 1988)</p>

Таблица 1. Продолжение

Область исследования Area of research	Методы Methods
Семязачаток, зародышевый мешок Ovule, embryo sac	<p>Гематоксилин: по Деляфильду (Maheshwari, 1963) по Гейденгайну (Efremov, 1967; Belyaeva, 1975; Toderich, 1988), в том числе с подкраской метиловым синим и метиловым зеленым в анилине (Dziubenko, 1959)</p> <p>Окраска по Фельгену (Efremov, 1967, Belyaeva, 1975, Toderich, 1988); в том числе окраска зафиксированного материала для временных препаратов с подкраской лихтгрюн и гематоксилином по Эрлиху (Pustovoit et al., 1976)</p> <p>Метилгрюн-пиронин по Унна (Belyaeva, 1975); толуидиновый синий (Belyaeva, 1975; Popielarska, 2005); сафранин по Картису, генцианвиолет по Ньютону (Toderich, 1988); по методу Модилевского (Dziubenko, 1959)</p> <p>Просветление тканей раствором (молочная кислота, хлоралгидрат, фенол, гвоздичное масло, ксилол (Herr, 1971)) для DIC по Номарскому и конфокальной микроскопии (Ochogavía et al., 2018)</p> <p>Haematoxylin: Delafield's (Maheshwari, 1963) Heidenhain's (Efremov, 1967; Belyaeva, 1975; Toderich, 1988), also with methyl blue and methyl green in aniline as counter-stain (Dziubenko, 1959)</p> <p>Feulgen's stain (Efremov, 1967, Belyaeva, 1975, Toderich, 1988); staining of the fixed material with Feulgen's stain and counter-stains (light green and Erlich's haematoxylin) for the temporary mounts (Pustovoit et al., 1976)</p> <p>Methyl green with pyronine by Unna (Belyaeva, 1975); toluidine blue (Belyaeva, 1975; Popielarska, 2005); Curtis' safranin, Newton's gentian violet (Toderich, 1988); Modilevsky's method (Dziubenko, 1959)</p> <p>Tissue clarification method based on the clearing solution (lactic acid, chloral hydrate, phenol, clove oil, xylene (Herr, 1971)) for Nomarski interference contrast optics and confocal microscopy (Ochogavía et al., 2018)</p>
Процесс оплодотворения, эмбриогенез, зародыш Fertilization process, embryogenesis, embryo	<p>По Фельгену (Ustinova, 1951b, 1954, 1964a, b, 1970; Telżyńska, Telżyński, 1973), в том числе с подкраской лихтгрюном (Ustinova, 1951b);</p> <p>Гематоксилин: железный с эритрозином (Ustinova, 1951b); по Гейденгайну (Benetskaya, 1952, 1954; Ustinova 1964a, b); по Деляфильду (Maheshwari, 1963), по Эрлиху, по Модилевскому (Ustinova 1964a, b); железно-алюминиевый (Telżyńska, Telżyński, 1973).</p> <p>Сафранин: с подкраской лихтгрюн (Kovacik, Vlckova, 1988); с генциановым фиолетовым (Ilyina, 1957).</p> <p>Метилгрюн-пиронин (Ustinova, 1954, 1964a, b)</p> <p>Основной фуксин в цитратно-фосфатном буфере при pH 2.6 с подкраской фастгрин в 96° спирте; кристаллический фиолетовый (Telżyńska, Telżyński, 1973); толуидиновый синий (Popielarska, 2005)</p> <p>Устинова (Ustinova, 1951b) отмечает, что окраска по Фельгену дает лучшие результаты при исследовании процесса оплодотворения. Telżyńska, Telżyński (1973), напротив, сообщают о слабом окрашивании репродуктивных структур подсолнечника по Фельгену и наиболее четкой визуализации хроматина при окраске фуксином, а также отмечают переокрашивание содержимого пыльцевой трубки в зародышевом мешке гематоксилином и кристаллическим фиолетовым.</p> <p>Feulgen's stain (Ustinova, 1951b, 1954, 1964a, b, 1970; Telżyńska, Telżyński, 1973), also with light green counter stain (Ustinova, 1951b);</p> <p>Haematoxylin: iron haematoxyline with erithrosin (Ustinova, 1951b); Heidenhain's (Benetskaya, 1952, 1954; Ustinova 1964a, b); Delafield's (Maheshwari, 1963), Erlich's, after Modilevsky (Ustinova 1964a, b); iron-alum (Telżyńska, Telżyński, 1973).</p> <p>Safranin with light green (Kovacik, Vlckova, 1988); with gentian violet (Ilyina, 1957).</p> <p>Methyl green with pyronine by Unna (Ustinova, 1954, 1964a, b)</p>

Таблица 1. Окончание

Область исследования Area of research	Методы Methods
Процесс оплодотворения, эмбриогенез, зародыш (продолжение) Fertilization process, embryogenesis, embryo (continued)	Basic fuchsin solution in citrate phosphate buffer, pH 2.6, fast green in 96° ethanol as a counter-stain; crystal violet (Telżyńska, Telżyński, 1973); toluidine blue (Popielarska, 2005) Ustinova (1951b) marked out the best results of using Feulgen's stain in fertilization research. Telżyńska, Telżyński, (1973), on the contrary, reported that sunflower's reproductive structures demonstrate weak Feulgen reaction. Fuchsin staining gived the most intense staining of chromatin in their research, and haematoxylin and crystal violet overstained the contents of pollen tube in the embryo sac.
Гистохимические исследования Histochemical research	Углеводы: нейтральный красный, сафранин, метиленовый синий (клеточные оболочки с пектином); йодная реакция по Граму (выявление крахмала) – Пуина, 1957; раствор йода в хлоралгидрате, раствор Люголя (выявление крахмала) – Пирев, 1966; реакция Шабаша на полисахариды (Ustinova 1964); ШИК-реакция (Telżyńska, Telżyński, 1973) Жиры: растворы судана – Пуина, 1957, Пирев, 1966; Gotelli et al., 2010; по Свешниковой (Ustinova 1964) Белки: раствор желтой кровяной соли в уксусной кислоте (Пирев, 1966); кумасси бриллиантовый синий (Gotelli et al., 2010) Carbohydrates: neutral red, safranin, methylene blue (cell walls with pectine); Gram's iodic reaction (starch detection) – Пуина, 1957; Iodine solution in chloral hydrate; Lugol's solution (starch detection) – Пирев, 1966; Shabadash's reaction (polysaccharides detection) – Ustinova 1964; PAS (Telżyńska, Telżyński, 1973) Lipids: Sudan solutions – Пуина, 1957, Пирев, 1966; Gotelli et al., 2010; after Sveshnikova (Ustinova 1964) Proteins: yellow blood salt solution in acetic acid (Пирев, 1966); Coomassie brilliant blue (Gotelli et al., 2010)

препаратов подсолнечника. Хорошо визуализируется строение клетки и ядра. Повышение концентрации красителя в растворе до 1% вызывало лишним темное окрашивание.

Данный метод окраски занимает мало времени и хорошо зарекомендовал себя для получения общего представления о репродуктивных структурах на первых этапах исследования нового материала (рис. 1а). Однако для детального исследования тех или иных структур мы, как правило, применяли другие методы окраски, основанные на сочетании двух и более красителей, чтобы получить более контрастные, информативные, наглядные цветные снимки.

Здесь и далее протоколы окраски и применяемые реактивы приведены в табл. 2.

Окраска гематоксилином по Гейденгайну

При окраске препаратов подсолнечника с использованием гематоксилина и алцианового синего, несмотря на повышение концентрации последнего красителя с 0.1 до 0.5–1% (в 3% уксусной кислоте), наблюдались случаи недостаточной интенсивности цвета, получаемого при окраске в течение 5–15 минут по стандартной методике (Zhinkina, Voronova, 2000). Эту проблему

устраняло увеличение времени воздействия красителя до 45–90 минут или повышение температуры при окраске до 60°C (в термостате).

Время дифференцировки гематоксилина в растворе железо-аммонийных квасцов подбиралось эмпирически, в табл. 2 указано приблизительно.

Для анализа стадий развития зародышевого мешка и зародыша данная окраска является одним из оптимальных вариантов (рис. 1с, д). Она дает достаточно контрастное изображение при визуальном наблюдении и на фотоснимках, при этом хорошо видны элементы зародышевого мешка, в ядрах хорошо заметны ядрышки.

Применение данного метода для окраски женских репродуктивных структур на ранних стадиях их развития нецелесообразно, так как цитоплазма мелких клеток семязачатка сильно переокрашивается, и изображение получается темным. При окраске препаратов пыльников на поздних стадиях развития также высок риск избыточного окрашивания микроспор и пыльцевых зерен. Однако при необходимости возможно получение удачных изображений – для этого необходимо в каждом конкретном случае точно подобрать время, необходимое для дифференцировки (рис. 1е).

