

ТЕХНІЧНІ НАУКИ

УДК 58.087 : 581.331

АДАПТАЦІЯ МЕТОДІВ ЕЛЕКТРОННОЇ СКАНУЮЧОЇ МІКРОСКОПІЇ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПИЛКОВИХ ЗЕРЕН

*Адамчук Л. О., к. с.-г. н., доцент,
доцент кафедри стандартизації та сертифікації с.-г. продукції
Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна
ORCID 0000-0003-2015-7956*

*Сухенко В. Ю., д. т. н., професор
завідувач кафедри стандартизації та сертифікації с.-г. продукції
Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна
ORCID 0000-0002-8325-3331*

*Скорик М. А.,
завідувач лабораторії електронної мікроскопії №43
Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України м. Київ, Україна
ORCID 0000-0002-3479-166X*

<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-14-02>

Єдиним дієвим методом ідентифікації продуктів бджільництва за ботанічним та географічним походженням є дослідження видової приналежності наявних у їх складі пилкових зерен. Ідентифікація пилкових зерен за морфологічними ознаками та їх відсотковим співвідношенням у продукті дозволяє встановити ботанічний сорт меду (акацієвий, липовий). Для вивчення особливостей морфологічної будови пилкових зерен використовують методики світлової та електронної мікроскопії. Відсутність детальної ідентифікації пилкових зерен багатьох видів ентомофільних рослин України зумовлює актуальність дослідження їх морфології. Метою роботи було випробувати та адаптувати відомі методики електронної мікроскопії для ідентифікації пилкових зерен на доступному в Україні обладнанні. Матеріалом слугували гербарні зразки різних видів ентомофільних рослин зібраних в умовах Київської обл. Ідентифікацію рослин та підготовку проб проводили на базі лабораторій кафедри стандартизації та сертифікації с.-г. продукції НУБіП України. Випробування методик проводили на базі лабораторії електронної мікроскопії ТОВ «НаноМедТех» використовуючи електронний скануючий мікроскоп Tescan Mira 3 LMU, систему прецизійного травлення та покриття Gatan Pecs 682. Встановили, що використання адаптованої до наявного обладнання методики електронної мікроскопії за підготування зразків на основі 2,2-диметоксипропану, дозволить досліджувати морфологію пилкових зерен ентомофільних рослин України, що у подальшому дасть можливість ідентифікувати їх у продукції бджільництва. Зображення, що були отримані за методикою підготування зразка з використанням фіксації на основі глутарового альдегіду, демонстрували відповідність форми але деформовану поверхню зерна. За підготування зразка за методикою з використанням 2,2-диметоксипропану, зображення свідчать про збереження форми і структури поверхні пилкового зерна. Використання адаптованої методики підготовки зразків на основі попередньої обробки 2,2-диметоксипропаном, дегідратації та сушки в критичній точці CO₂, з подальшим дослідженнями методами скануючої електронної мікроскопії дає можливість ідентифікувати пилкові зерна медоносних рослин. У подальшому планується поповнювати отриманими знімками

міжнародну онлайн дата-базу PalDat, що дасть можливість встановлювати ботанічне та географічне походження продукції бджільництва з України, яка реалізується за кордон.

Ключові слова: пилкове зерно, метод, скануюча електронна мікроскопія

ADAPTATION OF ELECTRONIC SCANNING MICROSCOPY METHODS FOR INVESTIGATION OF POLLEN GRAINS

Adamchuk Leonora, PhD, Associate Professor

Department of Standardization and Certification of Agricultural Products
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
ORCID 0000-0003-2015-7956

Sukhenko Vladyslav, DSc of technical sciences, Professor

Chair of the department of Standardization and Certification of Agricultural Products
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
ORCID 0000-0002-8325-3331

Mykola Skoryk, Head of the Laboratory of Electron Microscopy No. 43

Institute of Metal Physics G.V. Kurdyumov NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
ORCID 0000-0002-3479-166X

