

И.П. Ермаков, Н.П. Матвеева, М.А. Брейгина

ФИЗИОЛОГИЯ ГАПЛОИДНОГО ПОКОЛЕНИЯ СЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Учебное пособие



УДК 581.16:582.4/.9
ББК 28.57+28.592.6+28.592.7
Е 72

И.П. Ермаков, Н.П. Матвеева, М.А. Брейгина. Физиология гаплоидного поколения семенных растений. Учебное пособие. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2016. 276 с.

В книге в доступной форме изложены современные представления о физиологии развития гамет и оплодотворении у покрытосеменных и голосеменных растений. Рассмотрены механизмы дифференциации спор и гамет, межклеточные взаимодействия гаплоидных клеток друг с другом и с диплоидными клетками спорофита, сигнальные системы, контролирующие подготовку к оплодотворению и, собственно, оплодотворение. Обсуждаются экспериментальные методы, классические и новые, которые используют в исследованиях репродуктивной биологии растений.

Учебное пособие предназначено для студентов и аспирантов биологических специальностей высших учебных заведений. Книга может быть также интересна специалистам, работающим в разных областях экспериментальной ботаники и биологии развития.

Рецензенты:

зав. кафедрой высших растений биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, чл.-корр. РАН Д.Д. Соколов и к.б.н. М.В. Ремизова
профессор кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова В.А. Голиченков

*Рекомендовано Учебно-методическим советом по биологии
Федерального УМО «Биологические науки» в качестве учебного
пособия для обучающихся в образовательных организациях
высшего образования по направлениям 06.03.01
и 06.04.01 «Биология» и смежным направлениям*

ISBN 978-5-9908941-4-3

© И.П. Ермаков, Н.П. Матвеева,
М.А. Брейгина, 2016

Оглавление

Предисловие	7
Введение	9
Часть 1. Развитие спор и гаметофитов	20
Глава 1. Развитие микроспоры и пыльцевого зерна до опыления	20
• Тычинка и пыльник	20
• Общие закономерности развития микроспоры и пыльцевого зерна	25
• Формирование оболочки пыльцевого зерна	29
○ Каллозная оболочка	29
○ Экзина и апертуры	33
○ Интина	50
○ Полленкит и трифина	53
• Поляризация и деление микроспоры	54
• Вегетативная и генеративная клетки пыльцевого зерна, спермии	60
○ Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита	61
○ Генеративная клетка и спермии	67
○ Мужской гаметный модуль	75
• Дегидратация пыльцевых зерен	76
Глава 2. Развитие мегаспоры и женского гаметофита	94
• Мегаспорангий; пестик и семяпочка	94
• Формирование женского гаметофита	98
○ Общие закономерности развития и строения зародышевого мешка	99
○ Роль позиционной информации в спецификации клеток женского гаметофита	105
○ Межклеточные взаимодействия в зародышевом мешке	109

○ Транскрипционная активность и эпигенетический статус клеток женского гаметофита	113
Часть 2. Опыление и оплодотворение	121
Глава 3. Распространение и прорастание пыльцы, рост пыльцевой трубки	121
• Распространение пыльцы	122
• Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры	123
○ Адгезия на сухом рыльце	124
○ Адгезия на влажном рыльце	126
○ Регидратация пыльцевых зерен	128
○ Выбор функциональной апертуры	130
• Активация пыльцевых зерен	132
○ Активация дыхания	132
○ Роль H^+ -АТФазы плазмалеммы в активации пыльцевого зерна	136
○ Участие Ca^{2+} в активации пыльцевого зерна	138
○ Цитоскелет и реорганизация цитоплазмы	139
• Прорастание пыльцевого зерна и рост пыльцевой трубки: взаимодействие мужского гаметофита с тканями пестика	140
○ Компоненты внеклеточного матрикса столбика	141
○ Сигналы, опосредующие взаимодействие мужского гаметофита с тканями пестика	145
• Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки	147
○ Строение и состав клеточной стенки пыльцевой трубки	147

○ Регуляция цитомеханики стенки пыльцевой трубки посредством ферментативной модификации пектинов	150
○ Участие активных форм кислорода в регуляции цитомеханики стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки	154
• Закономерности полярного роста пыльцевой трубки	157
○ Цитоскелет и движение органелл и MGU, компартментация пыльцевой трубки	157
○ Везикулярный транспорт и доставка в апекс строительных материалов	166
○ Ионная регуляция роста пыльцевой трубки	172
○ Сигналинг в регуляции прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки (преовулярная фаза)	193
• Особенности прогамной фазы у голосеменных растений	206

Глава 4. Овулярная фаза регуляции роста пыльцевой трубки	230
• Обзор заключительного этапа роста пыльцевой трубки и слияния гамет	230
• Влияние мужского гаметофита на развитие семязпочки и женского гаметофита и движение женских гамет по клеточному циклу	236
○ Отдаленное влияние мужского гаметофита на состояние семязпочки и женского гаметофита у покрытосеменных растений	236
○ Синхронизация клеточных циклов мужских и женских гамет покрытосеменных растений	238
○ Синтез ДНК в гаметах голосеменных растений	240

• Сигналы, опосредующие взаимодействие гаметофитов и гамет покрытосеменных растений	243
○ Сигналы, направляющие рост пыльцевой трубки в завязи	243
○ Механизмы, индуцирующие разрыв пыльцевой трубки	245
○ Взаимодействие гамет, оплодотворение	250
Список сокращений	265
Предметный указатель	267

