

НАКОПЛЕНИЕ СПОРОПОЛЛЕНИНА В ОБОЛОЧКЕ МИКРОСПОРЫ NICOTIANA TABACUM L. В ПРОЦЕССЕ ЕЕ РАЗВИТИЯ

© Н. П. Матвеева,^{1,*} С. В. Полевова,² А. В. Смирнова,¹ И. П. Ермаков¹

¹ Кафедра физиологии растений и ² кафедра высших растений биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

* электронный адрес: n.matveyeva@yandex.ru

Изучали накопление компонентов спорополленина в оболочке микроспоры, динамику его полимеризации и возможное участие в этом процессе активных форм кислорода (АФК). С этой целью использовали флуоресцентную и электронную микроскопию (ТЭМ). Установлено, что на средней и поздней тетрадных стадиях в оболочке микроспоры накапливаются фенилпропаноидные компоненты спорополленина, которые входят в состав формирующейся экзины. На поздней тетрадной стадии они сплошь покрывают поверхность микроспоры и в больших количествах накапливаются в апертурных областях. В соответствии с этим в области апертур выявляются многочисленные толстые спорополлениновые ламеллы, электронно-плотные и устойчивые к ацетолу. Экзина в межапертурных областях включает в себя как спорополленин, устойчивый к ацетолу, так и вымываемые компоненты. Именно эти части оболочки интенсивно окрашивались флуоресцентным красителем MitoSOX Red, выявляя присутствие АФК. Окраска исчезала после обработки микроспор супероксиддисмутазой, что указывает на присутствие в экзине супероксид-радикала. Супероксид-радикал легко переходит в перекись водорода, которая может служить субстратом реакций окислительной полимеризации компонентов спорополленина с образованием химически устойчивого биополимера. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об участии АФК в формировании спорополленина.

Ключевые слова: экзина, тетрада микроспор, спорополленин, АФК.

Пыльцевое зерно в обезвоженном состоянии переносится из пыльника на рыльце пестика, где гидратируется и прорастает. Важную роль в этих процессах играет оболочка пыльцевого зерна, которая включает в себя внутренний слой — интину и наружный — экзину (Blackmore et al., 2007). Экзина редуцирована в области апертур, где прорастает пыльцевая трубка. Благодаря уникальной архитектуре экзины обезвоженное пыльцевое зерно складывается, убирая апертурные внутрь, и быстро восстанавливает свой объем при регидратации (гармомегатия) (Katifori et al., 2010). В обезвоженной пыльце экзина является главным барьером на пути инфекции и УФ-радиации, а ее липофильные компоненты могут контролировать процессы узнавания и адгезии пыльцевого зерна на рыльце (Zinkl et al., 1999).

При всей сложности и морфологическом разнообразии паттерна экзины у разных видов растений ее структура имеет черты принципиального сходства. Обычно она состоит из двух слоев. Внутренний слой — эндэкзина, как правило, гомогенная, изредка ламеллярная (Weber, Ulrich, 2010). Наружный слой — эктэкзина — в свою очередь подразделяется на внешний покровный слой, внутренний подстилающий слой и радиально ориентированные столбики между ними (Blackmore et al., 2007). Морфологические слои экзины различаются и по химическому составу, о чем свидетельствуют данные цитохимического анализа (Southworth, 1973; Weber, Ulrich, 2010).

Образование экзины начинается после завершения мейоза, когда четыре гаплоидные микроспоры объединены массивной каллозной (бета-1,3-глюкановой) оболочкой в тетраду (Blackmore et al., 2007). На поверхности плазмалеммы микроспоры, исключая места расположения будущих пор, откладывается полисахаридная прим-экзина. Ее рассматривают как матрицу (или рецепторную поверхность), на которой накапливаются предшественники спорополленина и формируется характерный паттерн экзины. Полагают, что важную роль в этих процессах играет самосборка (Gabarayeva, Hemsley, 2006). Наиболее интенсивное накопление спорополленина происходит после растворения каллозной оболочки и выхода свободных микроспор из тетрад. Формирование спородермы завершается около митоза микроспоры.

Основной компонент экзины биополимер спорополленин характеризуется высокой устойчивостью к химическим и физическим воздействиям. В последние годы растет интерес к его практическому использованию, разрабатывают технологии создания высокоинертных микрокапсул для пищевой и фармацевтической промышленности (Barrier et al., 2010).

Вопрос о химическом составе спорополленина не решен окончательно (Ariizumi, Toriyama, 2011). Разнообразными методами установлено, что спорополленин как голосеменных, так и покрытосеменных растений содержит алифатические и фенольные компоненты. Согласно од-

ной из моделей, спорополнение представляет собой полимерную сеть, образованную из цепей небольших алифатических мономеров и остатков окисленных ароматических кислот, преимущественно оксикоричных, — *p*-кумаровой и феруловой (Blackmore et al., 2007). Эта сеть характеризуется высоким содержанием карбоксильных групп, а также ненасыщенных углеродных и эфирных связей. Сравнительный анализ спорополнения из пыльцы разных типов привел к заключению о том, что у ископаемых растений в нем выше содержание алифатических компонентов, тогда как в полимерном матриксе экзины современных растений преобладают окисленные ароматические мономеры главным образом *p*-кумаровой и феруловой кислот (De Leeuw et al., 2006). Эти кислоты и, возможно, другие фенилпропаноидные соединения ответственны за аутофлуоресценцию экзины, возбуждаемую УФ (Willemse, 1972; Wehling et al., 1989; Morant et al., 2007).

Механизмы полимеризации спорополнения не изучены. Не установлено, когда этот процесс начинается и посредством каких механизмов реализуется. Scott (1994) высказал предположение о том, что в качестве агента, сшивающего компоненты спорополнения, может выступать супероксид-радикал. Эта гипотеза не подвергалась экспериментальной проверке. Однако показано, что в период гидратации зрелая пыльца амброзии и табака выделяет в оболочку и окружающую среду активные формы кислорода (АФК), источником которых является NADPH-оксидаза плазмалеммы (Boldogh et al., 2005; Смирнова и др., 2009).