<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-14-02>

The only effective method of identification of beekeeping products by botanical and geographical origin is to study the specificity of pollen grains in the composition of the said products. Identification of pollen grains by morphological characteristics and their percentage in the product allows to establish a botanical honey variety (black locust, linden). Light and electron microscopy techniques are used to study the peculiarities of the morphological structure of pollen grains. The lack of detailed identification of pollen grains of many species of entomophilous plants of Ukraine makes the study of their morphology relevant. The purpose of the work was to test and adapt known electronic scanning microscopy methods to identify pollen grains on equipment available in Ukraine. The material was herbarium specimens of different species of entomophilic plants collected under the conditions of the Kiev region. Plant identification and sample preparation were performed at the laboratories of the Department of Standardization and Certification of Agricultural Products. Tests of the methods were performed at the laboratory of electron microscopy LLC "NanoMedTech" using an electron scanning microscope Tescan Mira 3 LMU, precision etching system and coating Gatan Pecs 682. It was found that the use of electron microscopy techniques adapted to the existing equipment for the preparation of samples based on 2,2-dimethoxypropane will allow to study the morphology of pollen grains of entomophilous plants of Ukraine, this will further enable them to be identified in beekeeping products. Images obtained by the method of preparation of the sample using fixation based on glutaraldehyde, showed compliance with the shape but deformed surface of the grain. The shape and structure of the pollen grain surface was preserved in the preparation of the sample by the method using 2,2-dimethoxypropane. The use of an adapted sampling technique based on pre-treatment with 2,2-dimethoxypropane, dehydration and drying at a critical point of CO₂, followed by scanning electron microscopy methods enables the identification of pollen grains of honey plants. In the future, it is planned to supplement the images obtained with the international PalDat online database, which will allow to establish botanical and geographical origin of bee products from Ukraine, which is sold abroad.

Keywords: pollen grains, method, scanning electron microscopy

Постановка проблеми. Єдиним дієвим методом ідентифікації продуктів бджільництва за ботанічним та географічним походженням є дослідження видової приналежності наявних у їх складі пилкових зерен. За пилковим спектром визначають вид рослин, які слугували

джерелом для збирання бджолами нектару, бджолиного обніжжя, прополісу. Найбільш поширеною є гармонізовані якісна і кількісна методика пилкового аналізу під світловим мікроскопом [1]. Поряд з цим, передові лабораторії (наприклад, Intertek [2]) для ідентифікації користуються фотознімками пилкових зерен отриманими за використання електронної мікроскопії [3]. Популярною є база PalDat, яка щороку доповнюється фахівцями в сфері мелісопалінології. Однак, в PalDat відсутні пилкові зерна багатьох ентомофільних рослин України, що унеможливорює їх ідентифікацію, а відповідно й підтвердження ботанічної і географічної приналежності національної продукції. Саме це визначає актуальність пошуку та відпрацювання методик скануючої мікроскопії, які можливо буде запровадити в умовах України для дослідження морфології пилкових зерен.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Цитологічне вивчення пилкових зерен різних видів рослин в основному є частиною комплексних біологічних, анатомічних і біохімічних досліджень певних видів рослин у наукових сферах ботаніки, зокрема палінології. Так, при вивченні морфологічних характеристик і фертильності пилку вербозілля (*Lysimachia* spp.) використовували методику, що ґрунтувалася на дослідженні сухих пилкових зерен після покривання дрібнозернистим золотом за допомогою скануючого електронного мікроскопа JEOL JCM-6000 з використанням програмного забезпечення Semafore та програми AxioVision Rel. 4.8.2.0 для морфометрії [4]. Така методика є непридатною для дослідження пилку у продуктах бджільництва, адже він там знаходиться у вологому стані і змінює форму. Використання подібної методики під час вивчення морфології пилку інших видів рослин описано і в інших роботах [5, 6, 7]. Для вивчення органел пилкового зерна використовують методи флуоресцентної живої візуалізації за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії (CLSM) та методом ДАБ-фарбування на основі трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) [8]. Згадана методика також не підходить для бджільництва, адже пилкове зерно консервується секретами залоз бджіл і припиняє розвиток. Тому під час порівняння та ідентифікації висновки щодо видової приналежності пилку можуть бути хибними.