Часть 1

Развитие спор и гаметофитов

Глава 1. Развитие микроспоры и пыльцевого зерна до опыления

- Тычинка и пыльник
- Общие закономерности развития микроспоры и пыльцевого зерна
- Формирование оболочки пыльцевого зерна
 - Каллозная оболочка
 - Экзина и апертуры
 - Интина
 - Полленкит и трифина
- Поляризация и деление микроспоры
- Вегетативная и генеративная клетки пыльцевого зерна, спермии
 - Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
 - Генеративная клетка и спермии
 - Мужской гаметный модуль
- Дегидратация пыльцевых зерен

Тычинка и пыльник

Образование гаплоидных микроспор и развитие пыльцевых зерен у покрытосеменных растений происходит в пыльнике (Рис. 2, 3). Он является частью тычинки, которая представляет собой преобразованный в процессе эволюции микроспорофилл (Эмбриология цветковых растений. Т. 1. 1994). В цветке может быть от одной до тысячи тычинок.

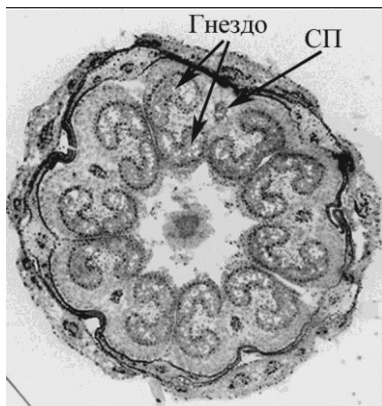


Рис. 2. Пыльники на поперечном срезе бутона томата *Solanum lycopersicum* L. Криосрез. Флуоресцентная микроскопия. Стрелками обозначены гнезда пыльника и сосудистый пучок (СП). Снимок любезно предоставлен А.В. Смирновой.

Пыльник прикреплен к цветоложу с помощью тонкой тычиночной нити (Рис. 3). Внутри этой нити проходит сосудистый пучок, поставляющий в пыльник воду и питательные вещества. У большинства покрытосеменных растений пыльник содержит четыре микроспорангия, расположенные попарно (Эмбриология цветковых растений. Т. 1. 1994).

В гнездах пыльника формируются репродуктивные спорогенные клетки – микроспороциты (материнские клетки микроспор), которые вступают в мейоз и дают начало гаплоидному поколению. Сложно организованная стенка пыльника развивается из нерепродуктивных клеток. Она включает эпидермальный слой, различное число субэпидермальных слоев, в частности, эндотений и средний слой, и внутренний слой – тапетум (Рис. 3). Тапетум выстилает гнездо (полость, локулу) пыльника, где расположены репродуктивные клетки. Он отличается коротким временем жизни и активным метаболизмом (Hesse et al., 2009; Rasini, 2010). Главная функция тапетума – питание растущей микроспоры и пыльцевого зерна. Но вместе с тем в клетках тапетума синтезируются важные ферменты (как каллаза), предшественники спорополленина и компоненты полленкита и трифины, о которых пойдет речь ниже.

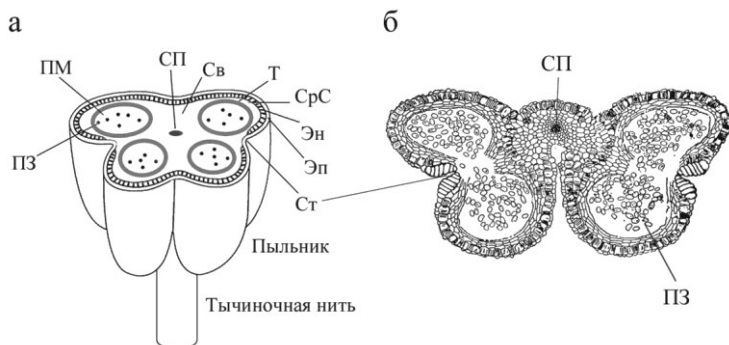


Рис. 3. Схема строения пыльника (а) и поперечный срез пыльника *Lilium philadelphicum* (по Магешвари, 1954) (б).

Обозначения: ПЗ – пыльцевое зерно, ПМ – пыльцевой мешок, СП – сосудистый пучок, Св – связник, Т – тапетум, СрС – средний слой, Эн – эндотечий, Эп – эпидермис, Ст – стомиум.

В пыльниках с секреторным тапетумом в самом начале мейоза межклеточное пространство гнезда заполняется жидкостью, состав которой постепенно изменяется (Pacini, 2010). Жидкость окружает микроспоры и пыльцевые зерна и опосредует взаимодействия гаметофита и спорофита.

Стенка пыльника и связник осуществляют функцию транспорта ассимилятов из тканей спорофита в гнездо, но вместе с тем они играют роль физиологического «буфера» в снабжении мужского гаметофита сахарами. Это было наглядно показано с использованием культур *in vitro* (Clement, Audran, 1995). Изолированные пыльцевые зерна *Lilium sp.* реагировали на увеличение концентрации сахаразы в питательной среде избыточным амилогенезом. Лишенные естественного физиологического и анатомического окружения, они бесконтрольно нагружались крахмалом и теряли способность к прорастанию. Если же культивировали целые пыльники, то добавление избыточной сахарозы не нарушало развитие пыльцевых зерен. Стенка пыльника и связник в этих условиях аккумулировали крахмал и растворимые сахара и ограничивали их

поступление в гнездо. Тем самым осуществлялся контроль доступности сахаров для гаметофита.