Представления о влиянии АФК на свойства клеточной стенки сформировались в результате исследований соматических клеток. Установлено, что реакции окислительной полимеризации с участием АФК играют важную роль в процессах синтеза лигнина и суберина (Passardi et al., 2005), а также в формировании полимерного матрикса первичной клеточной стенки (Lindsay, Fry, 2007). Оксикоричные кислоты, образуя простые и сложные эфиры с полимерами клеточной стенки, могут сшивать полисахаридные молекулы друг с другом, а также с белками и лигнином, увеличивая тем самым прочность матрикса. Реакции окислительной полимеризации, идущие в первичных клеточных стенках с участием АФК и оксикоричных кислот, были исследованы в модельных экспериментах, а также в культурах изолированных клеток кукурузы, шпината, ячменя, арабидопсиса, клена, томата и розы (Lindsay, Fry, 2008; Bunzel, 2010).

В задачи настоящей работы входило изучение методами флуоресцентной и электронной микроскопии динамики накопления и полимеризации спорополнения в ходе развития микроспоры и пыльцевого зерна табака и выявление участия АФК в этих процессах.

Материал и методика

Растительный материал. Растения табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Petit Navana SR1) выращивали из семян в климатической камере (25 °С, 16-часовой световой день) в вермикулите вспученном, регулярно поливая их питательным раствором (Nitsch, 1965).

Исследовали разные этапы развития тетрады микроспор (стадия 1 по: Koltunow et al., 1990), свободные микроспоры на ранней посттетрадной стадии (стадия 2) и зрелые пыльцевые зерна, завершившие развитие в пыльнике

(стадия 12) и гидратированные *in vitro*. Часть материала из каждого бутона, предназначенного для электронно-микроскопического анализа, тестировали методами флуоресцентной микроскопии.

Реактивы. Использовали MitoSOX Red (Molecular Probes, Нидерланды), супероксиддисмутаза (СОД) фирмы Sigma (США), глутаральдегид (Merck, Германия), эпоксидные смолы (эпоны) фирмы Fluka (Швейцария), OsO₄ и уранил-ацетат (Химреактив, Россия).

Подготовка проб для флуоресцентной и электронной микроскопии. Тетрадные микроспоры вытряхивали из пыльников с помощью препаровальных иголок в каплю стандартной среды, дополненной 0.25 М маннитом. Стандартная среда включала в себя 1.6 мМ Н₃В₃О₃, 3 мМ Са(НО₃)₂, 0.8 мМ MgSO₄ и 1 мМ КНО₃ в 50 мМ MES-Tris буферном растворе (рН 5.9).

Для получения проб зрелой пыльцы пыльники извлекали из цветков накануне раскрытия и помещали в термостат при 25 °С на 2 сут. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при –20 °С. После размораживания навески сухой пыльцы инкубировали во влажной камере 2 ч при 25 °С, при этой же температуре пыльцу гидратировали в стандартной питательной среде, содержащей 0.3 М сахарозу.

Суспензии микроспор использовали для анализа аутофлуоресценции спорополнения в витальных препаратах. Часть материала на стадии поздних тетрад микроспор использовали для изучения вклада АФК в его полимеризацию. С этой целью микроспоры окрашивали флуоресцентным красителем MitoSOX (5 мкМ, 15 мин), который позволяет выявить присутствие супероксид-радикала в экзине (Смирнова и др., 2009). В качестве контроля использовали препараты тетрад, выделенных из того же бутона и обработанных СОД (100 ед./мл, 25 мин).

Пробы для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом, приготовленным на 0.1 М фосфатном буферном растворе (рН 7.3). Для того чтобы выявить присутствие в спородерме полимеризованного спорополнения, часть материала из каждого бутона подвергали ацетолизной обработке по общепринятой схеме, прогревая образцы в смеси концентрированной серной кислоты с уксусным ангидридом (Hesse et al., 2009). Другую часть использовали в качестве контроля.

После фиксации пробы промывали фосфатным буфером и дополнительно фиксировали 2%-ным раствором OsO₄ (2 ч при комнатной температуре), затем проводили через серию спиртов возрастающей концентрации до 70 % и контрастировали спиртовым раствором уранил-ацетата с последующей проводкой через спирты и ацетон. Обезвоженный материал заключали на ночь в смесь ацетона и эпонов, а затем в чистую смесь эпонов. Материал в эпоне выдерживали 1 сут при комнатной температуре и затем еще 2 сут при 62 °С (Уикли, 1975). Ультратонкие срезы получали при помощи ультратома Leica (Германия). Срезы контрастировали водным уранил-ацетатом (Гайер, 1974).

Микроскопия и компьютерный анализ изображения. Для флуоресцентной микроскопии и морфометрии на световом уровне использовали исследовательский микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, цифровую камеру AxioCam HRC и пакет программ AxioVision 4.7 (Zeiss, Германия). Флуоресценцию возбуждали ртутной лампой. Для анализа флуоресценции использовали следующие блоки фильтров. Для аутофлуоресценции воз-