До найсучасніших методик дослідження пилкових зерен відносять тривимірну електронну мікроскопію (3D-EM), яка дає уявлення стосовно аналізу розвитку та росту генеративних клітин. Результати створення тривимірного зображення пилку *Picea wilsonii* створеного за допомогою AutoCUTS-SEM (автоматичний колектор ультратонких зрізів скануючої електронної мікроскопії) наведено у [9]. Однак масштабна 3D-реконструкція біологічних зразків з високою роздільною здатністю залишається складною. Окрім того, для її широкого лабораторного впровадження в Україні відсутнє відповідне обладнання. Також виконано низку досліджень [10] пилкових зерен у нативних зразках перги та бджолиного обніжжя (продукти бджільництва) за методиками електронної мікроскопії, що ґрунтуються на підготуванні зразків з використанням глутарового альдегіду [11] та 2,2-диметоксипропану [12].

Метою роботи було проаналізувати, адаптувати та провести лабораторні випробування відомих методик електронної мікроскопії для ідентифікації пилкових зерен на доступному в Україні обладнанні.

Матеріали та методи. Дослідним матеріалом були гербарні зразки видів ентомофільних рослин, зібраних в умовах Київської обл. Ідентифікацію рослин та підготовку проб пилку рослин проводили на базі лабораторій кафедри стандартизації та сертифікації сільськогосподарської продукції НУБіП України. Випробування методик скануючої електронної мікроскопії проводили на базі лабораторії електронної мікроскопії ТОВ «НаноМедТех». Використовували обладнання: електронний скануючий мікроскоп Tescan Mira 3 LMU (SEM), систему прецизійного травлення та покриття Gatan Pecs 682, пристрій для сушки зразків в за критичній області CO₂ Samdri Tousimis CPD.

Результати та обговорення. На першому етапі досліджень здійснили пошук методів відбору нативних пилкових зерен для їх подальшого дослідження. Після їх опрацювання, під світловим мікроскопом Sigeta Biogenic Led Trino Infinity встановили, що найкраще

зберігають форму пилкові зерна, які були висушені впродовж декількох годин після відбирання з квітки, без відокремлення від генеративних органів рослин (пиляків).

На другому етапі опрацьовували відомі методики підготовки проби пилкових зерен для їх дослідження за допомогою скануючої електронної мікроскопії та отримання зображень оптимальної якості. Слід зауважити, що використання скануючої електронної мікроскопії для дослідження пилкових зерен дозволяє візуалізувати їх поверхню зі збільшенням до 1 000 000 разів. Такого збільшення достатньо для повної ідентифікації зерна. Однак використання такого типу мікроскопічного дослідження накладає ряд обмежень на зразок (пробу), що досліджується. Серед них: уникнення спотворення форми та морфологічних особливостей зерна при підготуванні проб адже дослідження відбувається в вакуумній камері мікроскопу та необхідність забезпечення струмопровідності зразка.

Для дослідження методами електронної мікроскопії було обрано дві методики підготування зразків на основі глутарового альдегіду (ГА) [11] та 2,2-диметоксипропану (ДМП) [12]. Основними етапами обох методик є фіксація, дегідратація, сушка та покривання надтонким шаром струмопровідного матеріалу. Методика ГА використовується у дослідженнях різних біологічних об'єктів. Вона полягає в тому, що нативні зразки фіксуються у 2,5% розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері, після чого проводиться дегідратація розчином спирту в зростаючих концентраціях та заміщення спирту рідкою вуглекислою. Після цього відбувається висушування зразків в сушці в критичній точці CO₂. Друга методика описується у дослідженнях пилкових зерен рослин [7]. Її суттєвою відмінністю від першої методики є використання 2,2-диметоксипропану замість фіксатора та скорочення етапів дегідратації. Так само, як і в першій методиці, використовується сушка в критичній точці діоксиду вуглецю.

Результати апробації першої методики наведено на рисунку 1.