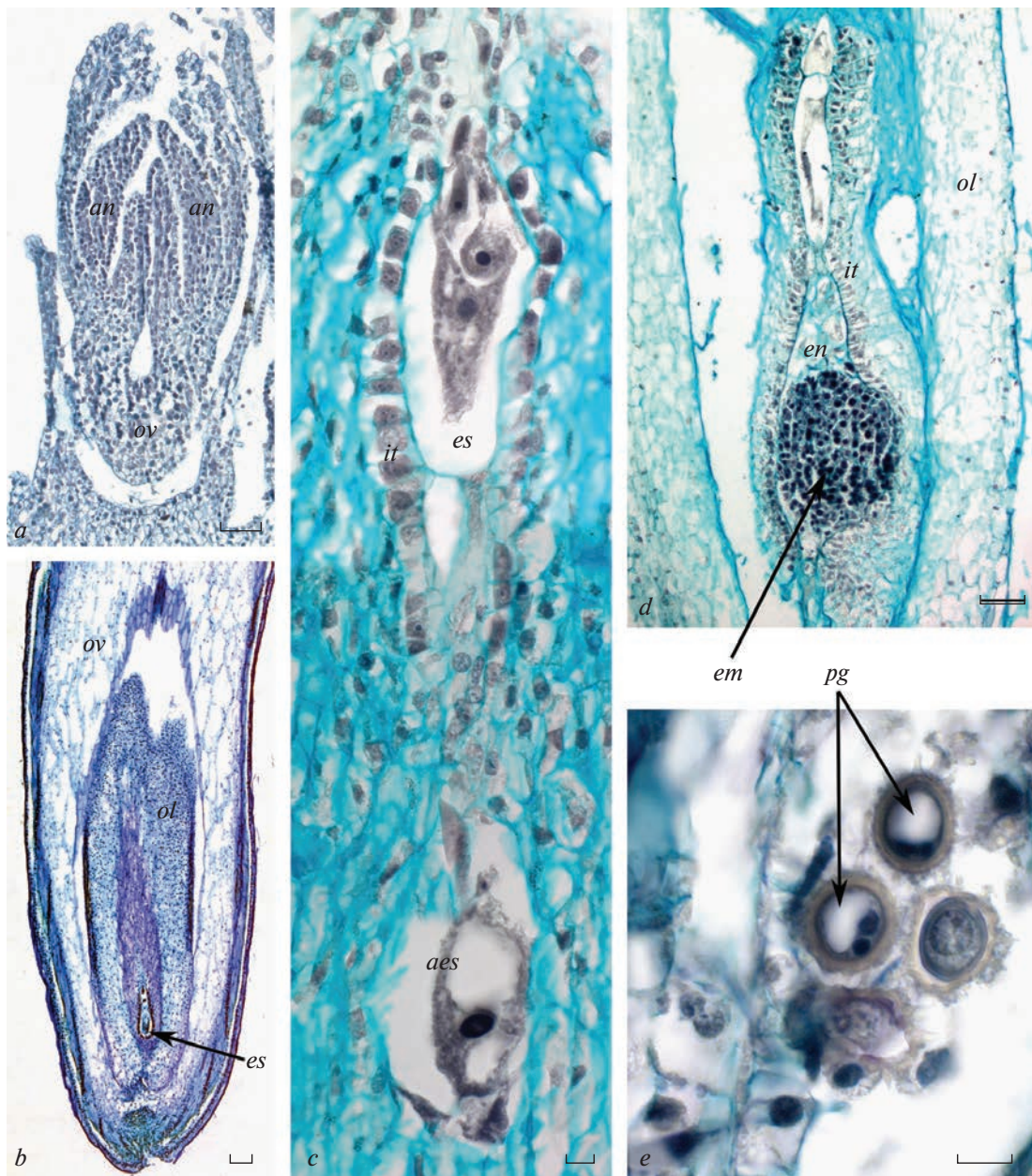


Рис. 1. Примеры окраски репродуктивных структур подсолнечника (*Helianthus ciliaris*) толуидиновым синим и гематоксилином по Гейденгайну. *a* – толуидиновый синий (трубчатый цветок, продольный срез); *b* – толуидиновый синий в фосфатном буфере (микропиллярная часть завязи с семязачатком, содержащим зародышевый мешок, продольный срез); *c–e* – гематоксилин по Гейденгайну с подкраской алциановым синим (*c* – семязачаток со зрелым половым и апоспорическим зародышевыми мешками, *d* – часть развивающегося семени с зародышем, эндоспермом и остатками интегументального тапетума, *e* – микроспоры на стадиях от вакуолизации до деления ядра). *an* – пыльник, *a es* – апоспорический зародышевый мешок, *em* – зародыш, *en* – эндосперм, *e s* – зародышевый мешок, *i t* – интегументальный тапетум, *ol* – семязачаток, *ov* – завязь, *pg* – пыльцевое зерно. Линейки: *a*, *e* – 50 мкм, *b* – 100 мкм, *c*, *d* – 10 мкм.

Fig. 1. The illustrations of sunflower's (*Helianthus ciliaris*) reproductive structures staining by toluidine blue and by Heidenhain's haematoxylin. *a* – toluidine blue (tubular flower, longitudinal section); *b* – toluidine blue in phosphate buffer (micropylar part of the ovary with the ovule containing the embryo sac, longitudinal section); *c–e* – Heidenhain's haematoxylin with alcian blue as a counter-stain (*c* – ovule with mature genital and aposporic embryo sacs, *d* – part of the developing seed with embryo, endosperm and remnants of the integumental tapetum, *e* – microspores at the stages from vacuolization to division of nucleus). *an* – anther, *a es* – aposporic embryo sac, *em* – embryo, *en* – endosperm, *e s* – embryo sac, *i t* – integumental tapetum, *ol* – ovule, *ov* – ovary, *pg* – pollen grain. Bars: *a*, *e* – 50 μ m, *b* – 100 μ m, *c*, *d* – 10 μ m.

Таблица 2. Протоколы обработки материала
Table 2. Material processing protocols

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
Последовательность действий Sequence of actions	1. Депарафинирование 2. Толуидиновый синий (0.5% раствор) – 5 мин 3. Вода водопроводная – 10 мин. 4. Вода дистиллированная – 3–5 мин 5. Спирт 96° – 10 мин 6. Заключение в монтирующую среду Итого – от 1.5 часов (не учитывая времени на депарафинирование) 1. Dewaxing 2. Toluidine blue (0.5% solution) – 5 min 3. Tap water – 10 min 4. Distilled water – 3–5 min 5. 96° ethanol – 10 min 6. Mounting Total time – from 1.5 hours (without dewaxing).
Реактивы Reagents	Толуидиновый синий (Вектон) 0.5% раствор Toluidine blue (Vecton) 0.5% solution
Окраска гематоксилином по Гейденгайну/Staining with Heidenhain's haematoxylin Zhinkina, Voronova, 2000	
Последовательность действий Sequence of actions	1. Депарафинирование 2. Квасцы железо-аммонийные 3% раствор – 30 мин. при температуре 60°C (термостат) 3. Дистиллированная вода (ополоснуть тщательно) – 15 мин 4. Гематоксилин по Гейденгайну – 30 мин. при температуре 60°C (термостат) 5. Вода водопроводная проточная или несколько смен – 10 мин 6. Вода дистиллированная – 10 мин 7. Квасцы железо-аммонийные 3% раствор – 1–3 мин. (дифференцировка) 8. Вода дистиллированная – 5–10 мин 9. Уксусная кислота 3% – 1 мин 10. Алциановый синий – от 45 мин до 1.5 ч 11. Уксусная кислота 3% – 1 мин 12. Спирт 96° – 10 мин 13. Заключение в монтирующую среду Итого – от 4 часов 15 мин (не учитывая времени на депарафинирование) 1. Dewaxing 2. Iron-ammonium alum 3% solution – 30 min at 60°C (thermostat) 3. Distilled water (rinse thoroughly) – 15 min 4. Heidenhain's haematoxylin – 30 min at 60°C (thermostat) 5. Tap water (flowing or several changes) – 10 min 6. Distilled water – 10 min 7. Iron-ammonium alum 3% solution – 1–3 min (differentiating) 8. Distilled water – 5–10 min 9. Acetic acid 3% – 1 min 10. Alcian blue – from 45 min to 1.5 h 11. Acetic acid 3% – 1 min 12. 96° ethanol – 10 min 13. Mounting Total time – from 4 hours 15 minutes (without dewaxing)

Таблица 2. Продолжение

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
Реактивы Reagents	<p>Квасцы железо-аммонийные (Реахим), раствор 3%</p> <p>Гематоксилин (Fluka AG), приготовление – по Zhinkina, Voronova, 2000</p> <p>Алциановый синий (Loba Chemie), 0.5–1% раствор в 3% уксусной кислоте /</p> <p>Iron-ammonium alum (Reahim), 3% solution</p> <p>Наематоxyлин (Fluka AG), preparation of staining solution – according to Zhinkina, Voronova, 2000</p> <p>Alcian blue (Loba Chemie), 0.5–1% solution in 3% acetic acid</p>
Окраска гематоксилином по Эрлиху Erlich's haematoxylin Kamelina et al., 1992	
Последовательность действий Sequence of actions	<p>Вариант 1 (с алциановым синим)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Депарафинирование 2. Гематоксилин по Эрлиху – 15 мин 3. Вода водопроводная проточная или несколько смен – 20 мин 4. Вода дистиллированная – 10 мин 5. Уксусная кислота 3% – 1 мин 6. Алциановый синий – от 45 мин до 1.5 ч 7. Уксусная кислота 3% – 1 мин 8. Вода дистиллированная – 10 мин* 9. Заключение в монтирующую среду <p>Итого – от 3 ч 30 мин (не учитывая времени на депарафинирование)</p> <p>*для придания структурам фиолетового оттенка после данного этапа можно ополоснуть стекла в растворе нашатырного спирта (1 капля на 100 мл дистиллированной воды) – 1 мин и промыть дистиллированной водой (5 мин).</p> <p>Вариант 2 (с толуидиновым синим): пункты 5–8 заменяются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Толуидиновый синий – 3–5 мин 6. Вода водопроводная – 10 мин 7. Вода дистиллированная – 3–5 мин 8. Спирт 96° – 10 мин <p>Итого – от 2 ч 45 мин (не учитывая времени на депарафинирование)</p> <p>Variation 1 (with alcian blue)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dewaxing 2. Erlich's haematoxylin – 15 min 3. Tap water (flowing or several changes) – 20 min 4. Distilled water – 10 min 5. Acetic acid 3% – 1 min 6. Alcian blue – from 45 min to 1.5 h 7. Acetic acid 3% – 1 min 8. Distilled water – 10 min* 9. Mounting <p>Total time – from 3 h 30 min (without dewaxing)</p> <p>*to give a violet shade to the stain, rinse the slides with ammonia solution (1 drop per 100 ml distilled water) and rinse with distilled water (5 min) after this step</p> <p>Variation 2 (with toluidine blue): the steps 5–8 must be replaced with:</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Toluidine blue – 3–5 min 6. Tap water – 10 min 7. Distilled water – 3–5 min 8. 96° ethanol – 10 min <p>Total time – from 2 h 45 min (without dewaxing)</p>