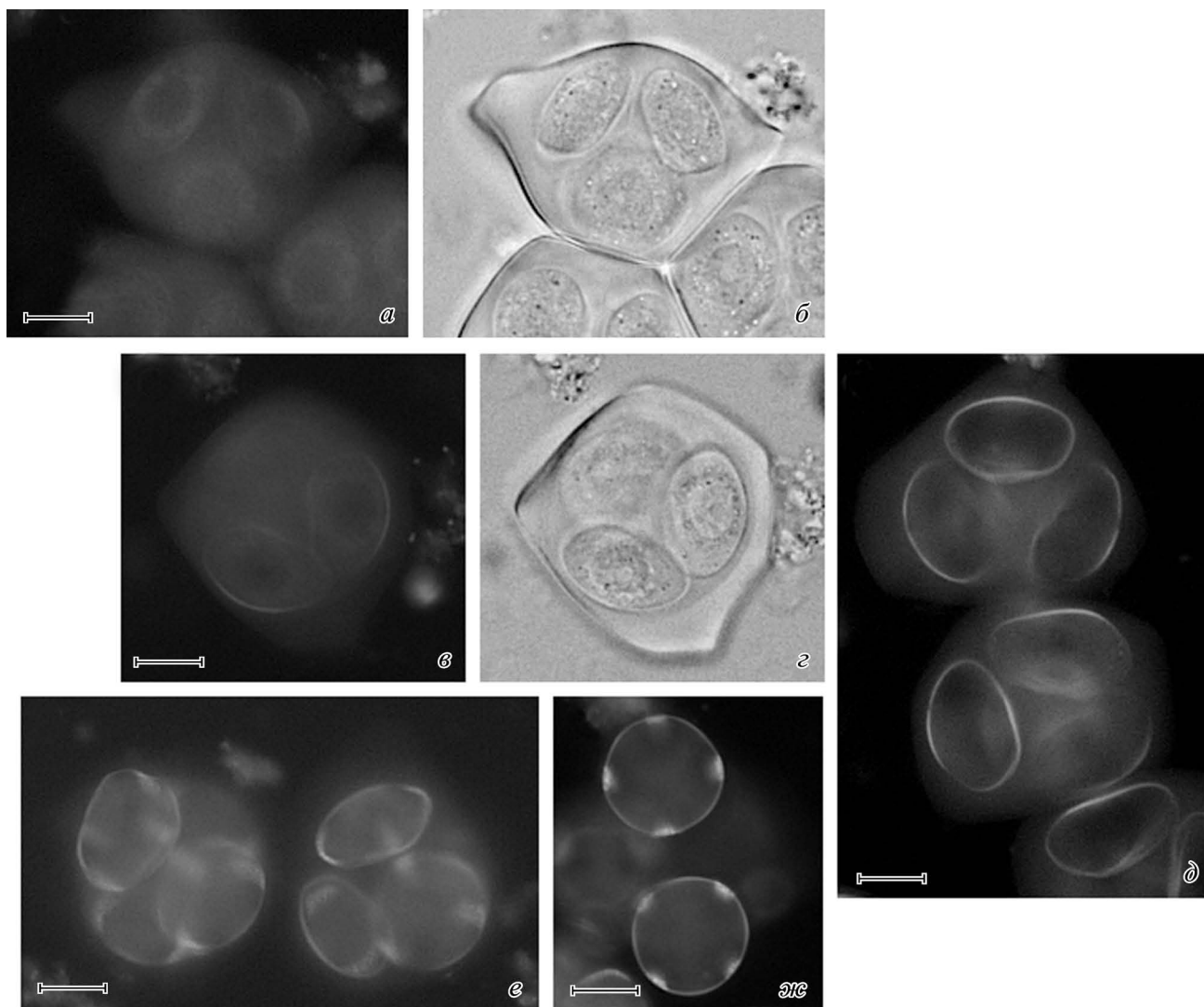


Рис. 1. Изменения аутофлуоресценции оболочки микроспоры, отражающие накопление фенилпропаноидных компонентов спорополленина в процессе развития экзины.

На стадии ранней тетрады (а, б) флуоресцирующие компоненты в оболочке отсутствуют. Накопление этих компонентов начинается (в, з) между стадиями ранней и средней (д) тетрад. На средней тетрадной стадии (д) флуоресцирует оболочка по всему контуру микроспоры. В поздней тетраде (е) и на стадии распада тетрад (ж) наиболее интенсивно флуоресцируют области апертур. а, в, д—ж — аутофлуоресценция тетрад микроспор, возбуждаемая в УФ-области спектра; б, з — тетрады в светлом поле. Масштабные отрезки — 10 мкм.

буждение в диапазоне 359—371 нм, регистрация при длинах волн > 397 нм; для MitoSOX возбуждение при 540—552 нм, регистрация при длинах волн > 590 нм.

ТЭМ проводили в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ, используя электронный микроскоп JEM-1011 (Jeol, Япония).

Результаты

Накопление фенилпропаноидных компонентов спорополленина в оболочке микроспоры. Анализ аутофлуоресценции микроспор, возбуждаемой в УФ-области спектра, показал, что в ранних тетрадах еще нет заметных количеств флуоресцирующих компонентов спорополленина (рис. 1, а, б). Постепенно эти компоненты накапливались в оболочке в зонах, перпендикулярных полярной оси микроспоры

(рис. 1, в, з); эта ось проходит через центр тетрады и наиболее наружную точку микроспоры (Hesse et al., 2009).

На средней тетрадной стадии вся микроспора была окружена равномерно флуоресцирующей оболочкой (рис. 1, д). В поздней тетраде (рис. 1, е) и на ранней стадии свободных микроспор (рис. 1, ж) наиболее ярко флуоресцировали области апертур. Эти данные свидетельствуют о том, что к стадии поздней тетрады фенилпропаноидные компоненты спорополленина сплошь покрывают поверхность микроспоры и в больших количествах накапливаются в апертурных областях.