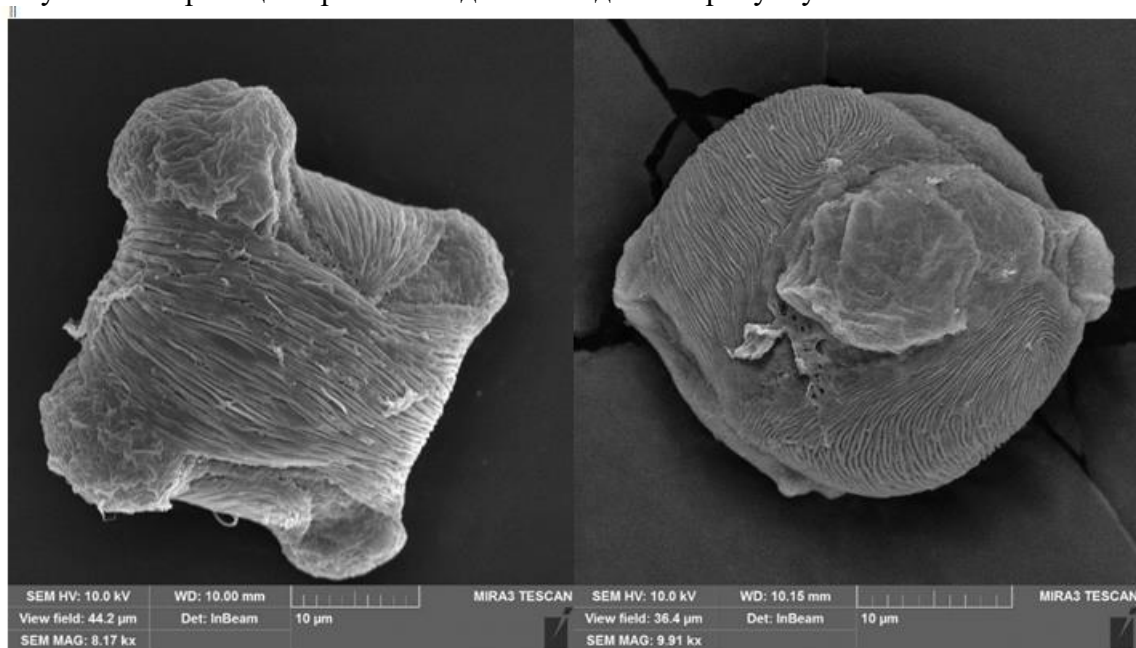


Рис. 1. Результати випробування методики підготування зразків пилку для скануючої електронної мікроскопії з використанням глутарового альдегіду: порушена структура поверхні пилкових зерен

В результаті відпрацювання методики вдалося визначити режими, за яких зразки утримують нативну форму та морфологію поверхні, проте при безпосередньому спостереженні в полі зору та на поверхні пилкових зерен були виявлені контамінуючі частинки, що можуть призвести до ускладнень при ідентифікації зерен. У подальшому відпрацювання стосувалося якості отриманого зображення (рис. 2).

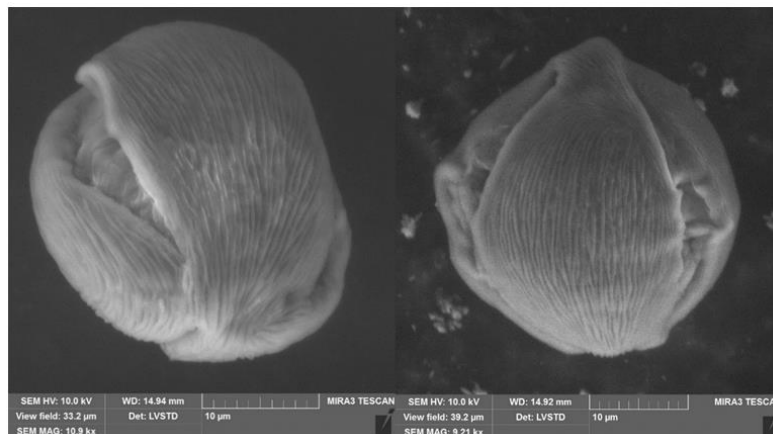


Рис. 2. Результати випробування методики: відпрацювання чіткості зображення

Одним з припущень при адаптації була спроба дослідити засобами СЕМ безпосередньо пилкових зерен з гербарних зразків, оскільки вони вже «сухі» і імовірно зберігають форму і структуру. Проте дослідження таких зразків виявили значне спотворення форми зерен (рис. 3).