По мере дифференциации пыльника увеличивается объем гнезда. К моменту раскрытия пыльника этот объем у лилии (*Lilium sp.*), например, составляет около 30% от объема пыльника (Clement et al., 1998).

Сложная последовательность процессов подготавливает раскрытие пыльника и высывание пыльцы (Wilson et al., 2011). Вначале дегенерирует средний слой пыльника и тапетум, и увеличивается объем клеток эндотеция. В клетках эндотеция и связника формируются лигнифицированные вторичные стенки (Scott et al., 2004). Этого не происходит в стомиуме и септе – перегородке, разделяющей два гнезда одной теки (половинки) пыльника. В гнезде пыльника в это время проходит митоз микроспоры. После этого септа лизируется, два гнезда сливаются, и пыльник становится двухгнездным (билокулярным). И наконец, гибнут клетки стомиума, и пыльник в этом месте вскрывается (Goldberg et al., 1993). Так раскрываются, например, пыльники *Arabidopsis* и табака (Scott et al., 2004).

Когда из гнезда исчезает жидкость и обезвоживается стенка пыльника, созревшие пыльцевые зерна частично дегидратируются.

Обезвоживание стенки пыльника у некоторых видов может быть отчасти обусловлено испарением воды через устьица, расположенные на адаксиальной стороне пыльника. Однако в качестве одного из главных механизмов обезвоживания рассматривают перераспределение воды в пыльнике и ее отток через сосудистые пучки по направлению к основанию цветка (Wilson et al., 2011).

Изучение водного статуса пыльника томата выявило дифференциальную картину его дегидратации и локальное снижение содержания крахмала в связнике. Как полагают, крахмал превращается в сахар, что приводит к увеличению осмотического потенциала в этой зоне и индуцирует дегидратацию соседних областей. В этом процессе

могут участвовать белки плазмалеммы, транспортирующие сахарозу (AtSUC1), которые накапливаются в пыльнике *Arabidopsis* вокруг связника (Wilson et al., 2011).

Транслокация воды в растительных тканях может идти по плазмодесмам или через аквапорины PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein) – интегральные мембранные белки плазмалеммы. Специфичные гены аквапоринов обнаружены в пыльниках *Brassica*, *Solanum chacoense* и *Nicotiana tabacum* (Обручева, Синькевич, 2010). Белки PIP2 накапливались на поздних стадиях развития пыльника табака. Замалчивание гена *PIP2* вызывало задержку раскрытия пыльников, что указывает на участие аквапоринов в их обезвоживании.

Сложность регуляции раскрытия пыльника выявляется при анализе вклада в этот процесс гормонов. Исследование мутантов *Arabidopsis* показало, что для нормального развития тычинки, раскрытия пыльников и образования фертильной пыльцы нужны жасмоновая кислота, ауксин, гибберелловая кислота и цитокинин (Геращенко, Рожнова, 2013; Song et al., 2013). Наиболее изучен ауксин (ИУК, индолил-3-уксусная кислота). Его концентрация в пыльниках *Arabidopsis* возрастала, начиная с премейозной или мейозной стадии, достигала максимума на стадии микроспоры и существенно снижалась около митоза микроспоры, когда происходит лигнизация эндотеция (Cecchetti et al., 2013). В билокулярном пыльнике отмечено дальнейшее снижение содержания ИУК. У мутантов, дефектных по перцепции ауксина (*afb1-3* и тройного мутанта *tir1afb afb3*), лигнизация эндотеция, раскрытие пыльника и созревание пыльцевых зерен происходили преждевременно, а удлинение тычиночной нити было недостаточным, по сравнению с растениями дикого типа.

Как полагают, ауксин превращает преждевременную лигнизацию эндотеция, репрессируя ген, контролирующий этот процесс (*MYB26*) (Cecchetti et al., 2013). На последних стадиях развития пыльника, когда концентрация ауксина уменьшается, снимается блокирование

гена *MYB26*, и запускается лигнификация эндотеция. Одновременно увеличивается экспрессия генов, контролирующих синтез жасмоновой кислоты. Последующая дегидратация эндотеция приводит к деформации пыльника из-за того, что часть его стенки лигнифицирована, а другая – нет. Возникают механические силы, полностью раскрывающие стомиум (Cecchetti et al., 2013; Scott et al., 2004). Из раскрывшегося пыльника высвобождается пыльца, готовая для опыления.

Нормальное развитие пыльцевых зерен строго согласовано с развитием и раскрытием пыльника. Однако изучение табака с мужской стерильностью показало, что процесс раскрытия пыльника проходит все последовательные стадии, несмотря на отсутствие пыльцы и тапетума (Goldberg et al., 1993). Это означает, что реализация данной программы не требует сигналов от гаметофита.

Общие закономерности развития микроспоры и пыльцевого зерна

После мейоза микроспороцита четыре гаплоидные клетки вначале остаются под общей оболочкой, образуя тетрады микроспор (Рис. 4).