Динамика полимеризации спорополленина в ходе развития микроспоры. В предварительном исследовании было установлено, что ацетолит зрелых гидратированных пыльцевых зерен, как и следовало ожидать, не произвел существенных изменений в строении экзины. Ультраструктурная организация экт- и эндэзины не изменилась, сохранились и средние размеры от-

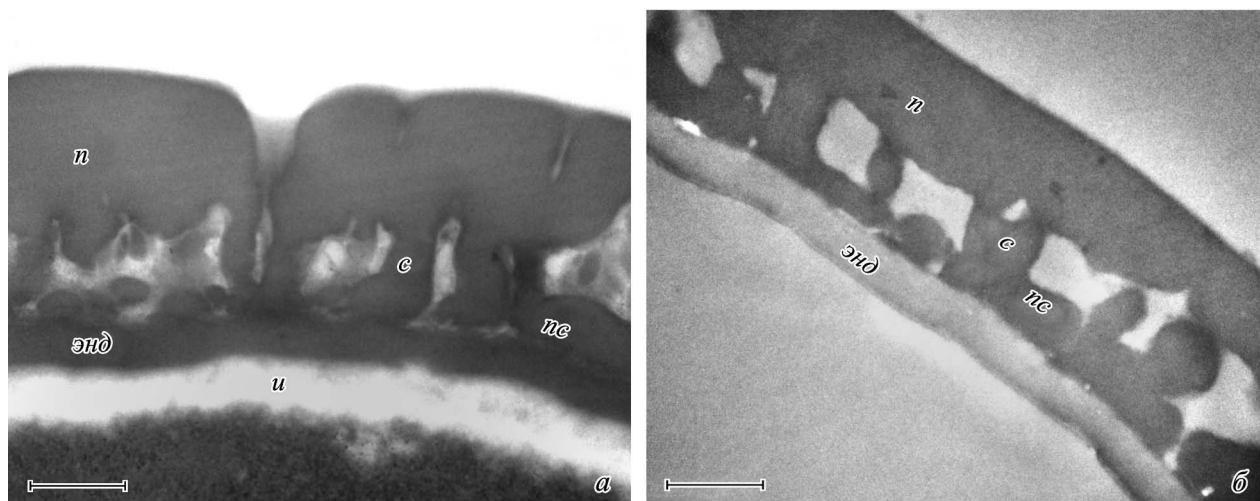


Рис. 2. Межапертурная часть спородермы зрелого гидратированного пыльцевого зерна до (а) и после (б) ацетолиза. *и* — интина, *п* — покров, *пс* — подстилающий слой, *с* — столбик, *энд* — эндэксина. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

дельных элементов эктэксины — покрова, столбиков и подстилающего слоя (рис. 2, а, б).

На ранней тетрадной стадии ацетоллиз полностью растворил спородерму, что хорошо согласуется с отсутствием в ней фенолпропаноидных компонентов спорополленина (рис. 1, а). На средней тетрадной стадии в межапертурных областях оболочки выявлялись элементы формирующейся экзины — вначале покров и столбики (рис. 3, а), позже появлялся подстилающий слой (рис. 3, в). В области будущей эндоапертуры оболочка микроспоры была утолщена и имела линзовидную форму. В начале средней тетрадной стадии в большей своей части она была электронно-светлой, а на наружной поверхности располагались электронно-плотные гранулы (рис. 3, а). Таким образом, на всей поверхности микроспоры спородерма включала в себя электронно-плотные элементы, что соответствовало флуоресцентной картине, представленной на рис. 1, д. Однако такая спородерма не выдерживала ацетолиза.

В устойчивой к ацетоллизу спородерме линзовидное тело в области будущей апертуры содержало осмиофильные элементы (рис. 3, б), более темные, чем столбики в межапертурных участках экзины (рис. 3, в). Покров в отдельных местах состоял из электронно-плотных гранул, часто слившихся в единый слой. Столбики в контрольных препаратах имели тонкий светлый канал — цилиндрические мицеллы (по терминологии: Gabarayeva, Hemsley, 2006). Основания столбиков опирались на тонкий прерывистый подстилающий слой. После ацетолиза сохраня-

лись осмиофильные элементы в линзовидном теле (рис. 3, з), но покров и в еще большей мере столбики приобретали ажурную ультраструктуру с большим количеством округлых полостей, которые выявлялись и на косых (парадермальных) срезах (рис. 3, д).

Сходные изменения вызывал ацетоллиз и в микроспоре на поздней тетрадной стадии (рис. 4). Сферические полости, однородные по размеру и форме, по-прежнему выявлялись в столбиках ацетоллизированной экзины, но теперь они были видны еще и в подстилающем слое (рис. 4, з). Покров экзины (рис. 4, б), существенно утолщенный по сравнению со средней тетрадной стадией (рис. 3, в; см. таблицу), после ацетолиза оставался электронно-плотным, гомогенным, с редкими узкими перфорациями (рис. 4, з). Отметим, что электронно-плотные элементы эндэксины, присутствующие на этой стадии в межапертурной спородерме (рис. 4, б) и в концевых частях апертур, также сохранялись после ацетолиза (рис. 4, з). Линзовидное тело на этой стадии было пронизано устойчивыми к ацетоллизу электронно-плотными толстыми ламеллами (рис. 4, а, в).

Данные морфометрического анализа ультраструктуры экзины в контрольных препаратах уточняют динамику накопления спорополленина (см. таблицу). На стадии поздней тетрады элементы эктэксины (столбики и покров) по величине существенно превосходили соответствующие элементы на стадии средней тетрады ($P < 0.01$). Рост столбиков на этом заканчивался, а подстилающий слой, покров и эндэксина продолжали расти. Линзовид-

Данные морфометрического анализа ультраструктуры экзины микроспор и пыльцевых зерен

Стадия развития	Эктэксина			Эндэксина		Толщина линзовидного тела или интины в центральной части апертуры, мкм
	столбики, высота, мкм	покров, мкм	подстилающий слой, мкм	вне апертуры, мкм	в борозде, мкм	
Тетрада микроспор, средняя стадия	0.24 ± 0.02 ^а	0.07 ± 0.01 ^а	—	—	—	0.63 ± 0.08
Тетрада микроспор накануне распада (поздняя стадия)	0.35 ± 0.02 ^а	0.16 ± 0.02	0.11 ± 0.02 ^а	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.04	1.50 ± 0.09
Зрелое пыльцевое зерно	0.40 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.38 ± 0.04	1.80 ± 0.08

^а Отмечены значения, относящиеся к элементам экзины, в которых выявлены неустойчивые к ацетоллизу компоненты.