Таблица 2. Продолжение

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
Реактивы Reagents	<p>Гематоксилин (Fluka AG), приготовление – по Kamelina et al. (1992) Алциановый синий (Loba Chemie), 0.5–1% раствор в 3% уксусной кислоте или толуидиновый синий (Вектон) 0.5% раствор</p> <p>Haematoxylin (Fluka AG), preparation of staining solution – according to Kamelina et al. (1992) Alcian blue (Loba Chemie), 0.5–1% solution in 3% acetic acid, or Toluidine blue (Vecton) 0.5% solution</p>
Окраска реактивом Шиффа/Staining with Schiff's reagent Kamelina et al., 1992	
Последовательность действий Sequence of actions	<p>Вариант 1 (с алциановым синим)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Депарафинирование 2. Раствор HCl 1N (однонормальный) – 5 мин 3. Раствор HCl 5N (пятинормальный) – 30 мин 4. Раствор HCl 1N – 5 мин 5. Реактив Шиффа – до начала следующего рабочего дня, примерно 18–20 ч 6. Сернистые воды – 3 смены по 10 мин 7. Водопроводная вода (проточная или часто менять) – 2–3 ч 8. Уксусная кислота 3% – 1 мин 9. Алциановый синий – 45 мин–1.5 ч 10. Уксусная кислота 3% – 1 мин 11. Спирт 70° – менее 1 мин 12. Заключение в монтирующую среду <p>Итого – 1 день от 2 ч (без учета депарафинирования), 2 день от 3 ч 45 мин</p> <p>Вариант 2 (с толуидиновым синим): до п. 8 так же, как в варианте 1, далее</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. Вода дистиллированная – 10 мин 9. Толуидиновый синий – 5 мин 10. Вода водопроводная проточная или несколько смен – 10 мин 11. Вода дистиллированная – 3–5 мин 12. Спирт 96° – 10 мин 13. Заключение в монтирующую среду <p>Итого – 1 день от 2 ч (без учета депарафинирования), 2 день от 3.5 ч</p> <p>Variation 1 (with alcian blue)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dewaxing 2. HCl 1N solution – 5 min 3. HCl 5N solution – 30 min 4. HCl 1N solution – 5 min 5. Schiff's reagent – until the next working day begins, approximately 18–20 h 6. Sulphurous waters – 3 changes, 10 min each 7. Tap water (flowing or change 5–6 or more times) – 2–3 h 8. Acetic acid 3% – 1 min 9. Alcian blue – from 45 min to 1.5 h 10. Acetic acid 3% – 1 min 11. 70° ethanol – less than 1 min 12. Mounting <p>Total time – 1st day – from 2 h (without dewaxing), 2nd day – from 3 h 45 min</p> <p>Variation 2 (with toluidine blue): until the step 8 as in variation 1, then:</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. Distilled water – 10 min 9. Toluidine blue – 5 min 10. Tap water (flowing or several changes) – 10 min 11. Distilled water – 3–5 min

Таблица 2. Продолжение

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
	12. 96° ethanol – 10 min 13. Mounting Total time – 1 st day – from 2 h (without dewaxing), 2 nd day – from 3.5 h
Реактивы Reagents	Приготовление реактива Шиффа, сернистых вод, гематоксилина по Эрлиху (при необходимости) осуществляется в соответствии с методиками, приведенными в статье Kamelina et al. (1992) Фуксин основной для фуксинсернистой кислоты (Реахим) Натрий сернистокислый безводный (Реахим) Гематоксалин (Fluka AG) Алциановый синий (Loba Chemie), 0.5–1% раствор в 3% уксусной кислоте или толуидиновый синий (Вектон) 0.5% раствор Preparation of Schiff's reagent, sulphurous waters, Erlich's haematoxylin (if needed) – according to Kamelina et al. (1992) Basic fuchsin for fuchsin-sulfurous acid (Reahim) Sodium sulphite, anhydrous (Reahim) Haematoxylin (Fluka AG) Alcian blue (Loba Chemie), 0.5–1% solution in 3% acetic acid or toluidine blue (Vecton) 0.5% solution
Окраска сафранином/Staining with safranin Spicer, 1960; Prozina, 1960; Barykina et al., 2000	
Последовательность действий Sequence of actions	Вариант 1 1. Депарафинирование (без дистиллированной воды) 2. Спирт 50° – 5 мин 3. Сафранин (1% раствор в 50° спирте) – 2.5–3 ч в термостате при температуре +60°C 4. Вода водопроводная проточная или несколько раз сменить – 5–10 мин 5. Спирт 70° (с лимонной кислотой на кончике ножа) – менее 1 мин 6. Спирт 70° – менее 1 мин 7. Уксусная кислота 3% – менее 1 мин 8. Алциановый синий – 10 мин 9. Уксусная кислота 3% – менее 1 мин 10. Спирт 70° – менее 1 мин 11. Спирт 96° – менее 1 мин 12. Заключение в монтирующую среду Итого – от 3.5 ч (не учитывая времени на депарафинирование) Вариант 2 1. Депарафинирование 2. Уксусная кислота 3% – менее 1 мин 3. Алциановый синий – не менее 45 мин 4. Уксусная кислота 3% – менее 1 мин 5. Спирт 50° – 1 мин 6. Сафранин (1% раствор в 50° спирте) – 1 ч в термостате при температуре +60°C 7. Вода водопроводная проточная или несколько раз сменить – 5–10 мин 8. Спирт 70° (с лимонной кислотой на кончике ножа) – менее 1 мин 9. Спирт 70° – менее 1 мин 10. Спирт 96° – менее 1 мин 11. Заключение в монтирующую среду Итого – от 3.5 ч (не учитывая времени на депарафинирование) Variation 1.

Таблица 2. Продолжение

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
	1. Dewaxing (no distilled water needed) 2. 50° ethanol – 5 min 3. Safranin (1% solution in 50° ethanol) – 2.5–3 h at +60°C (thermostat) 4. Tap water (flowing or several changes) – 5–10 min 5. 70° ethanol (with a small amount of citric acid) – less than 1 min 6. 70° ethanol – less than 1 min 7. 3% acetic acid – less than 1 min 8. Alcian blue – 10 min 9. 3% acetic acid – less than 1 min 10. 70° ethanol – less than 1 min 11. 96° ethanol – less than 1 min 12. Mounting Total time – from 3.5 h (without dewaxing) Variation 2. 1. Dewaxing 2. Acetic acid 3% – less than 1 min 3. Alcian blue – from 45 min to 1 h 30 min 4. Acetic acid 3% – less than 1 min 5. 50° ethanol – 1 min 6. Safranin (1% solution in 50° ethanol) – 1 h at +60°C (thermostat) 7. Tap water (flowing or several changes) – 5–10 min 8. 70° ethanol (with a small amount of citric acid) – less than 1 min 9. 70° ethanol – less than 1 min 10. 96° ethanol – less than 1 min 11. Mounting Total time – from 3.5 h (without dewaxing)
Реактивы Reagents	Сафранин (Lachema) 1% раствор в 50° этиловом спирте Алциановый синий (Loba Chemie), 0.5–1% раствор в 3% уксусной кислоте Safranin (Lachema) 1% solution in 50° ethanol Alcian blue (Loba Chemie), 0.5–1% solution in 3% acetic acid
ШИК-реакция/PAS reaction McManus, 1948; Lillie, 1954; Jensen, 1965	
Последовательность действий Sequence of actions	1. Депарафинирование 2. Периодная кислота 0.5–0.8% или 1% раствор периодата калия (натрия) в 1N серной кислоте – 4–5 мин 3. Вода водопроводная – 2 смены по 5 мин 4. Вода дистиллированная – ополоснуть 5. Реактив Шиффа – 30–40 мин 6. Сернистые воды – 3 смены по 2 мин 7. Вода водопроводная – 10 мин 8. Вода дистиллированная – 10 мин 9. Спирт 70° – ополоснуть 10. Спирт 96° (после окраски) – 10 мин 11. Заключение в монтирующую среду Итого – от 2 ч 50 мин (не учитывая времени на депарафинирование) Dewaxing 2. Iodic acid 0.5–0.8% solution or 1% potassium (sodium) periodat solution in 1N sulphuric acid – 4–5 min 3. Tap water – 2 changes, 5 min each 4. Distilled water – rinse