Рис. 3. Зображення сухих пилкових зерен

Для розуміння необхідності ретельного підготування проби для дослідження засобами СЕМ, з етапами фіксації, дегідратації та сушки, була виконана спроба мінімізувати час та витрати на підготування проби для дослідження шляхом візуалізації пилкових зерен з мінімальним підготуванням проб, яке охоплювало попереднє висушування пилкових зерен при кімнатних умовах та подальше висушування в вакуумній системі перед нанесенням надтонкого струмопровідного шару (Au/Pd – 30 нм). Результати таких досліджень наведено на рис. 4.

Як можна бачити з рис. 4 форма пилкових зерен значним чином спотворена, що однозначно унеможливорює ідентифікацію. Це відбувається у випадку відмови від попередньої обробки або дегідратації, пилкові зерна втрачаючи вологу під час досліджень, значним чином деформуються, і це призводить до зміни їх форми та як наслідок унеможливорює їх подальшу ідентифікацію (рис. 4). Таким чином скоротити час на виконання процесу пробопідготовки не вдалося за обома спробами.

З огляду на отриманий досвід під час відпрацювань різних методів підготування проб для досліджень засобами СЕМ, можна стверджувати, що основним чинником, який впливає на збереження форми та морфологічних особливостей, є безпосередньо етап висушування (висушування в критичній точці CO₂).

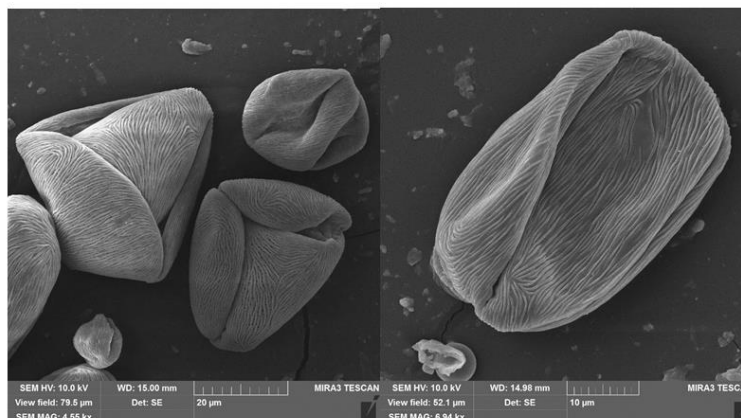


Рис. 4. Деформація пилкових зерен без попередньої їх сушки у критичній точці CO₂

Подальше вдосконалення та відпрацювання методики полягало в визначенні оптимального методу первинної фіксації та дегідратації з метою отримати зображення пилкових зерен з нативною морфологією та вільних від забруднень. Використанням 2,2-диметоксипропану в якості фіксатору на відміну від глутарового альдегіду дозволило отримати зображення зерен з достатньою якістю (рис. 5).

За результатами багатьох спроб, нами була відпрацьована послідовність проведення дослідження.

Адаптована методика підготовки зразків на основі попередньої обробки 2,2-диметоксипропаном, дегідратації та сушки в критичній точці CO₂, з подальшим дослідженнями методами скануючої електронної мікроскопії ґрунтується на наступних етапах.

Перший етап – фіксація розчином 2,2-диметоксипропану.

Другий етап – дегідратація в зростаючих концентраціях спирту.

Третій етап – висушування за допомогою пристрою для сушки в критичній точці CO₂ Samdri-780A. Після проведення однакової для двох методик процедури сушки зразків в критичній точці CO₂, зразки ставали сухими і повністю зберігали свою вихідну форму і морфологічні особливості, навіть у вакуумній камері електронного мікроскопу (тиск $1 \cdot 10^{-2}$ Па), що є необхідною умовою для дослідження засобами СЕМ та ідентифікації пилкових зерен.