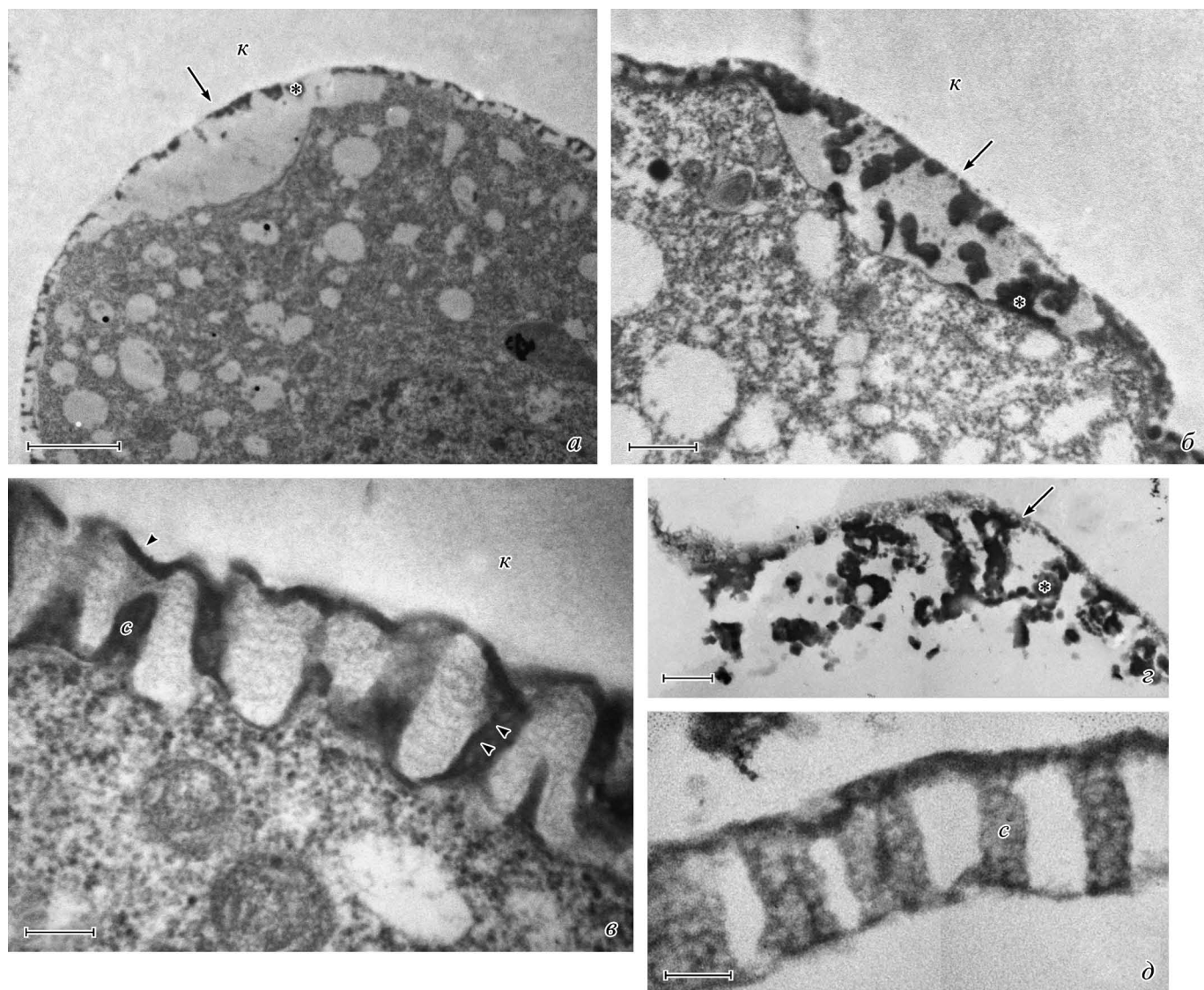


Рис. 3. Микроспора в начале (а) и в конце (б–д) средней тетрадной стадии до (а–в) и после (з, д) ацетализа. а, б, з — область будущей апертуры; в, д — внеапертурный участок. к — каллоза, с — столбик эктэксины; стрелки указывают на апертуру, головки стрелок — на непрерывный электронно-плотный участок покрова, пара головок стрелок — на тонкий светлый канал в столбике, звездочки — осмиофильные элементы в апертурной области. Масштабные отрезки: а — 1 мкм, б, з — 0.5 мкм, в, д — 0.2 мкм.

ное тело в зоне будущей эндоапертуры существенно утолщалось по мере развития микроспор в тетраде: на стадии поздней тетрады эта структура по толщине приближалась к интине поровой области.

Эксперименты с ацетализом показали, что в спородерме микроспоры на стадиях средней и поздней тетрад в спорополненом матриксе еще имеются компоненты, вымываемые при ацетализе, — это частично полимеризованные участки спорополленина или его свободные мономеры. Их присутствие указывает на то, что процесс полимеризации спорополленина в эктэксине растянут во времени. На средней тетрадной стадии этот процесс локализован в покрове и столбиках, на поздней тетрадной стадии — в столбиках и подстилающем слое. В апертурной спородерме на поздней стадии выявляются только устойчивые к ацетализу ламеллярные структуры.

Выявление АФК в спородерме микроспоры. Для того чтобы ответить на вопрос о возможном при-

сутствии в спородерме АФК, поздние тетрады, выделенные из пыльников, окрашивали флуоресцентным красителем MitoSOX Red (рис. 5). В окрашенных микроспорах была видна интенсивно флуоресцирующая оболочка, причем в области апертур флуоресценция была существенно слабее, чем в межапертурных зонах (рис. 5, а). Аутофлуоресценция тетрады, взятой на той же стадии развития, в тех же условиях возбуждения (зеленая область спектра) и регистрации была пренебрежимо мала (рис. 5, б) и слабо выявлялась лишь в области апертур. После обработки СОД интенсивность флуоресценции оболочки в препаратах, окрашенных MitoSOX, существенно снижалась (рис. 5, в), одновременно с этим обнаруживалась флуоресценция митохондрий, которая ранее экранировалась ярко светящейся оболочкой (рис. 5, а). Это позволяет говорить о присутствии супероксид-радикала в экзине микроспор на стадии поздней тетрады.