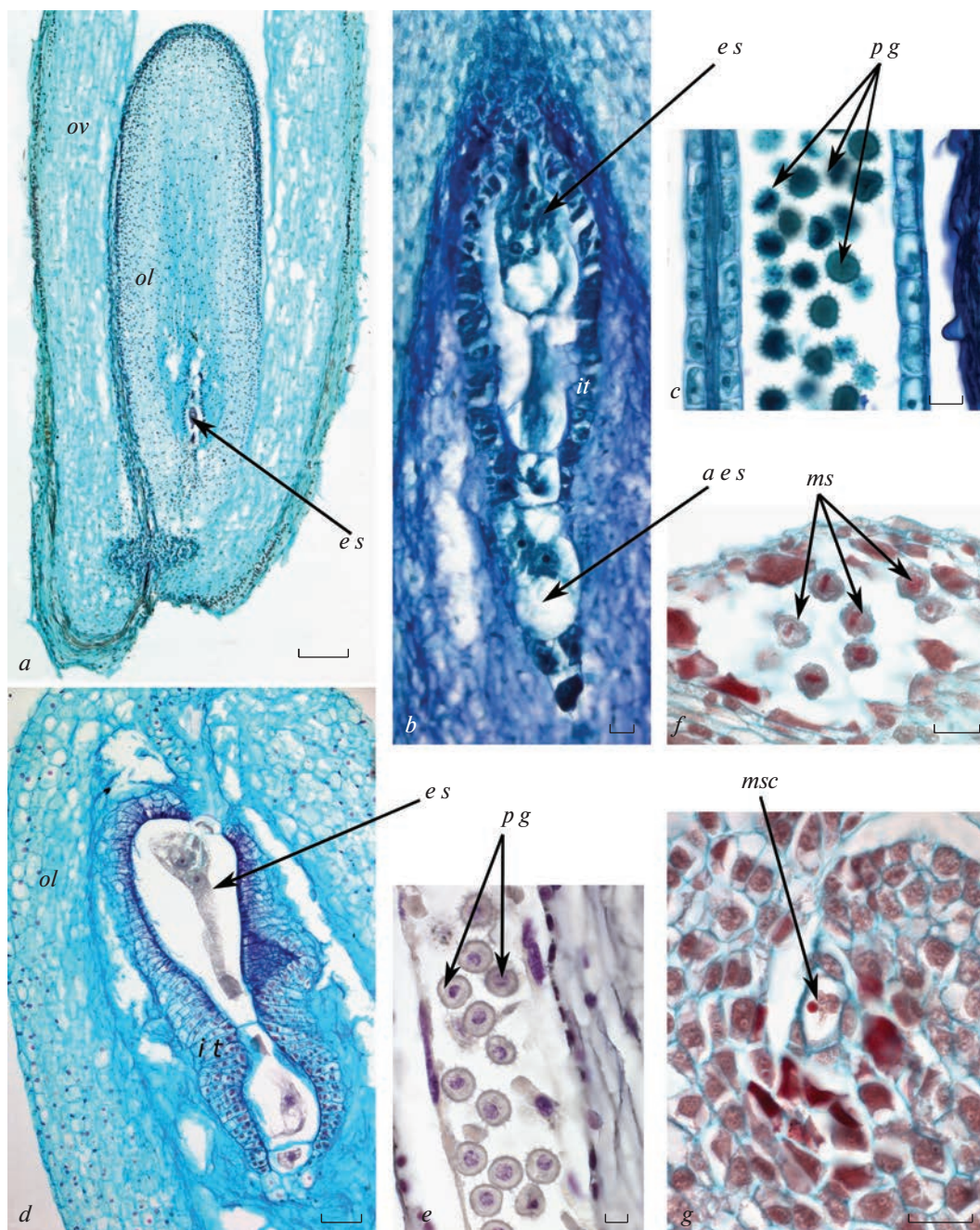
Таблица 2. Окончание

Окраска толуидиновым синим/Toluidine blue staining O'Brien et al., 1964; Parker et al., 1982, Permyakov, 1988; Voronova, 2008	
	5. Schiff's reagent – 30–40 min 6. Sulphurous waters – 3 changes, 2 min each 7. Tap water – 10 min 8. Distilled water – 10 min 9. 70° ethanol – rinse 10. 96° ethanol – 10 min 11. Mounting Total time – from 2 h 50 min (without dewaxing)
Реактивы Reagents	Реактив Шиффа, сернистые воды – по Kamelina et al. (1992) Фуксин основной для фуксинсернистой кислоты (Реахим) Натрий сернистокислый безводный (Реахим) Натрий йоднокислый (Reanal) 1% раствор в 1N серной кислоте Для получения 100 мл 1N (однонормального, или нормального) раствора серной кислоты необходимо 2.8 мл концентрированной серной кислоты и 97.2 мл воды Preparation of Schiff's reagent, sulphurous waters – according to Kamelina et al. (1992) Basic fuchsin for fuchsin-sulfurous acid (Reahim) Sodium sulphite, anhydrous (Reahim) Sodium periodate (Reanal), 1% solution in 1N sulphuric acid For 100 ml 1N (mononormal, or normal, or standard) solution 2.8 ml of strong sulphuric acid and 97.2 ml of water are needed
Просветление метилбензоатом/Clarification with methyl benzoate Prozina, 1960; Voronova, 2008	
Последовательность действий Sequence of actions	1. Спирт этиловый 80° – 15–30 мин 2. Спирт этиловый 90° – 15–30 мин 3. Спирт этиловый 96° – 15–30 мин 4. Смесь I – 15–30 мин 5. Смесь II – 15–30 мин 6. Смесь III – 15–30 мин 7. Метилбензоат – 15–30 мин 1. 80° ethanol – 15–30 min 2. 90° ethanol – 15–30 min 3. 96° ethanol – 15–30 min 4. Mixture I – 15–30 min 5. Mixture II – 15–30 min 6. Mixture III – 15–30 min 7. Methyl benzoate – 15–30 min
Реактивы Reagents	Смесь I – 1 часть метилбензоата: 2 части 96° этилового спирта; Смесь II – 2:2 Смесь III – 2:1 Метилбензоат (Acros) Mixture I – methyl benzoate: 96° ethanol 1:2 by volume; Mixture II – 2:2 Mixture III – 2:1 Methyl benzoate (Acros)

Окраска гематоксилином по Эрлиху

Данный метод предполагает сочетание гематоксилина по Эрлиху с алциановым синим, что соответствует окраске последними двумя компонентами “тройной окраски” (по Kamelina et al., 1992).

При данном способе окраски, как и при использовании гематоксилина по Гейденгайну, для препаратов подсолнечника возникали сложности с окрашиванием клеточных стенок алциановым синим и требовалось увеличение времени воздей-



ствия данного реагента или проведение окраски при температуре 60° (в термостате).

Хорошие результаты показало использование красителей в обратном порядке — сначала гематоксилином, затем алциановым синим (рис. 2a). При этом алциановый синий дает более яркую окраску за счет того, что меньше вымывается, а гематоксилин, напротив, подвергается некоторой дифференцировке в уксусной кислоте, используемой перед переносом препаратов в алциановый синий.

Для уменьшения времени окраски по данной схеме можно заменять алциановый синий на толуидиновый синий (рис. 2b, c), который окрашивает срезы в течение 5 мин или менее. Несмотря на существенные различия свойств этих красителей, они дают похожие результаты (визуализацию клеточных стенок).

При использовании в данной схеме окраски алцианового синего во избежание его вымывания перед заключением препаратов в монтировочные среды вместо обработки 96° спиртом подсушивали препараты в термостате для их обезвоживания.

Рис. 2. Примеры окраски репродуктивных структур подсолнечника (*Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus*, *Helianthus ciliaris*) гематоксилином по Эрлиху, реактивом Шиффа и сафранином. *a* – гематоксилин по Эрлиху с последующей последующей подкраской алциановым синим (часть завязи с семязачатком и зародышевым мешком, продольный срез), *b* – гематоксилин по Эрлиху с последующей подкраской толуидиновым синим (семязачаток с зародышевым мешком, видна яйцеклетка, продольный срез), *c* – гематоксилин по Эрлиху с последующей подкраской толуидиновым синим (гнездо пыльника, продольный срез), *d* – реактив Шиффа с подкраской алциановым синим; до окраски материал был просветлен раствором хлоралгидрата (зародышевый мешок перед оплодотворением, продольный срез), *e* – реактив Шиффа с подкраской толуидиновым синим (пыльник с формирующимися пыльцевыми зернами, продольный срез), *f, g* – сафранин с алциановым синим (*f* – первое деление ядер микроспор, поперечный срез, *g* – семязачаток с мегаспороцитом, продольный срез). *a, f, g* – *H. tuberosus*, *b, c* – *H. annuus* ВК-571, *d, e* – *H. ciliaris*. *a e s* – апо-спорический зародышевый мешок, *e s* – зародышевый мешок, *i t* – интегументальный тапетум, *ms* – microspore, *msc* – megasporocyte, *ol* – семязачаток, *ov* – завязь, *p g* – пыльцевое зерно. Линейка: *a* – 200 мкм, *b, c, e, f, g* – 20 мкм, *d* – 50 мкм.

Fig. 2. The illustrations of sunflower's (*Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus*, *Helianthus ciliaris*) reproductive structures staining by Erlich's haematoxyline, by Schiff's reagent and by safranin. *a* – Ehrlich's haematoxylin stained with alcian blue as a counter-stain (part of the ovary with ovule and embryo sac, longitudinal section), *b* – Ehrlich's haematoxylin counter-stained with toluidine blue (ovule with embryo sac, egg is visible, longitudinal section), *c* – Ehrlich's haematoxylin with toluidine blue (anther's locule, longitudinal section), *d* – Schiff's reagent with alcian blue; the material was clarified with a solution of chloral hydrate before staining (embryo sac before fertilization, longitudinal section); *e* – Schiff's reagent with toluidine blue (anther with developing pollen grains, longitudinal section), *f, g* – safranin and alcian blue (*f* – first division of microspore nuclei, transverse section, *g* – ovule with megasporocyte, longitudinal section). *a, f, g* – *H. tuberosus*; *b, c* – *H. annuus* ВК-571; *d, e* – *H. ciliaris*. *a e s* – aposporic embryo sac, *e s* – embryo sac, *i t* – integumental tapetum, *ms* – microspore, *msc* – megasporocyte, *ol* – ovule, *ov* – ovary, *p g* – pollen grain. Bars: *a* – 200 μm, *b, c, e, f, g* – 20 μm, *d* – 50 μm.

В случае замены этого красителя на толуидиновый синий, препараты выдерживали в спирте в течение 10 мин.

Как и при окраске гематоксилином по Гейденгайну, при использовании данного метода возможно слишком интенсивное окрашивание цитоплазмы некоторых структур (пыльцевые зерна, элементы зародышевого мешка на ранних стадиях развития), при этом хуже могут просматриваться ядра (рис. 2с).