Четвертий етап – нанесення сухих зразків на окремі предметні столики за допомогою струмопровідного адгезивного матеріалу та покривання їх тонким провідним шаром металу, яке проводили сплавом Au/Pd товщиною 20 нм з використанням системи PECS Gatan 682.

П'ятий етап – сканування. Покриті зразки пилку розміщали в камері скануючого (растрового) електронного мікроскопу Tescan Mira 3 LMU та проводили дослідження пилкових зерен різних видів рослин за збільшення різної кратності (рис. 5).

У результаті експериментальної роботи, встановили, що при підготовці зразка за методикою з використанням 2,2-диметоксипропану (ДМП), пилкові зерна зберігали форму та структуру поверхні. Це дозволило нам отримати стабільний результат за різних збільшень. Отримані знімки дають чітке зображення поверхні пилкових зерен за різною кратністю збільшення скануючого електронного мікроскопу – 9,65 kx, 4,56, 3,46, 1,88 kx (рис. 5) та дозволяють розрізнити окремі елементи структури поверхні пилкового зерна (його скульптуру). Таким чином, використання адаптованої до наявного обладнання методики ДМП, дозволить досліджувати морфологію пилкових зерен ентомофілних рослин України, що у подальшому дасть можливість ідентифікувати їх у продукції бджільництва.

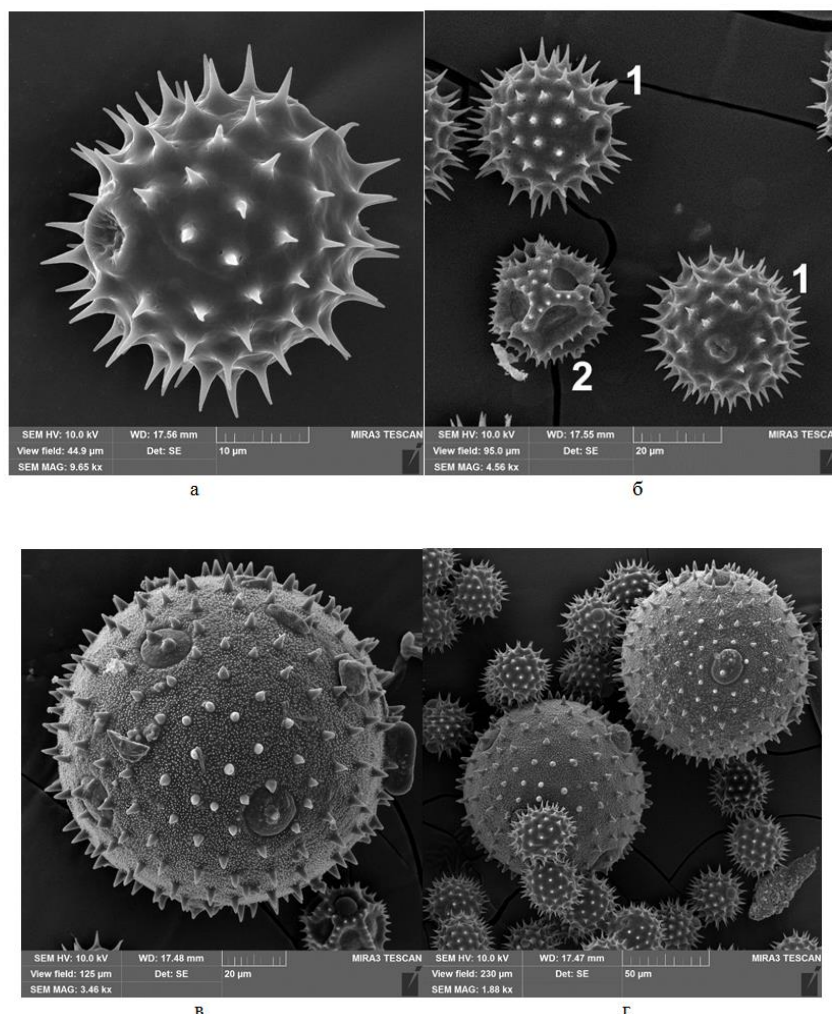


Рис. 5. Результати випробування методики підготування зразків пилку для скануючої електронної мікроскопії з використанням 2,2-диметоксипропану:

