

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

В. С. ШАРДАКОВ

РЕАКЦИЯ НА ПЕРОКСИДАЗУ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. А. Рихтером 13 XII 1939)

Определение жизнеспособности пыльцы является необходимым для решения ряда вопросов генетики, селекции, сортоизучения и физиологии репродуктивной стадии. Этому вопросу посвящен ряд работ, в особенности в отношении пыльцы плодовых деревьев (1,3).

Чаще всего определение жизнеспособности пыльцы производится путем проращивания ее на жидких или твердых средах (4-6). Однако искусственность среды и необходимость подбора ее состава и концентрации для каждого растения являются крупнейшим недостатком этой методики. Пыльца некоторых растений с трудом проращивается по этому методу (злаки, лен, хлопчатник и др.) (7,8).

Имея необходимость определить жизнеспособность пыльцы многочисленных сортов и гибридных форм хлопчатника, я в 1937 г. сделал опыт разработки более быстрого и удобного метода. Проверка метода в 1937—1939 гг. показала его пригодность.

Метод основан на открытии в пыльце фермента пероксидазы. Этот фермент, имеющий очень большое значение в окислительных процессах (9,10), необходим при энергичном дыхании пыльцы в процессе ее прорастания. Энергия окисления полифенолов за счет активного кислорода, выделяемого из перекисей пероксидазой, является, очевидно, необходимой для ряда синтетических реакций при прорастании (11). Для открытия пероксидазы мной применялся видоизмененный реактив «Nadi» (10-12). Вместо трудно доступного парафенилендиамина был взят другой диамин — бензидин (диамин-дифенил).

Состав реактива следующий. Готовятся три отдельных раствора:
I—0,20 г бензидина основного растворяется в 100 см³ 50%-ного этилового спирта;

II—0,15 г α -нафтола то же в 100 см³ 50%-ного этилового спирта;

III—0,25 г соды углекислой в 100 см³ дистиллированной воды.

Непосредственно перед употреблением эти три раствора смешиваются вместе в небольших равных объемах. Смесь растворов неустойчива и должна готовиться перед употреблением. Отдельно растворы могут храниться в темных склянках продолжительное время. Также непосредственно перед употреблением соответствующим разбавлением готовится четвертый раствор:

IV—0,3% перекиси водорода.

Определение жизнеспособности пыльцы при помощи этого реактива

производится следующим образом. На предметное стекло наносится встряхиванием пыльников или кисточкой небольшое количество исследуемой пыльцы. К пыльце прибавляется капля смеси растворов I, II и III и капля раствора IV. Пыльца и прибавленные к ней капли реактивов тщательно перемешиваются тонкой стеклянной палочкой и покрываются покровным стеклом. Через несколько минут (3—4) препарат готов для просмотра под микроскопом.

Пыльца, содержащая пероксидазу, способная к прорастанию, окрашивается в красноватый цвет. Пыльца нежизнеспособная остается бесцветной или желтоватой. Для определения процента жизнеспособной пыльцы производится, как обычно, просчет нескольких (5—6) полей зрения микроскопа.

Благодаря наличию в пыльце фермента каталазы под покровным стеклом образуются пузырьки кислорода, в особенности если раствор перекиси водорода взят слишком крепким. Для удаления пузырьков, так как они иногда мешают при подсчете, необходимо приподнять покровное стекло и повторно перемешать пыльцу с реактивом стеклянной палочкой.

Проверка применимости метода должна прежде всего привести к установлению наличия пероксидазы в пыльце возможно большего количества растений. У всех испытанных растений она, действительно, обнаруживается. Так, описанным реактивом пероксидаза открыта в пыльце: хлопчатника (*Gossypium*)—75 различных гибридных растений, сортов и видов; клеверины (*Ricinus comm.*); канатника (*Abutilon Avicennae*); кроталарии (*Crotalaria juncea*); айвы (*Cydonia vulgaris*); абрикоса (*Prunus armeniaca*)—27 сортов; сливы (*Prunus domestica*)—3 сорта; персика (*Prunus persica*)—19 сортов; миндаля (*Amigdalus comm.*)—3 сорта; яблони (*Pyrus malus*)—6 сортов; груши (*Pyrus comm.*)—2 сорта; граната (*Punica granatum*); арбуза (*Citrullus vulgaris*); дурмана (*Datura stramonium*); бальзамина (*Impatiens balsanina*) и кукурузы (*Zea mays*),—всего у 17 видов и 139 различных сортов и гибридных растений. Так как фермент обнаружен у растений, достаточно удаленных друг от друга в филогенетическом отношении, то нет оснований считать невозможным продолжение этого списка. Пероксидаза, очевидно, имеется в жизнеспособной пыльце всех растений.