В качестве методов окрашивания, дающих хорошее качество окраски и возможность рассмотреть как мужские, так и женские репродуктивные структуры видов подсолнечника на разных стадиях их развития, хорошо зарекомендовали себя методы окрашивания реактивом Шиффа и сафранином.

Окраска реактивом Шиффа

Данный метод также основан на модификации тройной окраски (Kamelina et al., 1992), при которой из протокола был исключен гематоксилин по Эрлиху, так как при его использовании некоторые структуры слишком переокрашиваются.

Окраска реактивом Шиффа позволяет выявить особенности строения некоторых тканей, а также расположение ядер в клетках. При хорошем качестве реактивов изображение получается достаточно четким и не перегружено темными тонами (рис. 2д).

В то же время этот способ окраски, по сравнению с другими методами, более трудоемкий, занимает больше времени, а реактив Шиффа требует особых условий хранения, и при их нарушении (например, колебания температуры, влажности,

которые могут произойти из-за нестабильной работы холодильного оборудования, перебоев в электроснабжении) теряет красящие свойства.

В данном протоколе (табл. 2) возможна замена алцианового синего на толуидиновый синий (рис. 2е). В этом случае после завершения окраски препараты обезживают в 96° спирте в течение 10 мин.

В некоторых случаях, когда после обработки реактивом Шиффа полученная окраска оказывается слишком бледной, мы использовали гематоксилин по Эрлиху, уменьшая время его воздействия до 5–7 мин, до окраски алциановым синим (в табл. 2 после п. 12 нижеприведенной схемы: вода дистиллированная – 2 смены по 10 мин; гематоксилин по Эрлиху – 5–7 мин; вода водопроводная – 20 мин; и далее от п. 13).

Окраска сафранином с алциановым синим

Упоминание о применении сафранина в сочетании с алциановым синим можно встретить в различных работах (Spicer, 1960, Gusel'nikova, 2016). Особенно широко используются сафранин с алциановым синим в области зоологии, где эта комбинация красителей, иногда с дополнительной подкраской, часто применяется для выявления мукополисахаридов. Также этот метод окраски (иногда алциановый синий заменяют красителем лихт-грюн) является одним из традиционно применяемых в эмбриологии растений.

В ботанической микротехнике существуют различные способы приготовления сафранина и сочетания с другими красителями, применяемые для окрашивания ядер и клеточных оболочек. Они подробно описаны в справочниках

М.Н. Прозиной (Prozina, 1960) и Р.П. Барыкиной с соавторами (Barykina et al., 2000).

При окраске нашего материала по предложенным методикам мы столкнулись с практически полным вымыванием сафранина на последующих этапах окрашивания. В связи с этим возникла необходимость модифицировать методику. Примененный нами метод позволил достаточно быстро получить препараты с четкой контрастной окраской.

Экспериментальным путем мы подобрали два варианта модификации протокола для окраски препаратов подсолнечника. В первом варианте сначала окрашивали сафранином, затем алциановым синим, во втором, наоборот, — сначала алциановым синим, затем сафранином. Для предотвращения вымывания сафранина мы сократили до минимума (менее 1 мин) время нахождения препаратов в растворах уксусной кислоты и спиртов. Оба варианта дают примерно одинаковые результаты, поэтому можно одновременно окрашивать две партии препаратов, одну в прямой последовательности, другую — в обратной, что сокращает общее время обработки.

В первом варианте в растворе алцианового синего препараты окрашивали в течение 10 мин, что не приводило к значительному вымыванию сафранина, в растворе которого препараты выдерживались в течение 2.5–3 часов. (рис. 2*f*, *g*). Во втором варианте время окраски в алциановом синем составляло от 45 мин до 1.5 ч; в растворе сафранина окрашивали в течение 1 ч.

В обоих вариантах перед наклеиванием покровных стекол препараты высушивали в термостате при температуре 60°C и погружали в ксилол на 5–10 мин.

ШИК-реакция

Несмотря на то, что данная методика (McManus, 1948; Jensen, 1965) применяется для выявления нерастворимых углеводов, эта окраска позволяет визуализировать строение исследуемых структур, т.к. окрашивается не только крахмал внутри клетки (которого у подсолнечника немного, основным запасующим веществом являются жиры), но и полисахариды клеточных стенок, и для всех исследуемых образцов дала хорошие результаты.

Необходимо отметить, что вместо водного раствора йодной кислоты можно использовать и ее производные (например, водный раствор перйодата калия, растворы йодата натрия или йодата калия в 0.3–0.5% растворе азотной кислоты; перйодная кислота в водном или спиртовом растворе ацетата натрия), длительность воздействия которых на материал различна (Lillie, 1954). Мы использовали 1% раствор перйодата калия или натрия в 1N (однонормальной) серной кислоте.

Возможно дополнительное окрашивание срезов светлым зеленым, гематоксилином или другими красителями, о чем говорится в ряде публикаций (Jensen, 1965; Barykina et al., 2000). Однако в нашей работе в этом не было необходимости, изображение получалось четким, контрастным, не перегруженным темными тонами.

Окраска ацетокармином

Метод окраски раствором ацетокармина хорошо подходит для определения качества пыльцы у подсолнечника. Обычно при его использовании рекомендуется нагревать пыльцу в капле ацетокармина непосредственно на предметном стекле (Barykina et al., 2000). Однако при необходимости исследовать большое количество образцов, удобнее и рациональнее окрашивать раствором ацетокармина свежие или зафиксированные пыльники в лунках пластикового планшета или любого аналогичного предмета (например, блистера) в термостате при температуре +60°C в течение 2 ч (Voronova, Gavrilova, 2019).

Для получения постоянных препаратов в качестве монтировочной среды целесообразно использовать поливиниловый спирт Mowiol (Fluka, Germany) или глицерин-желатин (Barykina et al., 2004). Такие препараты перед просмотром сушат в течение суток.

Удаление парафина

В приводимых схемах для удаления парафина перед началом окраски указан раствор BioClear (Bio-Optica), но он может быть заменен на более привычные ксилол или толуол.

BioClear позволяет более полно и аккуратно удалить парафин и лучше отмывается с поверхности стекол при дальнейшей обработке, кроме того, производитель указывает на его низкую токсичность, меньшую летучесть и меньшую пожароопасность по сравнению с ксилолом (BioClear..., 2022).

В таблице 2 данный этап вместе с обработкой 96° спиртом и дистиллированной водой обозначен как “депарафинирование”.

Обезвоживание материала и заключение в монтировочную среду

Для изготовления постоянных препаратов, как правило, использовались монтировочные среды на основе ксилола: канадский бальзам или Bio-Mount (Bio-Optica). Для более полного обезвоживания и удаления остатков спирта после окраски мы подсушивали предметные стекла на воздухе при комнатной температуре. Если на стекле оставались единичные капли, осторожно удаляли их фильтровальной бумагой. В том случае, если препараты после окраски не обезвоживались в 96°

спирте или погружались в него на короткое время (менее 1 минуты) для ускорения процесса сушки, обезвоживание препаратов перед переносом в ксилол осуществлялось в термостате при температуре 60°C. После сушки препараты помещали в ксилол согласно общепринятой методике.

Монтировочные среды на основе поливинилового спирта (Mowiol, Fluka, Germany) позволяют ускорить процесс окраски, так как исключают процедуру обезвоживания. Тем не менее, нами они применялись ограниченно – для препаратов пыльцы, окрашенной ацетокармином, не требующих длительного хранения. Это связано с меньшим сроком хранения таких препаратов, а также из-за агрессивного воздействия полинилового спирта на некоторые красители (например, толуидиновый синий), разрушающего их красящие свойства.

Последние этапы изготовления препаратов, включающие подсушивание, обработку ксилолом и наклеивание покровного стекла в таблице 2 обозначены как “заключение в монтирующую среду”.

Методы просветления для изучения структуры семязачатка подсолнечника

Одним из способов, позволяющих быстро оценить стадию развития семязачатка, проверить наличие зародыша и эндосперма, обнаружить апо-спорические зародышевые мешки, является приготовление тотальных препаратов семязачатков с обработкой просветляющими жидкостями.

Для просветления семязачатков подсолнечника мы использовали метилбензоат (Voropova, 2008), хлоралгидрат, реагент BioClear. Перед просветлением материал, зафиксированный в фиксаторе FAA (формалин, уксусная кислота и этиловый спирт в соотношении 100 : 7 : 7 мл) отмыли и переводили в 70° спирт.

Просветление метилбензоатом

Для постепенного замещения спирта метилбензоатом материал проводят через серию смесей (табл. 2). Необходимо иметь в виду, что на заключительных стадиях проводки (в смеси III) материал становится полупрозрачным и плохо заметным в растворе. Из чистого метилбензоата семязачатки переносятся на предметное стекло в каплю метилбензоата – для изготовления временных препаратов, или в каплю канадского бальзама или аналогичной монтирующей среды – для постоянных препаратов. Временные препараты можно размонтировать, материал пригоден для пропитки парафином с последующим получением срезов по общепринятой методике (Voropova, 2008).

Просветление хлоралгидратом

Семязачатки помещали в раствор хлоралгидрата на 1–2 ч перед началом наблюдения, затем их переносили на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата и закрывали покровным. Раствор хлоралгидрата для просветления готовили из расчета 5 г хлоралгидрата на 2 мл дистиллированной воды (Pausheva, 1974; Barykina et al., 2000).

Для более детального исследования и хранения временные препараты можно перевести в постоянные. Для этого необходимо: снять покровное стекло, перенести материал в 70° спирт и сделать проводку в парафин по общепринятой методике (Prozina, 1960; Barykina et al., 2000). Такие постоянные препараты не имеют каких-либо особенностей по сравнению с препаратами, изготовленными без просветления.