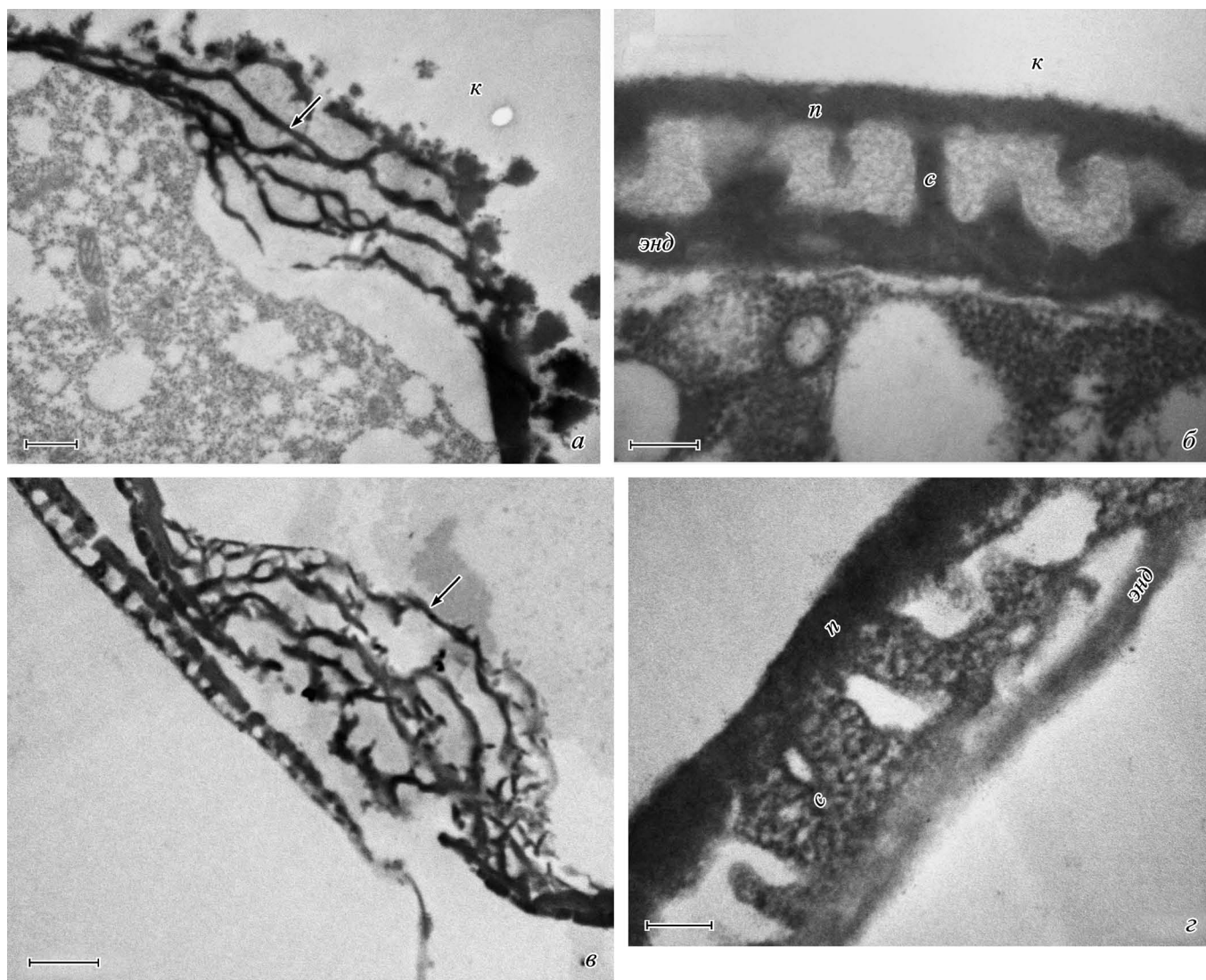


Рис. 4. Оболочка микроспоры на поздней тетрадной стадии до (а, б) и после (в, з) ацетолиза.

а, в — область будущей эндопертуры, стрелками указаны электронно-плотные ламеллы линзовидного тела пертуры; б, з — внепертурный участок спородермы. к — каллоза, п — покров, с — столбик эктэксина, энд — эндэксина. Масштабные отрезки: а, в — 0.5 мкм, б, з — 0.2 мкм.

Обсуждение

Ранние работы по изучению цитохимии экзины выявили отсутствие специфических красителей на спорополленине (Southworth, 1973). Вместе с тем было показано, что, анализируя спектры поглощения оболочек в УФ и возбуждаемой при этом аутофлуоресценции, можно дифференцировать слои экзины (Willemse, 1972; Southworth, 1983). Однако технические возможности того времени не позволяли регистрировать слабые сигналы и получать удовлетворительное изображение флуоресцирующих микроспор. На основе новой инструментальной базы для возбуждения и регистрации флуоресценции в работе показали накопление в оболочке фенилпропаноидных компонентов спорополленина в процессе развития микроспоры и пыльцевого зерна (рис. 1). Полученные при этом результаты были сопоставлены с данными ТЭМ о формировании экзины (рис. 2—4; см. таблицу), а также с результатами флуоресцентного выявления АФК в экзине микроспор (рис. 5). Для того чтобы установить локализацию в спородерме неполимеризованных компонентов спорополленина, мы изучали ее устойчивость к ацетолизу. Это свойство является отличительной особенностью спорополленина (Blackmore et al., 2007). Экзина зрелой пыльцы, как правило, устойчива к ацетолизу, однако известны мутантные растения с чувствительной экзиной. В качестве примера можно привести мутант арабидопсиса *flp1* (*faceless pollen-1*), у которого в тапетуме происходит синтез предшественников спорополленина, но устойчивость экзины существенно снижена (Ariizumi et al., 2003). Это связывают с нарушениями полимеризации спорополленина и (или) процессов доставки его предшественников из тапетума в оболочку микроспоры.