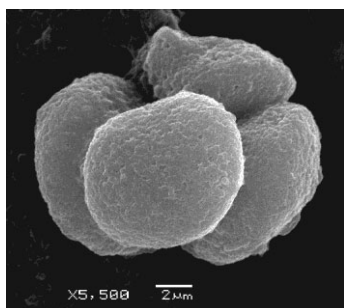


Рис. 4. Тетрада микроспор *Nicotiana tabacum*, СЭМ. Снимок любезно предоставлен С.В. Полевой.

В тетрадах начинается формирование наружного слоя оболочки пыльцевого зерна – сложно скульптурированной экзины. Под действием ферментов, которые синтезируют

клетки тапетума, оболочка, объединяющая микроспоры, разрушается, и свободные микроспоры выходят в гнездо микроспорангия.

Микроспоры могут продолжать свое развитие в составе тетрады с образованием тетрады пыльцевых зерен (Рис. 5). Это явление описано почти у 600 видов растений из 52 семейств. Такие тетрады можно встретить у однодольных и двудольных, наземных и водных растений, обитающих практически на всех континентах (Copenhaver, 2005). У *Arabidopsis thaliana* пыльцевые тетрады возникают вследствие мутации *quartet*, о которой будем говорить ниже.

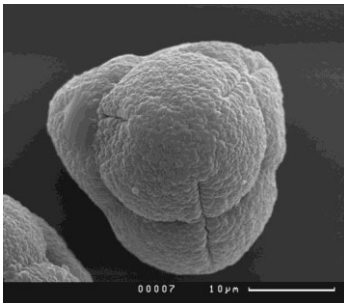


Рис. 5. Тетрада пыльцевых зерен грушанки *Pyrola rotundifolia* (сем. Ericaceae). Снимок любезно предоставлен С.В. Полевой.

Схематическая картина развития мужского гаметофита покрытосеменных растений представлена на рисунке 6. В микроспоре растет крупная вакуоль, а ядро перемещается на периферию. Поляризованная микроспора вступает в асимметричный (неравный, дифференцирующий) митоз, так называемый, I пыльцевой митоз (Twell, 2002). Он приводит к образованию мужского гаметофита (пыльцевого зерна).

Двухклеточное пыльцевое зерно покрытосеменных растений – это уникальная конструкция, построенная по типу клетка-в-клетке (Borg, Twell, 2011). Почти вся цитоплазма достается большой вегетативной клетке с крупным диффузным ядром. Ее называют также клеткой трубки, т.к. главная ее функция – формирование пыльцевой трубки.

ки и доставка спермиев к яйцеклетке. Внутри этой клетки располагается маленькая генеративная (гаметогенная) клетка с конденсированным хроматином, малым числом органелл и запасных веществ. Она делится с образованием двух спермиев.

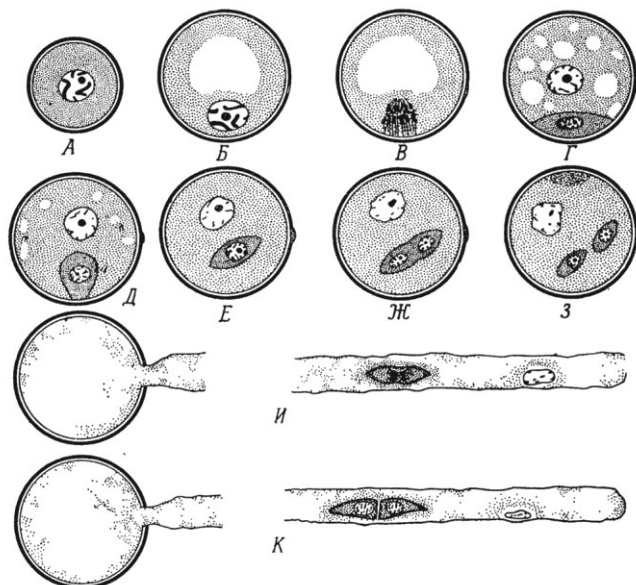


Рис. 6. Схема развития мужского гаметофита покрытосеменных растений (по Магешвари, 1954). А – ранняя микроспора, Б – вакуолизирующаяся микроспора, В – деление микроспоры, Г – раннее пыльцевое зерно, генеративная клетка прижата к стенке, Д – генеративная клетка отходит от стенки, Е – генеративная клетка и ядро вегетативной клетки в центре пыльцевого зерна, Ж,З – деление генеративной клетки в трехклеточном пыльцевом зерне с образованием двух спермиев, И,К – деление генеративной клетки в пыльцевой трубке (двухклеточная пыльца).

Примерно у 25% изученных цветковых растений деление генеративной клетки происходит до прорастания пыльцы, из пыльников высыплются трехклеточные

пыльцевые зерна, как у *Arabidopsis thaliana* (Рис. 6з). У остальных 75% растений, включая *Lilium longiflorum* и *Nicotiana tabacum*, пыльцевые зерна двухклеточные, спермии у них образуются в пыльцевой трубке (Рис. би, к).

Микрогаметофит голосеменных претерпевает 3-5 (редко больше) митозов, в числе которых есть и неравные (Pacini et al., 1999). У сосны и гинкго из микроспорангиев высыпается четырехклеточная пыльца, у секвойи – двухклеточная, у можжевельника – одноклеточная. Спермии во всех случаях образуются только после опыления (Pacini et al., 1999). У большинства представителей Pinaceae пыльца саккатная. Саккусы (воздушные мешки) – это большие полые выросты, образованные экзиной (Рис. 7). Число воздушных мешков, размеры пыльцевых зерен и число митозов в ходе развития гаметофита, варьибельны (Williams, 2009).