Просветление раствором BioClear

BioClear, используемый для удаления парафина перед окраской постоянных препаратов, характеризуется просветляющими свойствами и дает удовлетворительные результаты при изготовлении временных препаратов.

Для просветления данным раствором материал, хранящийся в 70° спирте, был переведен в абсолютный спирт или Dehyol Absolute (Bio-Optica), а затем помещен в BioClear (2 смены по 30 минут). Затем материал переносили в свежий раствор BioClear, в котором материал находился в течение 2–3 суток до начала наблюдения.

В отличие от метилбензоата и хлоралгидрата, материал, просветленный с помощью BioClear, использовать для получения срезов пока не удалось. В опыте к семязачаткам в растворе Bio Clear была добавлена парафиновая стружка, емкости были установлены в термостат при температуре +60°C. После испарения растворителя (около 1 месяца) вокруг материала обнаружилось тягучее липкое вещество, сохранялся характерный запах Bio Clear, дальнейшая обработка материала для изготовления срезов была невозможна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при окрашивании препаратов представителей рода *Helianthus* по общераспространенным стандартным методикам окраски (Barykina et al., 2000; Zhinkina, Voronova, 2000; Kamelina et al., 1992) некоторые красители дают слишком бледную окраску (например, алциановый синий) или практически полностью вымываются на следующем этапе обработки (например, сафранин). Для устранения этих недостатков были адаптированы классические схемы окраски препаратов за счет следующих приемов:

- увеличения длительности воздействия красителей;
- воздействия повышенной температуры при окраске;
- сокращения времени воздействия веществ (например, спирт, уксусная кислота), вымывающих краситель, но необходимых для некоторых этапов окраски (например, обезвоживание спиртом перед переводом препаратов в ксилол);
- смены очередности красителей;
- изменения способа обезвоживания препаратов (сушка в термостате вместо обработки спиртом).

Анализ различных протоколов окраски показал, что, применяя эти модификации, для подсолнечника можно использовать практически все классические красители, применяемые для визуализации структур при световой микроскопии (гематоксилин, фуксин, сафранин, толуидиновый синий и др.). Однако, следует отметить, что окраску толуидиновым синим лучше применять в начале исследования, она позволяет быстро получить представление о внутреннем строении объекта исследования, уточнить стадии развития зафиксированного материала и подобрать наиболее подходящие параметры дальнейшей гистологической обработки (толщина срезов, красители и др.).

Окрашивание гематоксилином по Гейденгайну дает хорошие результаты и является одним из оптимальных вариантов окраски для изучения зародышевого мешка и зародыша.

Гематоксилин по Эрлиху может быть применен при исследовании семязачатка до формирования зародышевого мешка, а также пыльника до распада тетрад и формирования пыльцевых зерен. Лучшие результаты при окраске гематоксилином по Эрлиху получаются, если сначала окрашивать гематоксилином, затем алциановым синим.

Окраски реактивом Шиффа в сочетании с алциановым или толуидиновым синим и сафранином с алциановым синим подходят практически для всех репродуктивных структур на различных стадиях развития. Эти красители дают четкое, контрастное изображение ядер и клеточных стенок, изображение не перегружено темными тонами. При этом окраска сафранином занимает меньше времени и не требует специальных условий для хранения реактивов, в отличие от реактива Шиффа, который очень чувствителен к соблюдению условий его хранения.

Для определения качества пыльцы подсолнечника оптимально использовать раствор ацетокармина, при этом можно получить как временные, так и постоянные препараты.

Для просветления семязачатков подсолнечника могут быть применены хлоралгидрат, метилбензоат, реагент BioClear. Материал, обработан-

ный хлоралгидратом или метилбензоатом, после просмотра временных препаратов может быть переведен в парафин и использован для изготовления классических постоянных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь и научные консультации д.б.н. И.И. Шамрову, к.б.н. Н.А. Жинкиной, к.б.н. Г.М. Анисимовой и к.б.н. Г.Ю. Виноградовой (БИН РАН).

Работа выполнена в рамках государственного задания Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН № 122011900036-5 “Поливариантность морфогенетических программ развития репродуктивных структур растений, естественные и искусственные модели их реализации” (2019–2023 гг.). Для проведения исследования использовано оборудование ЦКП “Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов” Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexander M.P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. — *Stain Technology*. 11 (3): 117–123.
<https://doi.org/10.3109/10520296909063335>
- Atlagic J. 1990. Pollen fertility in some *Helianthus* L. species and their F1 hybrids with the cultivated sunflower. — *Helia*. 13: 47–54.
- Atlagic J. 1996. Cytogenetic studies in hexaploid *Helianthus* species and their F1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus*. — *Plant Breeding*. 115: 257–260.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00913.x>
- Atlagic J., Terzi'c S., Marjanovi'c-Jeromela A. 2012. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species. — *Industrial Crops and Products*. 35: 88–91.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.012>
- [Barykina et al.] Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. 2000. Основы микротехнических исследований в ботанике. М. 127 с.
- [Barykina et al.] Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М. 312 с.
- [Belyaeva] Беляева Н.С. 1975. К вопросу стерильности топинамбура (развитие женского гаметофита). — *Изв. Академии наук Туркменской ССР. Серия Биологических наук*. 4: 37–43.
- [Benetskaya] Бенецкая Г.К. 1952. Оплодотворение и эмбриогенез у подсолнечника при различных способах опыления. — *Изв. Академии наук Армянской ССР. Биол. и сельхоз. науки*. V (7): 17–33.
- [Benetskaya] Бенецкая Г.К. 1954. Оплодотворение и первые фазы эмбриогенеза у подсолнечника. — *Изв. Академии наук Армянской ССР. Биол. и сельхоз. науки*. VII (12): 7–17.

- BioClear clearing agent of terpene origin: Technical data sheet. 2017. Revised 16.05.2022. Bio-Optica Milano S.p.A. https://www.bio-optica.it/ftp/Sito/technical_data-sheet/1782_en.pdf. 2 p. (accessed 20.03.2023)
- [Diakon] Диакон И.П. 1962. Определение жизнеспособности пыльцы полевых культур с применением трифенилтетразоля хлорида. — Селекция и семеноводство. 3: 68–69.
- [Dziubenko] Дзюбенко Л.К. 1959. Цитоембріологічне дослідження жіночої генеративної зони в насінному зачатку соняшника (*Helianthus L.*). — Український ботаничний журнал. 16 (3): 8–19.
- [Efremov] Ефремов А.Е. 1967. Морфологические и цитозембріологические особенности тетраплоидного подсолнечника. — Генетика. 11: 31–36.
- [Fedorenko et al.] Федоренко Т.С., Прокопенко А.И., Данкова З.А. 1980. Влияние условий опыления на скрещиваемость при отдаленной гибридизации подсолнечника. — В кн.: Селекция и семеноводство масличных культур. Краснодар. С. 60–64.
- [Fedorenko et al.] Федоренко Т.С., Воскобойник Л.К., Прокопенко А.И. 1986. Влияние гиббереллина на формирование генеративных органов подсолнечника. — В кн.: Вопросы прикладной физиологии и генетики масличных растений. Краснодар. С. 25–30.
- Goldflus M. 1899. Sur la structure et les fonctions de l'assise epitheliale et des antipodes. — Journal de botanique. 13: 87–96.
- Gotelli M.M., Galati B.G., Medan D. 2010. Structure of the stigma and style in sunflower (*Helianthus annuus L.*). — Biocell. 34 (3): 133–138.
- [Gusel'nikova] Гусельникова В.В. 2016. Морфофункциональная характеристика популяции тучных клеток тимуса мыши: Дис. ... канд. биол. наук. СПб. 127 с.
- Herr J.M. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. — Am. J. Bot. 58: 785–790. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb10031.x>
- [Ilyina] Ильина А.И. 1957. О взаимоотношениях между зародышем и эндоспермом в семени масличных растений. — Вестник сельскохозяйственной науки. 6: 99–108.
- [Jensen] Дженсен У. Ботаническая гистохимия: Пер. с англ. 1965. 380 с.
- [Kamelina et al.] Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. 1992. К методике окраски эмбриологических препаратов. — Бот. журн. 77 (4): 93–96.
- [Konstantinova] Константинова Л.Н. 1980. Цитологические нарушения развития пыльников при гаметоцидной мужской стерильности у подсолнечника (*Helianthus annuus L.*). — Труды по прикл. бот., генет. и селекции. 67 (3): 134–140.
- Kovacic A., Vlckova V. 1988. Comparative study of embryogenesis in sunflower (*Helianthus annuus L.*). — Genetic and Plant Breeding. 24 (4): 271–280.
- Lillie R.D. 1954. Histochemical technique and practical histochemistry. Ed. 2. New York. 501 p.
- Maheswari D.H. 1963. Embryological studies in Compositae. IV. Helianthae. — Proceedings of the Indian Academy of Sciences. 58B (4): 274–290. <https://doi.org/10.1007/BF03052108>
- [Marchenko] Марченко И.И. 1968. Топинамбур — подсолнечниковые гибриды и их цитологическое исследование. — Цитология и генетика. II (1): 41–48.
- McManus J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain technol. 23: 99–108.
- [Movsesyan] Мовсесян С.Н. 1961. Изменения в зародышевом мешке подсолнечника вследствие опыления рылец стареющей пыльцой. — Изв. Академии наук Армянской ССР. Биологические науки. XIV (6): 29–37.
- [Nawaschin] Навашин С.Г. 1895. Об обыкновенной березе и о морфологическом значении халацогамии. — Труды СПб общества естествоиспытателей. Отд. Бот. 25: 5–61.
- Nawaschin S.G. 1898. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgange bei *Lilium Martagon* und *Fritillaria tenella*. — Bull. de l'Acad. des Sci. de St.-Petersbourg. 9 (4): 377–382.
- [Nawaschin] Навашин С.Г. 1900. Об оплодотворении у сложноцветных и орхидных. — Изв. Императорской Академии наук. 13 (3): 335–340.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polyhromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. — Protoplasma. 59 (2): 367–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Ochogavia A.C., Novello M.A., Bianchi M.B., Picardi L.A., Nestares G.M. 2018. Partial male sterility in Imisun sunflower: Imazapyr treatment in advanced vegetative stages decreases pollen yield and alters *ahas* gene expression. — Crop Sci. 58: 1877–1889. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.12.0726>
- Parker A.J., Haskins E.F., Deyrup-Olsen I. 1982. Toluidine blue: A simple, effective stain for plant tissues. — Amer. Biol. Teacher. 44: 487–489. <https://doi.org/10.2307/4447575>
- [Pausheva] Паушева З.П. 1974. Практикум по цитологии растений. М. 288 с.
- [Permyakov] Пермяков А.И. 1988. Микротехника. М. 58 с.
- Peterson R., Slovin J.P. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. — International Journal of Plant Biology. 1 (13): 66–69. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
- [Pirev] Пирев М.Н. 1966. Гистохимическое исследование пыльников фертильных и стерильных по пыльце форм подсолнечника. — В кн.: Биология оплодотворения и гетерозис культурных растений. Вып. 4. Кишинев. С. 98–113.
- Popielarska M. 2005. In vitro pollination of isolated ovules of sunflower (*Helianthus annuus L.*). — Acta Biologica Cracoviensia. 47 (1): 85–92.
- [Prozina] Прозина М.Н. 1960. Ботаническая микротехника. М. 206 с.
- [Pustovoi et al.] Пустовойт Г.В., Федоренко Т.С., Прокопенко А.И. 1976. Морфологическая характеристика женских генеративных органов тетраплоидного подсолнечника. — Бюллетень научно-технической информации по масличным культурам ВНИИ масличных культур. 3: 13–16.