Анализ развития микроспор показал, что оба метода — флуоресцентная микроскопия и ТЭМ — выявляют накопление компонентов спорополленина на стадиях средней и поздней тетрады (рис. 1, в, д—ж; 3; 4; см. таблицу). Элементы экзины после ацетолиза сохраняли свои размеры и форму, но некоторые из них приобрели ажурную ультраструктуру: столбики и покров на средней тетрадной стадии (рис. 3, д) и столбики и подстилающий слой в поздней тетраде (рис. 4, з). Это означает, что в спо-

полленина, мы изучали ее устойчивость к ацетолизу. Это свойство является отличительной особенностью спорополленина (Blackmore et al., 2007). Экзина зрелой пыльцы, как правило, устойчива к ацетолизу, однако известны мутантные растения с чувствительной экзиной. В качестве примера можно привести мутант арабидопсиса *flp1* (*faceless pollen-1*), у которого в тапетуме происходит синтез предшественников спорополленина, но устойчивость экзины существенно снижена (Ariizumi et al., 2003). Это связывают с нарушениями полимеризации спорополленина и (или) процессов доставки его предшественников из тапетума в оболочку микроспоры.

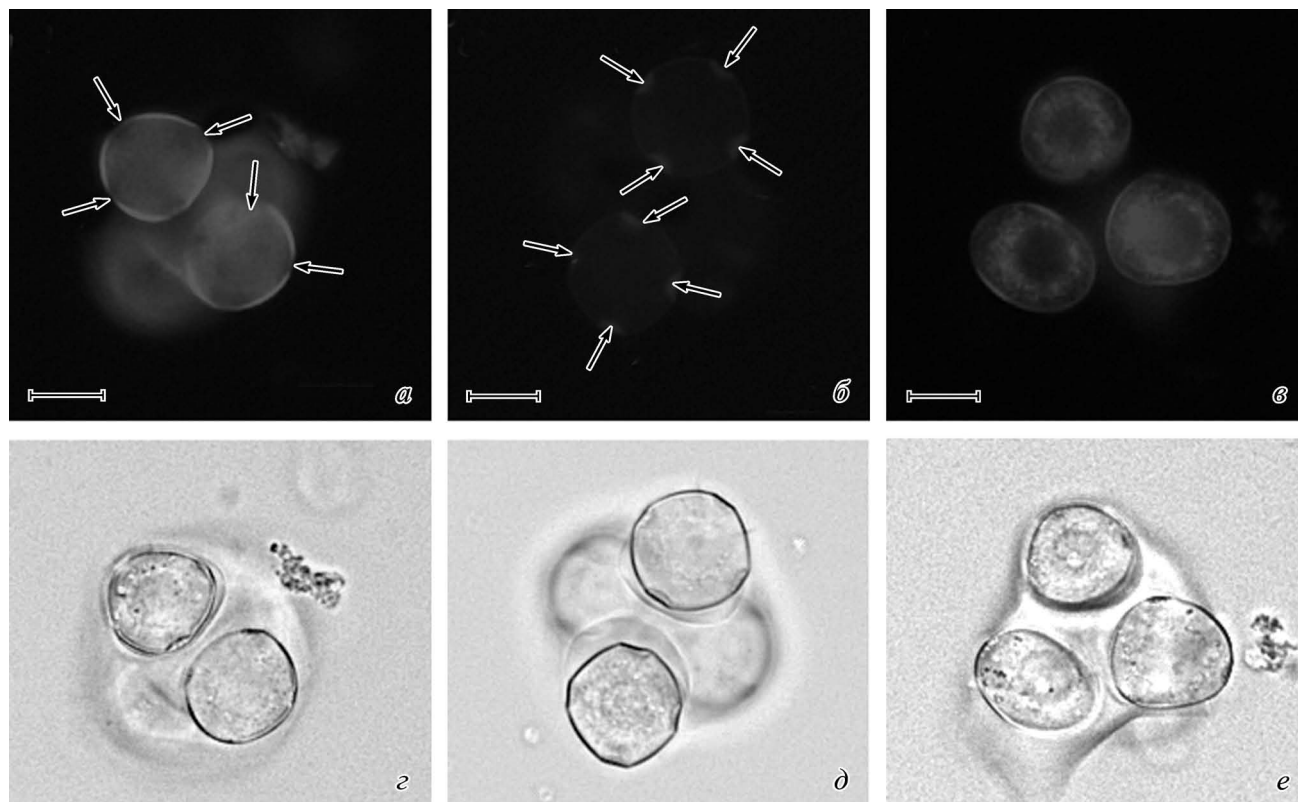


Рис. 5. Выявление АФК в оболочке (а) и в митохондриях (б) микроспор с использованием MitoSOX Red.

Аутофлуоресценция микроспор (б), возбуждаемая в зеленой области спектра, была пренебрежимо мала. Яркая флуоресценция оболочек (а) исчезала после обработки тетрад СОД (в), при этом выявлялись окрашенные митохондрии. г–е — те же тетрады в светлом поле. Стрелками указаны области апертур. Масштабные отрезки — 10 мкм.

рополненом матриксе были полости, заполненные свободными, не включенными в полимер компонентами. Таким образом, на стадии тетрад идет полимеризация спорополленина во всем объеме этих элементов экзины. На более поздних стадиях, когда толщина покрова существенно возрастает (см. таблицу), процесс полимеризации, по-видимому, локализован преимущественно на поверхности. Полученные данные выявляют последовательность завершения «объемной» полимеризации в ходе развития тетрады: в первую очередь устойчивость к ацетолузу приобретает наружный слой — покров.

В целом наши данные хорошо согласуются с общепринятыми представлениями о том, что характерный паттерн экзины возникает раньше, чем завершается полимеризация спорополленина (Scott, 1994). В основе таких представлений лежит ранняя работа (Heslop-Harrison, 1968) об изменении устойчивости спородермы к ацетолузу в процессе развития микроспоры лилии.