а – пилкове зерно соняшника (*Helianthus annuus* L.); б – пилкові зерна соняшника (*Helianthus annuus* L.) (1) і цикорію (*Cichorium intybus* L.) (2); в – пилкове зерно виду Мильнянка (*Saponaria* spp.); г – пилкові зерна мильнянки у порівнянні до соняшника.

Висновки. Зображення, що були отримані за методикою підготування з використанням фіксації глутаровим альдегідом, демонстрували відповідність форми, але морфологія поверхні зерна була значно деформована, і це унеможливило адекватне дослідження морфології пилкових зерен. Натомість при підготуванні зразка за методикою з використанням 2,2-диметоксипропану, зображення свідчать про збереження форми і структури поверхні пилкового зерна.

Використання адаптованої методики підготовки зразків на основі попередньої обробки 2,2-диметоксипропаном, дегідратації та сушки в критичній точці CO₂, з подальшим дослідженнями методами скануючої електронної мікроскопії дає можливість ідентифікувати пилкові зерна медоносних рослин.

У подальшому планується поповнювати отриманими знімками міжнародну електронну базу даних PalDat, що дасть можливість встановлювати ботанічне та географічне походження продукції бджільництва з України, яка реалізується за кордоном.

Подяка. Колектив авторів виражає подяку керівництву ТОВ «НаноМедТех» за надану можливість відпрацювати та адаптувати відомі методики електронної мікроскопії для ідентифікації пилкових зерен рослин.

Acknowledgments. Author Leonora Adamchuk thanks the International Visegrad Fund for the scholarship ID #51910842 and research internships, during which the results and knowledge presented in this paper were obtained.

Бібліографія

1. Von Der Ohe W., Oddo L. P., Piana M. L., Morlot M., Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 2004. 35 (Suppl. 1), S. 18–25.
2. Total Quality Assurance. Intertek Group plc. <http://www.intertek.com>.
3. PalDat – Palynological Database. Division of Structural and Functional Botany (www.botanik.univie.ac.at/sfb), AutPal, the “Society for the Promotion of Palynological Research in Austria” (www.autpal.at). <https://www.paldat.org/>
4. Matyashuk R., Mazura M., Yurchuk, M. Reactions of pollen of plants from genus *Lysimachia* L. on Different Environmental Conditions. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. 2019. P. 81–92.
5. Жигалова С. Л. Паліноморфологічні особливості пилкових зерен видів роду *Juglans* L. Чорноморський ботанічний журнал. 2009. Т. 5, № 2, С. 199–206.
6. Цимбалюк З. М., Мосякін С. Л. Паліноморфологічні особливості представників триби *Rhinantheae* (*Orobanchaceae*) у світлі молекулярно-філогенетичних даних. Український ботанічний журнал. 2017. Вип. 74, № 4., С. 310–325. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj76.01.009>
7. Сокол О., Джуренко Н., Гурненко І. Ультроструктурні особливості пилкових зерен видів роду *Arctium* L. (*Asteraceae* bercht. & j. Presl.). Вісник Львівського університету. Серія: біологічна. 2019. Вип. 80. С. 67–72. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.08>
8. Jia P. F., Li H. J., Yang W. C. Analysis of Peroxisome Biogenesis in Pollen by Confocal Microscopy and Transmission Electron Microscopy. In *Plant Germline Development*. 2017. P. 173–180.
9. Shen W., Ma L., Zhang X., Li X., Zhao, Y., Jing Y., Feng Y., Tan X., Sun F., Lin, J. Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* Mast. pollen grains using automated electron microscopy. *Science China Life Sciences*. 2019. Vol. 63 No. 2: 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9820-4>
10. Brindza J., Motyleva S., Ostrovský R., Grygorieva O., Adamchuk L., Horčinová Sedláčková V., Juríková T., Fatrcová-Šramková K., Shwaryová M., Brovaskyi V., Velychko S., Tkachenko O. Peľ a včelie peľové obnôžky z niektorých druhov rastlín. Nitra : SPU v Nitre. 2018. 147 p. ISBN 978-80-552-1862-5
11. Ulf Brunk V., Collins P., Arro E. The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *Journal of Microscopy*. 1981. Vol. 123, P. 121–131.
12. Halbritter H. Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2, 2-dimethoxypropane (DMP) and critical-point drying. *Biotechnic & Histochemistry*. 1998. Vol. 73(3), P. 137–143.