- [Selivanov] Селиванов Е.В. 2003. Красители в биологии и медицине. Справочник. Барнаул. 40 с.
- Spicer S.S. 1960. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. — *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 8 (1): 18–35. <https://doi.org/10.1177/8.1.18>
- [Tatintseva] Татинцева С.С. 1971. Развитие мужского гаметофита топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). — Изв. Академии наук Туркменской ССР. Серия биологических наук. 1: 14–21.
- Telżyńska J., Telżyński H., 1973. Double fertilization in *Helianthus*. — *Societatis Botanicorum Poloniae*. XLII (2): 323–343. <https://doi.org/10.5586/asbp.1973.025>
- [Toderich] Тодерич К.Н. 1988. Эмбриология подсолнечника (*Helianthus annuus*, *H. rigidus* и другие): Дис. ... канд. биол. наук. Л. 256 с.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1951а. Случаи апоспории у подсолнечника. — *Природа*. 8: 43–45.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1951б. Эмбриологический анализ завязей подсолнечника при опылении смесью пыльцы. — *Агробиология*. 3: 104–113.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1954. Влияние количества и разнообразия пыльцы на оплодотворение и развитие зародыша у подсолнечника. — Изв. Академии наук СССР. Серия биологическая. 5: 74–87.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1955. Явление апоспории у подсолнечника. — Доклады Академии наук СССР. 100 (6): 1163–1166.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1964а. Изменчивость женского гаметофита у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). — Бюл. МОИП. Отдел биологический. 69 (4): 111–117.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1964б. Процесс оплодотворения и эмбриогенез у подсолнечника при разных условиях опыления. — В кн.: Проблемы современной эмбриологии. М. 566 с.
- [Ustinova] Устинова Е.И. 1970. Апомиксис у подсолнечника. — В кн.: Апомиксис и селекция. М. С. 110–116.
- [Voronova] Воронова О.Н. 2008. Экспресс-анализ методом просветления и его использование в эмбриологии. — *Бот. журн.* 93 (10): 1620–1625.
- [Voronova et al.] Воронова О.Н., Гаврилова В.А., Толстая Т.Т., Рожкова В.Т. 2011. Определение фертильности пыльцы у ряда диких многолетних видов и образцов подсолнечника из коллекции, произрастающей на Кубанской станции ВИР. — Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 167: 145–158.
- [Voronova, Gavrilova] Воронова О.Н., Гаврилова В.А. 2019. Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе. — Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 180 (1): 95–104. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
- [Zhinkina, Voronova] Жинкина Н.А., Воронова О.Н. 2000. К методике окраски эмбриологических препаратов. — *Бот. журн.* 85 (6): 168–171.

OVERVIEW OF TECHNIQUES TO PREPARE LIGHT MICROSCOPIC MOUNTS OF *HELIANTHUS* (ASTERACEAE) REPRODUCTIVE STRUCTURES

A. A. Babro^{a,#} and O. N. Voronova^{a,##}

^aKomarov Botanical Institute RAS
Prof. Popov Str., 2, St. Petersburg, 197022, Russia

[#]e-mail: ABabro@binran.ru

^{##}e-mail: o_voronova@list.ru

There are many investigations concerning material processing and staining of permanent or temporal mounts for light microscopy, and there are many works on *Helianthus* embryology either with the description of the methods or without it. Our aim was to make a review of these methods and to customize existing methods of permanent and temporal mounts staining for the work with representatives of the genus *Helianthus* to get good quality photo images.

Wild perennial species *Helianthus ciliaris*, *H. tuberosus*, *H. maximilianii*, as well as cultivated forms of annual sunflower *H. annuus* were included in our research. The most of methods were worked out on *H. ciliaris*, and then were successfully used in the work with other *Helianthus* species listed above.

When following classical methods, some stains become very pale or wash out completely during processing of the sunflower mounts. We developed some practices to avoid these failures. They are: prolongation of stains exposure; staining at higher temperature; reducing the time of processing by ethanol, acetic acid and other substances that can wash out the stain; changing the order of stains exposure; changing the way of mounts dehydration (drying in thermostat instead of treatment by absolute ethanol).

We found out optimal techniques for staining of male and female reproductive structures of sunflower and the methods suitable for all structures: toluidine blue, Schiff's reactive with alcian or toluidine blue as counter-stains, safranin with alcian blue. It is convenient to use acetocarmine solution for the estimation of sunflower pollen viability.

Chloral hydrate, methyl benzoate or "Bio Clear" solution are applicable reagents for clearing ovules. The material after chloral hydrate or methyl benzoate is satisfactory to embed in paraffin and to make permanent mounts.

Keywords: *Helianthus*, staining methods, clearing methods, permanent mounts

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Doctor of Biological Sciences I.I. Shamrov, and to Candidates of Biological Sciences N.A. Zhinkina, G.M. Anisimova and G.Yu. Vinogradova for their help and advice.

The research was carried out within the framework of the institutional research project of the Komarov Botanical Institute of RAS "Polyvariation of morphogenetic developmental programs of plant reproductive structures, natural and artificial models of their realization" (state registration number 122011900036-5). The equipment of Center for Collective Usage "Cell and molecular technologies of plants and fungi research" of the Komarov Botanical Institute of RAS (Saint-Petersburg) was operated in the course of our investigation.

REFERENCES

- Alexander M.P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. – *Stain Technology*. 11 (3): 117–123.
<https://doi.org/10.3109/10520296909063335>
- Atlagic J. 1990. Pollen fertility in some *Helianthus* L. species and their F1 hybrids with the cultivated sunflower. – *Helia*. 13: 47–54.
- Atlagic J. 1996. Cytogenetic studies in hexaploid *Helianthus* species and their F1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus*. – *Plant Breeding*. 115: 257–260.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00913.x>
- Atlagić J., Terzić S., Marjanović-Jeromela A. 2012. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species. – *Industrial Crops and Products*. 35: 88–91.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.012>
- Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhali-lova H.H., Ilyina G.M., Chubatova N.V. 2000. Osnovy mikrotekhnicheskikh issledovaniy v botanike [The basics of microtechnical investigations in botany]. Moscow. 127 p. (In Russ.).
- Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhali-lova H.H., Ilyina G.M., Chubatova N.V. 2004. Spravochnik po botanicheskoy mikrotekhnike. Osnovy i metody [The handbook on botanical microtechnique. Basics and methods]. Moscow. 312 p. (In Russ.).
- Belyaeva N.S. 1975. K voprosu sterilnosti topinambura (razvitie zhenskogo gametophyta) [Concerning *Helianthus tuberosus* sterility (female gametophyte development)]. – *Izv. AN Turkmenskoy SSR. Ser. Biol.* 4: 37–43 (In Russ.).
- Benetskaya G.K. 1952. Oplodotvoreniye i embryogenez u podsolnechnika pri razlichnykh sposobakh opyleniya [Fertilization and embryogenesis in sunflower with different ways of pollination]. – *Izv. AN Armyanskoy SSR. Biol. i selkhoz. nauki*. V (7): 17–33 (In Russ.).
- Benetskaya G.K. 1954. Oplodotvoreniye i pervye fazy embryogeneza u podsolnechnika [Fertilization and first phases of embryogenesis in sunflower]. – *Izv. AN Armyanskoy SSR. Biol. i selkhoz. nauki*. VII (12): 7–17 (In Russ.).
- BioClear clearing agent of terpene origin: Technical data sheet. 2017. Revised 16.05.2022. Bio-Optica Milano S.p.A. https://www.bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/1782_en.pdf. 2 p. (accessed 20.03.2023)
- Diakon I.P. 1962. Opredeleniye zhiznesposobnosti pyl'tsy polevykh kultur s primeneniyem trifeniltetrazolya khlorida [Evaluation of pollen viability in field crops using trifeniltetrasole chloride]. – *Selektsiya i semenovodstvo*. 3: 68–69.
- Dziubenko L.K. 1959. Cytoembryological investigation of the female generative zone in the ovule in *Helianthus* L. – *Ukr. bot. zhurn.* 16 (3): 8–19 (In Ukr.).
- Efremov A.E. 1967. Morphological and cytoembryological characteristics of the tetraploid sunflower. – *Russian Journal of Genetics*. 11: 31–36 (In Russ.).
- Fedorenko T.S., Prokopenko A.I., Dankova Z.A. 1980. Vliyaniye usloviy opyleniya na skreshchivayemost' pri ot-dalennoy gybridizatsii podsolnechnika [The influence of pollination conditions on the combining ability in the course of distant hybridization of sunflower.]. – In: *Selektsiya i semenovodstvo maslichnykh kultur*. Krasnodar. P. 60–64 (In Russ.).
- Fedorenko T.S., Voskoboinik L.K., Prokopenko A.I. 1986. Vliyaniye gibberellina na formirovaniye generativnykh organov podsolnechnika [The influence of gibberelline on generative organs' formation in sunflower]. – In: *Voprosy prikladnoy fiziologii i genetiki maslichnykh rasteniy*. Krasnodar. P. 25–30 (In Russ.).
- Goldflus M. 1899. Sur la structure et les fonctions de l'assise épithéliale et des antipodes. – *Journal de Botanique*. 13: 87–96.
- Gotelli M.M., Galati B.G., Medan D. 2010. Structure of the stigma and style in sunflower (*Helianthus annuus* L.). – *Biocell*. 34 (3): 133–138.
- Gusel'nikova V.V. 2016. Morfofunktsional'naya kharakteristika populyatsii tuchnykh kletok timusa myshi [Morpho-functional characteristic of mast cells population