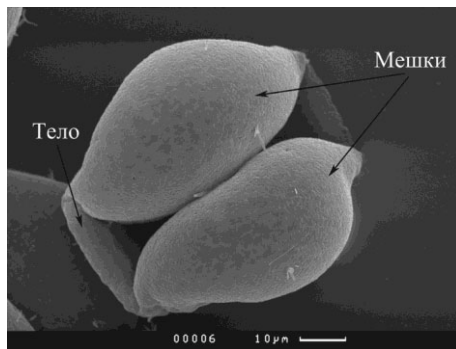


Рис. 7. Саккатное (мешковое) пыльцевое зерно сосны *Pinus pumila*. СЭМ. Снимок любезно предоставлен С.В. Полевой.

В процессе своего развития в микроспорангиях пыльцевые зерна покрытосеменных и голосеменных растений формируют уникальную массивную оболочку, накапливают протекторные вещества, необходимые для защиты наследственного материала, и готовят ресурсы

для будущего роста пыльцевой трубки (Blackmore et al., 2007; Borg, Twell, 2011). Готовое к опылению пыльцевое зерно – это метаболически неактивный сильно обезвоженный организм, содержание воды в нем составляет 8-30%.

Формирование оболочки пыльцевого зерна

Сложно устроенная оболочка пыльцевого зерна (спородерма) состоит из двух массивных слоев (Рис. 8) – наружной экзины и внутренней интины. Когда пыльца покрытосеменных растений высыпается из пыльника, поверхность экзины она покрыта слоем (pollen coat) тапетального происхождения. Ботаники называют его полленкит или трифина, последняя включает продукты деградации тапета. В физиологии имеется тенденция к использованию общего термина – трифина (Blackmore et al., 2007).

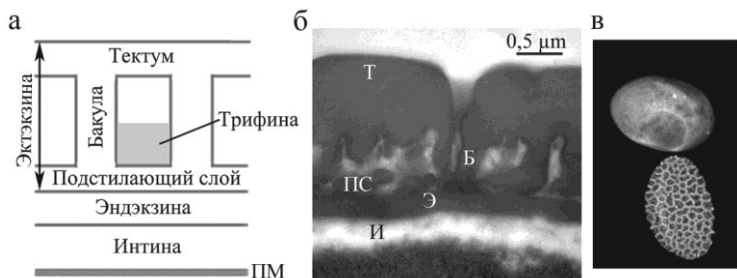


Рис. 8. Строение спородермы. (а) Обобщенная схема, (б) ТЭМ спородермы *Nicotiana tabacum* (снимок любезно предоставлен С.В. Полевой), (в) изолированные экзина (внизу) и интина (вверху) *Lilium longiflorum*. Обозначения: Т – тектум, ПС – подстилающий слой, Э – эндэкзина, Б – бакула, И – интина.

Каллозная оболочка

Микроспороциты большинства покрытосеменных растений до мейоза или в самом его начале секретируют каллозу (Blackmore et al., 2007). Она откладывается на поверхности плазмалеммы под первичной стенкой микро-

спороцита. Каллозная оболочка, объединяющая продукты мейоза, постепенно утолщается, а в конце мейоза формируются межспоровые каллозные стенки, разделяющие отдельные микроспоры в тетраде (Scott et al., 2004). Нормальное развитие тетрад завершается разрывом каллозных оболочек и высвобождением микроспор (Рис. 9).

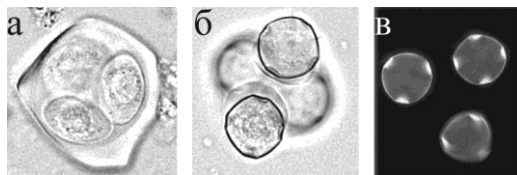


Рис. 9. Тетрада микроспор табака *Nicotiana tabacum*, окруженная каллозной оболочкой (а), выход микроспор из каллозной оболочки (б), микроспоры, только что вышедшие из тетрады (в).

Характерная особенность каллозы – быстрый синтез и быстрая деградация (Горшкова, 2007). Этот полисахарид играет важную роль в репродуктивном развитии семенных растений, но каллоза обнаруживается и в клетках вегетативных органов. Она может служить временной клеточной стенкой при клеточных делениях или регулировать пропускную способность плазмодесм. Каллоза откладывается в ситовидных элементах и паренхимных клетках перед опадением листьев (Эзау, 1980). Отложение каллозы происходит также в ответ на поранение и стрессы.

Каллоза представляет собой водонерастворимый линейный гомополимер β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан с достаточно аморфной структурой. Синтез каллозы катализирует ферментный комплекс, ассоциированный с плазматической мембраной. Главный его компонент – трансмембранный белок каллозосинтаза, субстратом для которой служит UDP-глюкоза. Две разные исследовательские группы, которые изучали синтез каллозы у *Arabidopsis*, почти одновременно в 2000 – 2001 годах опубликовали данные об идентификации 12 генов каллозосинтазы (Jiang et al.,

2013). Из-за этого возникло два способа обозначения этих генов: *CalS* (*AtCalS1–AtCalS12*) от «callose synthase» и *AtGSL1–AtGSL12* от «glucan synthase-like». Мы будем использовать второй способ.