References

1. Von Der Ohe W., Oddo L. P., Piana M. L., Morlot M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S. 18–25.
2. Total Quality Assurance. *Intertek Group plc*. <http://www.intertek.com>.
3. PalDat – Palynological Database. Division of Structural and Functional Botany (www.botanik.univie.ac.at/sfb), AutPal, the “Society for the Promotion of Palynological Research in Austria” (www.autpal.at). <https://www.paldat.org/>
4. Matyashuk R., Mazura M., Yurchuk, M. (2019). Reactions of pollen of plants from genus *Lysimachia* L. on Different Environmental Conditions. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*, P. 81–92.
5. Zhygalova S. L. (2009) Palinomorfologichni osoblyvosti pylkovykh zeren vydiv rodu [The pollen grains characteristics of *Juglans* L. species.]. *Chornomorskyi botanichnyi zhurnal* [Chornomors'k Botanical Journal], Vol. 5, № 2. P. 199–206. [In Ukrainian].

6. Tsymbaliuk Z. M., Mosiakin S. L. (2017). Palinomorfologichni osoblyvosti predstavnykiv tryby Rhinanthae (Orobanchaceae) u svitli molekuliarno-filohenetychnykh danykh [Palynomorphological features of representatives of the *Rhinanthae* (Orobanchaceae) tribe in the light of molecular and phylogenetic data]. *Ukrainskyi botanichnyi zhurnal* [Ukrainian Botanical Journal], 74 (4), P. 310–325. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj76.01.009> [In Ukrainian].

7. Sokol O., Dzhurenko N., Gournenko I. Ultrastrukturni osoblyvosti pylkovykh zeren vydiv rodu *Arctium* L. (Asteraceae bercht. & j. Presl.). [The ultrastructural features of pollens grains in species of the genus *Arctium* L. (Asteraceae bercht. & J.Presl)]. *Visnyk Lvivskoho universytetu. Serii: biolohichna* [Visnyk of the Lviv University. Series: Biology]. 2019. Is. 80. P. 67–72. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.08> [In Ukrainian].

8. Jia P. F., Li H. J., Yang W. C. (2017). Analysis of Peroxisome Biogenesis in Pollen by Confocal Microscopy and Transmission Electron Microscopy. In *Plant Germline Development*, P. 173–180.

9. Shen W., Ma L., Zhang X., Li X., Zhao, Y., Jing Y., Feng Y., Tan X., Sun F., Lin, J. (2019). Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* Mast. pollen grains using automated electron microscopy. *Science China Life Sciences*, P. 1–9. February 2020 Vol.63 No.2: 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9820-4>.

10. Brindza J., Motyleva S., Ostrovský R., Grygorieva O., Adamchuk L., Horčinova Sedláčková V., Juríková T., Fatrcová-Šramková K., Shwaryová M., Brovaskyi V., Velychko S., Tkachenko O. (2018). Peľ a včelie peľové obnôžky z niektorých druhov rastlín [Pollen and bee pollen same plant species]. *Nitra : SPU v Nitre*. 147 p. ISBN 978-80-552-1862-5 [In Slovakian].

11. Ulf Brunk V., Collins P., Arro E. (1981). The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *Journal of Microscopy*, Vol. 123, P. 121–131.

12. Halbritter H. (1998). Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2, 2-dimethoxypropane (DMP) and critical-point drying. *Biotechnic & Histochemistry*, 73(3), P. 137–143.