- in the thymus of mouse]. Diss. Kand. Sci. Saint Petersburg. 127 p. (In Russ.).
- Herr J.M. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. — *Am. J. Bot.* 58: 785–790.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb10031.x>
- Ilyina A.I. 1957. Embryo and endosperm in oil seed. *Vestnik sel'skohozyaystvennoy nauki.* 6: 99–108 (In Russ.).
- Jensen W.A. 1965. Botanical histochemistry. Principles and practice. Translated from English. Moscow. 380 p. (In Russ.).
- Kamelina O.P., Proskurina O.B., Zhinkina N.A. 1992. On staining technique of embryological slides. — *Bot. Zhurn.* 77 (4): 93–96 (In Russ.).
- Konstantinova L.N. 1980. Cytological disturbances in the process of anther development as a result of gametocyte sterility in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). — Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 67 (3): 134–140 (In Russ.).
- Kovacic A., Vlckova V. 1988. Comparative study of embryogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). — *Genetic and Plant Breeding.* 24 (4): 271–280.
- Lillie R.D. 1954. Histopathologic technique and practical histochemistry. Ed. 2. New York. 501 p.
- Maheswari D.H. 1963. Embryological studies in Compositae. IV. Helianthae. — Proceedings of the Indian Academy of Sciences. 58B (4): 274–290.
<https://doi.org/10.1007/BF03052108>
- Marchenko I.I. 1968. Jerusalem artichoke-sunflower hybrids and their cytological investigation. — *Cytology and Genetics.* II (1): 41–48 (In Russ.).
- McManus J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain technol.* 23: 99–108.
- Movsesyan S.N. 1961. Izmeneniya v zarodyshevom meshke podsolnechnika vsledstviye opyleniya rylets stareyushey pyltsoy [The shifts in sunflower's embryo sac as a result of pollination of stigmas with senescent pollen]. — *Izv. AN Armyanskoy SSR. Biol. nauki.* XIV (6): 29–37 (In Russ.).
- Nawaschin S.G. 1895. Ob obyknovennoy bereze i o morfologicheskoy znachenii khalazogamii [On the common birch and on the morphological significance of chalazogamy]. — *Trudy SPb Obschestva estestvoispytateley. Otd. bot.* 25: 5–61 (In Russ.).
- Nawaschin S.G. 1898. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium Martagon* und *Fritillaria tenella*. — *Bull. De l'Acad. des Sci. de St.-Petersbourg.* 9 (4): 377–382.
- Nawaschin S.G. 1900. On fertilization in Compositae and Orchidaceae. — *Izvestiya Imperatorskoy Akademii nauk.* 13 (3): 335–340 (In Russ.).
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. — *Protoplasma.* 59 (2): 367–373.
<https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Ochogavia A.C., Novello M.A., Bianchi M.B., Picardi L.A., Nestares G.M. 2018. Partial male sterility in Imisun sunflower: Imazapyr treatment in advanced vegetative stages decreases pollen yield and alters *ahas* gene expression. — *Crop Sci.* 58: 1877–1889.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2017.12.0726>
- Parker A.J., Haskins E.F., Deyrup-Olsen I. 1982. Toluidine blue: A simple, effective stain for plant tissues. — *Am. Biol. Teacher.* 44: 487–489.
<https://doi.org/10.2307/4447575>
- Pausheva Z.P. 1974. Prakticum po tsitologii rasteniy [The practicum on plant cytology]. Moscow. 288 p. (In Russ.).
- Permyakov A.I. 1988. Mikrotekhnika [Microtechnique]. Moscow. 58 p. (In Russ.).
- Peterson R., Slovin J.P. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. — *International Journal of Plant Biology.* 1 (13): 66–69.
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
- Pirev M.N. 1966. Gistokhimicheskoye issledovaniye pyl'nikov fertil'nykh i steril'nykh po pyl'tse form podsolnechnika [Gistochemical study of anthers of sunflower forms with fertile and sterile pollen.]. — In: *Biologiya oplodotvoreniya i geterozis kulturnykh rasteniy [Fertilization biology of and heterosis in cultivated plants].* Iss. 4. Kishinev. P. 98–113 (In Russ.).
- Popielarska M. 2005. In vitro pollination of isolated ovules of sunflower (*Helianthus annuus* L.). — *Acta Biologica Cracoviensia.* 47 (1): 85–92.
- Prozina M.N. 1960. Botanicheskaya mikrotekhnika [The botanical microtechniques]. Moscow. 206 p. (In Russ.).
- Pustovoi G.V., Fedorenko T.S., Pokopenko A.I. 1976. Morfologicheskaya kharakteristika zhenskikh generativnykh organov tetraploidnogo podsolnechnika [Morphological characteristics of female generative organs in tetraploid sunflower]. — *Bulletin nauchno-tekhnikheskoy informatsii po maslichnym kulturam VNIIMK.* 3: 13–16 (In Russ.).
- Selivanov E.V. 2003. Krasiteli v biologii i meditsine. Spravochnik. [The stains in biology and medicine. The handbook]. Barnaul. 40 p. (In Russ.).
- Spicer S.S. 1960. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. — *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 8 (1): 18–35.
<https://doi.org/10.1177/8.1.18>
- Tatintseva S.S. 1971. The development of male gametophyton of *Helianthus tuberosus* L. — *Izvestiya Akademii nauk Turkmenskoy SSR. Seriya biologicheskikh nauk.* 1: 14–21 (In Russ.).
- Telzyńska J., Telzyński H. 1973. Double fertilization in *Helianthus*. — *Societatis Botanicorum Poloniae.* XLII (2): 323–343. <https://doi.org/10.5586/asbp.1973.025>
- Toderich K.N. 1988. Embryologiya podsolnechnika (*Helianthus annuus*, *H. rigidus* i drugiye) [Embryology of sunflower (*Helianthus annuus*, *H. rigidus* and others)]: Diss. ... cand. sci. Leningrad. 256 p. (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1951a. Sluchay aposporii u podsolnechnika [The cases of apospory in sunflower]. — *Priroda.* 8: 43–45 (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1951b. Embriologicheskii analiz zavyazey podsolnechnika pri opylenii smes'yu pylttsy [Embryological analysis of sunflower ovaries in the case of pollination by pollen mix]. — *Agrobiologiya.* 3: 104–113 (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1954. Vliyaniye kolichestva i raznoobraziya pylttsy na oplodotvoreniye i razvitiye zarodysha u

- podsolnechnika [The effect of pollen quantity and diversity on fertilization and embryo development in sunflower]. – *Izvestiya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskaya*. 5: 74–87 (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1955. Yavleniye aposporii u podsolnechnika [The phenomenon of apospory in sunflower]. – *Dokl. AN SSSR*. 100 (6): 1163–1166 (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1964a. The variability of female gametophyte by sunflower (*Helianthus annuus* L.). – *Byul. MOIP. Otd. Biol.* 69 (4): 111–117 (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1964b. Process oplodotvoreniiya i embryogenez u podsolnechnika pri raznykh usloviyakh opyleniya [Fertilization process and embryogenesis in sunflower under different conditions of pollination]. – In: *Problemy sovremennoy embryologii* [Problems of modern embryology]. Moscow. 566 p. (In Russ.).
- Ustinova E.I. 1970. Apomixis u podsolnechnika [Apomixis at sunflower]. – In: *Apomixis i selektsiya*. Moscow. P. 110–116 (In Russ.).
- Voronova O.N. 2008. Rapid analysis by clearing method and its use in embryology. – *Bot. Zhurn.* 93 (10): 1620–1625 (In Russ.).
- Voronova O.N., Gavrilova V.A., Tolstaya T.T., Rozhkova V.T. 2011. Estimation of the pollen fertility in some wild perennials species and samples of sunflower from the collection growing at Kuban experimental station of VIR. – *Bulletin of applied botany, of genetics and plant breeding*. 167: 145–158 (In Russ.).
- Voronova O.N., Gavrilova V.A. 2019. Quantitative and qualitative analysis of sunflower pollen (*Helianthus* L.) and its use in breeding work. – *Proceedings of applied botany, genetics and breeding*. 180 (1): 95–104 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104>
- Zhinkina N.A., Voronova O.N. 2000. On staining technique of embryological slides. – *Bot. Zhurn.* 85 (6): 168–171 (In Russ.).