Отложение каллозы под первичной клеточной стенкой микроспороцита *Arabidopsis* контролирует ген *GSL2* (Jiang et al., 2013). У мутантов с уменьшенным количеством каллозы в микроспороцитах (*gsl2*) мейоз проходит без нарушений, и микроспоры благополучно высвобождаются из тетрад. Дефект обнаруживается позже, когда клеточный объем резко увеличивается. Образуются деформированные пыльцевые зерна, которые легко взрываются. Формирование межспоровых каллозных оболочек контролируют два гена *GSL1* и *GSL5*. У двойных мутантов *Arabidopsis* по этим генам отсутствуют каллозные стенки, разделяющие микроспоры в тетрадах, и нарушен процесс их распада и высвобождения микроспор. Как полагают, эти два гена играют важную роль и на последующих стадиях развития пыльцевых зерен.

В растворении каллозной оболочки тетрады участвует каллаза – комплекс β -1,3-глюканаз (экзо- и эндоглюканаз), которые синтезируют клетки тапетума. Эндоглюканазы атакуют внутренние связи молекулярных цепей β -(1→3)-глюканов с образованием смеси коротких олигоглюкозидов. Экзоглюканазы по одной отрезают от них глюкозные единицы, продолжая процесс деградации каллозы (Jiang et al., 2013). В ранней работе Stieglitz (1977), которая до сих пор сохранила свою актуальность, в экспериментах *in vitro* были протестированы экзо- и эндоглюканазная фракции экстракта из пыльников лилии *L. tigrinum*, *L. speciosum* и гибридных сортов. Оказалось, что разрыв каллозной оболочки обеспечивается эндоглюканазами.

Каллаза должна синтезироваться в тапетуме в нужное время (Scott et al., 2004). Рассогласование процессов, происходящих в репродуктивных клетках и тапетуме, приводит к нарушению фертильности пыльцы. Примеры этому можно найти у растений петунии и сорго с цитоплазматиче-

ческой мужской стерильностью (цмс), для которых характерно преждевременное или запаздывающее растворение каллозы. У трансгенных растений табака с преждевременной синтезом каллазы нарушалось формирование экзины, и микроспоры лопались вскоре после выхода из тетрад (Worrall et al., 1992).

Однако микроспоры удерживаются в тетраде не только каллозной оболочкой. Тетрады *Arabidopsis* не распались после обработки в условиях *in vitro* очищенной каллазой, хотя каллоза при этом полностью деградировала (Jiang et al., 2013). Оказалось, что нужно растворить еще и первичную клеточную стенку, которая осталась со времен микроспороцита. Исследование мутантов *Arabidopsis quartet* (*qrt*), у которых нарушен этот процесс, выявило необходимость согласованной работы трех генов (*QRT1*, *QRT2* и *QRT3*), кодирующих пектинметилэстеразу и две полигалактуроназы (Jiang et al., 2013). Это означает, что для распада тетрад по крайней мере у *Arabidopsis*, необходимо гидролизовать как каллозу, так и пектины.

Выделение гидролитических ферментов клетками тапетума – это необходимое, но не достаточное условие своевременного распада тетрад и высвобождения микроспор. Активность каллазы *in vitro* зависит от pH окружающей среды и, следовательно, может регулироваться составом локулярной жидкости. Эта идея была высказана еще в начале 70-х годов на основании исследования пыльников петунии с различными вариантами цмс (Izhar, Frankel, 1971). У фертильных растений величина локулярного pH снижалась к концу стадии тетрад, когда каллазная активность была максимальной. У растений с цмс снижение локулярного pH происходило преждевременно или с опозданием. В соответствии с этим сдвигался максимум каллазной активности и время распада тетрад.

На современном методическом уровне с помощью микроэлектродной техники был подтвержден вывод о pH-зависимости каллазы и нарушениях динамики локулярного pH в пыльниках растений с цмс (Winiarczyk et al., 2012).

В этом случае сравнивали стерильный вид *Allium sativum*, который размножается только вегетативным путем, с фертильным *Allium atropurpureum*. Однако картина оказалась сложнее, чем предполагали ранее. У фертильного вида было обнаружено три изоформы каллазы с различными оптимумами pH. Возможно, какие-то из них нужны на более поздних стадиях развития мужского гаметофита.

В ранних работах обсуждали две главные функции каллозной оболочки: во-первых, физическая изоляция микроспороцитов от тканей спорофита, каллозу называли молекулярным фильтром; во-вторых, участие каллозы в формировании экзины и детерминации положения апертур (Blackmore et al., 2007).

Предположение об изолирующей способности каллозной оболочки до сих пор не доказано. Более того, высказывались сомнения в необходимости изоляции мейоцитов и ранних микроспор. В обоснование приводили примеры растений, у которых микроспорогенез проходит без образования каллозной оболочки. Это, например, многолетнее травянистое растение аронник альпийский *Arum alpinum* (Araceae), древовидное экзотическое растение *Pandanus odoratissimus* (Arecaceae), морские травы *Amphibolis antarctica* и *A. griffithii* (Cymodoseaceae) и др. Исходя из общих соображений о свойствах полисахаридных полимерных сетей, нет причин предполагать, что каллоза менее проницаема, чем первичная клеточная стенка.