Дальнейшая проверка метода должна заключаться в сопоставлении данных о жизнеспособности пыльцы, полученных описываемым методом и методами общепринятыми. Легче всего это сделать для пыльцы, которая хорошо прорастает на растворах сахара. Подобное сопоставление было произведено весной 1938 и 1939 гг. на пыльце плодовых деревьев и некоторых других растений. Пыльца растений прорастивалась на растворах сахарозы. Концентрация растворов бралась согласно литературным указаниям (1—3) или подбиралась путем опыта. Одновременно жизнеспособность тех же образцов пыльцы определялась и по описанному методу.

В 1938 г. испытанию подвергалась пыльца следующих растений: абрикоса—14 сортов; персика—10 сортов; яблони—6 сортов; миндаля—3 сорта; груши—2 сорта; сливы—3 сорта; граната, айлантуса, кроме того, кроталарии и бальзамина осенью 1937 г. За недостатком места ниже приводятся только средние расхождения между методами в найденных процентах жизнеспособной пыльцы: для абрикоса +6,23%; персика +6,18%; яблони +2,09%; миндаля +8,60%; груши +3,25%; сливы +4,73%; граната +5,1%; айлантуса +3,2%; кроталарии +4,35% и бальзамина +3,5%. В среднем для всех растений +5,03%. Превышения, отмеченные знаками+, везде в сторону описываемого метода. В двух из 43 случаев превышения наблюдались очень значительные: для урюка-сливы +30,0% и для нектарина белого +19,8%. Это объясняется тем, что концентрация раствора сахарозы была подобрана неудачно.

Весной 1939 г. по моей просьбе метод был проверен старшим научным сотрудником Таджикского научно-исследовательского института плодово-овощного хозяйства Е. Я. Ачкинадзи. С его разрешения еще не опубликованные им данные приведены ниже. Параллельные определения жизнеспособности методом проращивания на растворах сахара и реакцией на пероксидазу были произведены у 15 сортов абрикоса и 11 сортов персика. В среднем по всем сортам абрикоса расхождение равно $+2,42\%$, по персику $+2,9\%$; максимальное расхождение для абрикоса $+12,0\%$ и для персика $+6,8\%$.

Приведенные данные показывают хорошее совпадение результатов, полученных двумя сравниваемыми методами. При оценке совпадения необходимо учитывать, что сахароза, как среда для проращивания, вовсе не является идеальной как по составу, так и по консистенции (6). Так, Васильеву (13) путем добавления к раствору сахара солей бора удалось значительно повысить процент прорастания пыльцы. Кинг и Гессе (14), изучая хранение пыльцы, нашли, что 15%-ная сахароза на 2%-ном агаре является значительно лучшей средой для пыльцы плодовых деревьев, чем 15%-ная сахароза без добавления агара. К подобному же выводу пришла и Кохановская (6). Полученные превышения по обнаружению пероксидазы объясняются, очевидно, тем, что этим методом жизнеспособность пыльцы выявляется полнее.

Труднее проверить применимость метода для таких растений, как хлопчатник, пыльца которого не прорастает достаточно хорошо на искусственных средах. Проверка применимости метода для хлопчатника была произведена в 1937 г. путем сопоставления данных о жизнеспособности пыльцы хлопчатника, определенной описываемым методом, с характером его плодоношения. Предполагалось, что сорта и формы хорошо плодоносящие должны иметь, как правило, пыльцу с высоким показателем (%) жизнеспособности. И, наоборот, формы плохо плодоносящие, или стерильные, будут иметь низкий процент жизнеспособной пыльцы.