Представления об участии каллозной оболочки в формировании экзины получили обоснования и в классических, и в современных работах (Blackmore et al., 2007). Подробнее об этом будет сказано ниже.

Экзина и апертуры

Синтез спорополленина и формирование экзины

Экзина, наружная оболочка пыльцевого зерна, защищает гаметофит от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды – физических, химических и биологических (патогенов) (Blackmore et al., 2007). Она обеспечива-

ет возможность распространения пыльцы на достаточно большие расстояния и создает условия для прикрепления пыльцевых зерен к «подходящему» рыльцу. Реализация этих функций достигается благодаря особым химическим свойствам биополимеров экзины и ее структурной организации. Важную роль в этих процессах играют апертурные участки поверхности пыльцевых зерен, где экзина существенно редуцирована или отсутствует. Именно здесь выходит из пыльцевого зерна пыльцевая трубка (Рис. 10).

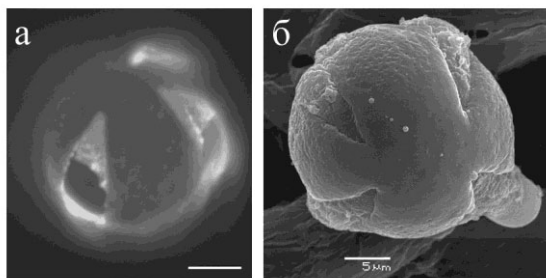


Рис. 10. Апертурные участки пыльцевого зерна табака *Nicotiana tabacum*. (а) – флуоресцентная микроскопия, (б) СЭМ, снимок любезно предоставлен С.В. Полевой.

Экзина у многих растений имеет уникальный рельеф. Особенности ее орнаментации используют в качестве таксономических признаков при изучении современных растений и в палеопалинологии при анализе ископаемых остатков. Однако общий план строения экзины у всех покрытосеменных растений принципиально одинаков. Обычно она состоит из двух слоев (Рис. 8). Наружный слой – эктэкзина, ее называют также сэкзина, внутренний слой – эндэкзина, по другой терминологии нэкзина. Для цветковых растений типична бакулатная (или столбиковая, колумеллятная) эктэкзина. Она, в свою очередь, подразделяется на внешний покровный слой (тектум), внутренний подстилающий слой и радиально ориентированные бакулы (столбики, колумеллы) между ними (Black-

more et al., 2007). Вариации формы, числа и размеров элементов эктэкины создают тысячи видоспецифичных архитектурных решений поверхности пыльцевого зерна (Рис. 11). Тектум и подстилающий слой могут быть более или менее непрерывными, иногда между покровным и подстилающим слоями располагаются не бакулы, а гранулы (гранулярная эктэкина) (Hesse et al., 2009). Внутренний слой экины, достаточно гомогенная эндэкина, непосредственно прилежит к внутреннему слою оболочки пыльцевого зерна, интине.

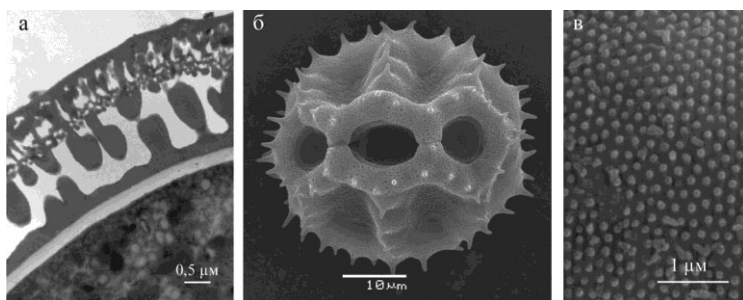


Рис. 11. Разные уровни сложности экины. (а) ТЭМ экины василька *Centaurea cyanus* (б) СЭМ экины осота *Sonchus arvensis*, (в) СЭМ поверхности пыльцевого зерна томата *Solanum lycopersicum*. Снимки любезно предоставлены С.В. Полевой (а, б) и А.В. Смирновой (в).

Экзина покрытосеменных и голосеменных растений состоит преимущественно из спорополленина. Уникальная устойчивость этого полимера к физическим и химическим воздействиям делает его трудным объектом для исследований. Считается, что это один из самых прочных и долговечных органических материалов, существующих в природе. Как известно, пыльца, точнее ее экзина, в ископаемых остатках сохраняется гораздо лучше, чем другие части растений (Ariizumi, Toriyama, 2011; Dobritsa et al., 2011).

Спорополленин обеспечивает не только механическую прочность экзины, но и ее высокий антиоксидантный потенциал (Рис. 12). Это свойство экзины было выявлено методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Экзина, выделенная из пыльцевых зерен табака (*Nicotiana tabacum*) и очищенная от компонентов протопласта и интины, эффективно инактивировала даже гидроксилрадикал – один из самых опасных свободных радикалов (Смирнова и др., 2012). Анализ показал, что антиоксидантная способность экзины связана с присутствием в составе спорополленина оксикоричных кислот, в частности, феруловой кислоты.

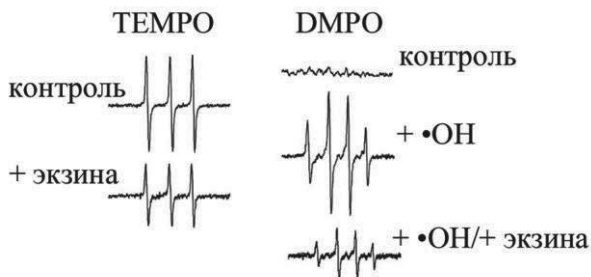


Рис. 12. Антиоксидантные свойства экзины табака. Данные электронного парамагнитного резонанса: экзина восстанавливает нитроксильный радикал TEMPO и инактивирует гидроксилрадикал, что выявляется с помощью спиновой ловушки DMPO (по данным Смирновой и др., 2012).

Процесс формирования экзины находится под двойным контролем – гаметофитным и спорофитным (Blackmore et al., 2007). С одной стороны, биосинтезы идут в развивающейся микроспоре (или даже в микроспороците), а с другой – в клетках тапетума. Именно здесь, в тапетуме, происходит основной синтез мономеров спорополленина. Механизм образования экзины все еще мало изучен, однако с определенностью можно назвать три важных его составляющих: образование каллозной оболочки, формиро-

вание примэкины и синтез главного компонента экины, спорополленина.

Образование экины начинается, когда микроспора еще находится в тетраде под толстой каллозной оболочкой (Рис.13) и заканчивается после растворения каллозы и высвобождения микроспор из тетрад. Роль каллозы в этом процессе демонстрируют мутации с нарушением ее синтеза или преждевременным растворением. Как правило, у мутантных растений уменьшена толщина экины, и она имеет упрощенную структуру (Dobritsa et al., 2011). В достаточно выраженных случаях это является причиной мужской стерильности.

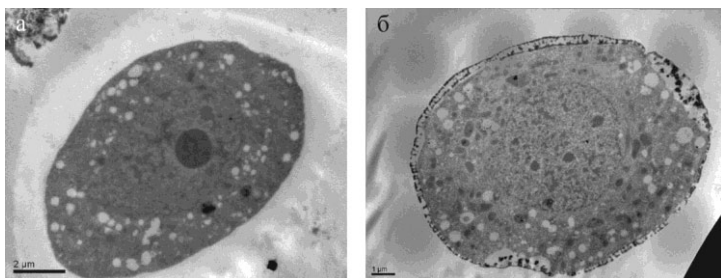


Рис. 13. Микроспора *Nicotiana tabacum*. (а) Стадия ранней тетрады – до начала формирования экины. (б) Стадия средней тетрады – по всему контуру микроспоры видны отложения спорополленина. Снимки любезно предоставлены С.В. Полевой.

Вскоре после завершения мейоза на поверхности микроспоры под каллозной оболочкой откладывается примэкина (Рис. 14). Она состоит из фибриллярного материала и выглядит как электронно-плотный слой, расположенный между плазмалеммой и каллозой. Цитохимический анализ выявил в ее составе нейтральные и кислые полисахариды, некоторое количество белков и целлюлозы (Ariizumi, Toriyama, 2011).

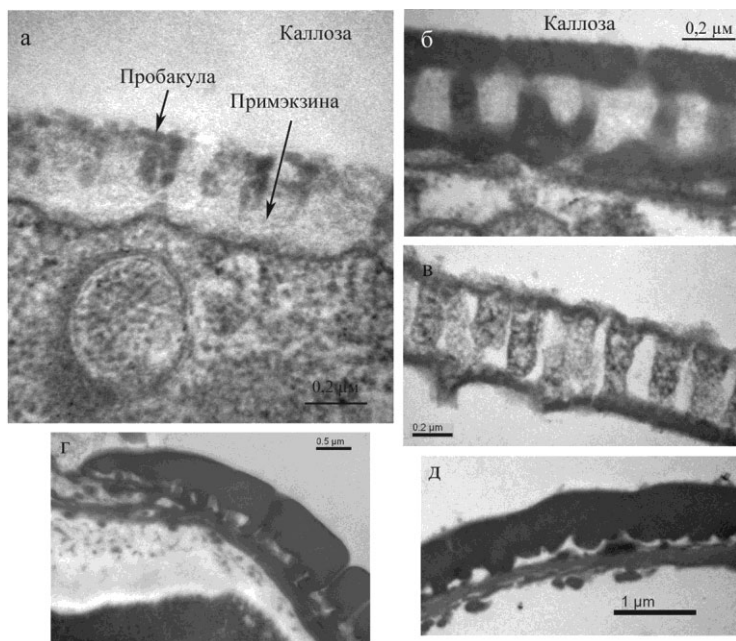


Рис. 14. Формирование экины пыльцевого зерна табака *Nicotiana tabacum*. (а) Начало образования пробакул в примэкзине. (б, в) Отложение компонентов спорополленина и его полимеризация продолжаются на средней тетрадной стадии. Ацетоллиз (в) вымывает часть компонентов, выявляя ажурную структуру элементов экины. (г, д) Экина зрелого пыльцевого зерна. Ацетоллиз (д) не изменяет структуру элементов экины по сравнению с контрольным препаратом (г). Снимки любезно предоставлены С.В. Полевой.

У многих растений после отложения примэкзины изменяется контур плазмалеммы – из гладкой она становится волнистой, образуются инвагинации (Jiang et al., 2013). Однако после высвобождения микроспор из тетрад плазмалемма опять становится гладкой, а остатки примэкзины распределяются между пробакулами экины.

Примэкзину рассматривают как матрицу (или рецепторную поверхность), на которой накапливаются предше-