Определение наличия пероксидазы было произведено в пыльце цветов 75 различных видов, сортов и гибридных растений хлопчатника, полученных от заведующего отделом ботаники центральной селекционной станции СоюзНИХИ Н. Н. Константинова и заведующего отделом генетики той же станции В. И. Кокуева. Ими же была произведена оценка плодоношения растений.

Полученные данные, сведенные в табл. 1, показывают, что между степенью жизнеспособности пыльцы и характером плодоношения имеется довольно тесная зависимость. Количественно она выражается коэффициентом сопряженности C (контингенции) (15-16), равным 0,71. Ожидать более полной зависимости едва ли возможно ввиду того, что плодоношение (фертильность) определяется, конечно, не только качеством пыльцы. Так, если исключить формы с нераскрывающимися пыльниками, но иногда жизнеспособной пыльцой, то количественная мера связи возрастает до $C=0,80$. Относящиеся

Таблица 1

| | | Плодоношение растений | | | | Σ |
|----------------------------|--------|-----------------------|---------|--------|------------|----|
| | | хорошее | среднее | слабое | бесплодное | |
| % жизнеспособной пыльцы | 100—80 | 14 | 0 | 2 | 0 | 16 |
| | 80—60 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 |
| | 60—40 | 1 | 2 | 3 | 3 | 9 |
| | 40—20 | 0 | 0 | 7 | 1 | 8 |
| | 20—0 | 0 | 0 | 9 | 29 | 38 |
| Σ | | 17 | 2 | 23 | 33 | 75 |

$$\chi^2 = 60,90 ; P < 0,002 ; Q > 0,998 ; C = 0,71$$

сюда данные с указанным исключением помещены в табл. 2.

Наконец, в 1939 г. метод был сопоставлен с иногда применяющимися методами определения жизнеспособности пыльцы путем обработки ее раствором иода в иодистом калии и окраской ацетокармином (4), причем последний метод применялся без дальнейшего карбиологического исследования пыльцы. О жизнеспособности ее делалось заключение на основании наличия протоплазмы, окрашиваемой ацетокармином. Оба эти метода дали значительное превышение как по сравнению

с методом проращивания, так и по обнаружению пероксидазы. Так, например, для пыльцы айвы превышение жизнеспособности, определенной окраской по Беллингу, достигало + 46,2% по сравнению с методом проращивания и + 32,9% по сравнению с методом обнаруживания пероксидазы. Для того же растения реакция на крахмал дала превышения соответственно + 22,5 и + 15,2%. Столь же значительное превышение получено для кротalariaрии и египетского хлопчатника (36-М-2).

Лаборатория физиологии растений
Таджикского сельскохозяйственного института
Ленинабад

Поступило
13 XII 1939

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. Ф. Костина, Зап. Гос. Никитского бот. сада, X, вып. 1 (1928).
- ² Ф. Кобель, Научные основы плодоводства (1935).
- ³ А. В. Дорошенко, Труды прикл. бот., ген. и сел., 18, вып. 5 (1928).
- ⁴ М. С. Навашин, Методы цитологического исследования для селекционных целей (1936).
- ⁵ Л. П. Бреславец, Введение в цитологию для селекционеров (1930).
- ⁶ А. Н. Кохановская, ДАН, XXIV, № 4 (1939).
- ⁷ П. А. Баранов, Бюлл. Научно-иссл. ин-та по хлопководству, № 5 (1930).
- ⁸ N. K. Juengar, Journ. of Gen., 37, 1 (1938).
- ⁹ С. П. Костычев, Курс физиологии растений, I (1937).
- ¹⁰ А. Берто и В. Гросман, Практическое руководство по биохимии (1938).
- ¹¹ А. В. Благовещенский, Труды Московского Дома ученых, вып. 1 (1937).
- ¹² Н. Мельдрум, Клеточное дыхание (1937).
- ¹³ Ю. П. Васильев, За мичуринское плодоводство, № 4 (1937).
- ¹⁴ J. R. King a. C. O. Hesse, Proc. of the Amer. Soc. for Horticult. Sci. for 1938, 36 (1939).
- ¹⁵ Н. Ф. Деревницкий, Дополн. главы в книге Иогансена «Элементы точного учения об изменчивости и наследственности» (1933).
- ¹⁶ В. Романовский, Математическая статистика (1938).