Наибольший интерес представляет период накануне и сразу после распада тетрад микроспор (рис. 1, е, ж). На этой стадии можно выделить области спородермы, где присутствует только полимеризованный спорополленин, — апертуры, центральная часть которых содержит толстые устойчивые к ацетолузу ламеллы (рис. 4, а, в) и характеризуется наиболее яркой аутофлуоресценцией (рис. 1, е, ж). В то же время в межапертурных областях наряду с полимеризованным спорополленином выявляются свободные или непочто связанные фенилпропаноидные компоненты, вымываемые в ходе ацетолуза (рис. 4, г). Именно эту стадию мы выбрали для изучения вопроса об участии АФК в формировании экзины. С этой

целью был использован флуоресцентный краситель MitoSOX. В гидрофобном окружении краситель, окисленный в реакции взаимодействия с АФК, интенсивно флуоресцирует при возбуждении в зеленой области. В качестве гидрофобной матрицы может служить молекула ДНК, искусственная гидрофобная мембрана или экзина (Olmsted, Kearns, 1977; Bunker et al., 1999; Смирнова и др., 2009). В исследованиях, проведенных с использованием изолированных экзин, было показано, что краситель окисляется супероксид-радикалом, но не перекисью водорода (Смирнова и др., 2009).

После окрашивания MitoSOX поверхность микроспор в поздних тетрадах интенсивно флуоресцировала, исключая поровые области (рис. 5, а). Аутофлуоресценция в этих условиях возбуждения и съемки была очень низкой и выявлялась главным образом именно в поровых областях (рис. 5, б). Поскольку СОД существенно снижала интенсивность флуоресценции оболочки, окрашенной MitoSOX (рис. 5, в), можно сделать вывод о присутствии в экзине значительных количеств супероксид-радикала. Выявление митохондрий в микроспорах, обработанных СОД, хорошо согласуется с данными литературы о сегрегации этого красителя в митохондриях, где он связывается с ДНК и окисляется супероксид-радикалом (Robinson et al., 2006).

Таким образом, в экзине микроспоры выявлены зоны в области апертуры, где сосредоточен полимеризованный спорополленин и не обнаруживаются АФК, и межапертурные зоны, где процесс полимеризации спорополленина еще не завершен и где присутствуют значительные количества супероксид-радикала. Эти данные свидетельст-

вуют об участии АФК в формировании полимерной сети матрикса экзины. Супероксид-радикал, спонтанно или под действием супероксиддисмутазы, присутствующей в оболочке пыльца (Alché et al., 1998), способен переходить в перекись водорода. Последняя может служить субстратом реакций окислительной полимеризации компонентов спорополленина с образованием химически устойчивого биополимера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-00605-а и 10-04-00945-а) и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» по направлению «Клеточные технологии» (Государственный контракт П-403).

Список литературы

- Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. М.; Мир. 448 с.
- Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Полеская О. Г., Ермаков И. П. 2009. Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна. Онтогенез. 40 (6) : 425—435.
- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 319 с.
- Alché J. D., Francisco J. C., Rodriguez-García M. I., del Rio L. A. 1998. Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol. Plant.* 104 : 772—776.
- Ariizumi T., Hatakeyama K., Hinata K., Sato S., Kato T., Tabata S., Toriyama K. 2003. A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, *faceless pollen-1*, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol. Biol.* 53 : 107—116.
- Ariizumi T., Toriyama K. 2011. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62 : 1.1—1.24.
- Barrier S., Rigby A. S., Diego-Taboada A., Thomasson M. J., Mackenzie G., Atkin S. L. 2010. Sporopollenin exines: a novel natural taste masking material. *Food Sci. Technol.* 43 : 73—76.
- Blackmore S., Wortley A. H., Skvarla J. J., Rowley J. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* 174 : 483—498.
- Boldogh I., Bacsai A., Choudhury B. K., Dharajiya N., Alam R., Hazra T. K., Mitra S., Goldblum R. M., Sur S. 2005. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 115 : 2169—2179.
- Bunker C. E., Rollins H. W., Ma B., Simmons K. J., Liu J.-T., Ma J.-J., Martin C. W., DesMarteau D. D., Sun Y.-P. 1999. Fluorescence spectroscopic probing of two distinctive microenvironments in perfluorinated ionomer membranes. *J. Photochem. Photobiol. A.* 126 : 71—76.
- Bunzel M. 2010. Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.* 9 : 47—64.
- De Leeuw J. W., Versteegh G. J. M., van Bergen P. F. 2006. Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues. *Plant Ecology.* 182 : 209—233.
- Gabarayeva N., Hemsley A. R. 2006. Merging concepts: the role of self-assembly in the development of pollen wall structure. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 138 : 121—139.
- Heslop-Harrison J. 1968. Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. *Can. J. Bot.* 46 : 1185—1192.
- Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo R. A., Ulrich S. 2009. Pollen terminology. Wien: Springer-Verlag. 261 p.
- Katiferi E., Alben S., Cerda E., Nelson D. R., Dumais J. 2010. Foldable structures and the natural design of pollen grains. *PNAS USA.* 107 : 7635—7639.
- Koltunow A. M., Truettner J., Cox K. H., Wallroth M., Goldberg R. B. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell.* 2 : 1201—1224.
- Lindsay S. E., Fry S. C. 2007. Redox and wall-restructuring. In: *The expanding cell.* Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 6 : 159—190.
- Lindsay S. E., Fry S. C. 2008. Control of diferulate formation in dicotyledonous and gramineous cell-suspension cultures. *Planta.* 227 : 439—452.
- Morant M., Jorgensen K., Schaller H., Pinot F., Moller B. L., Werck-Reichhart D., Bak S. 2007. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell.* 19 : 1473—1487.
- Nitsch J. P. 1965. Deux especes photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 9 : 517—522.
- Olmsted J., Kearns D. R. 1977. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry.* 16 : 3647—3564.
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24 : 255—265.
- Robinson K. M., Janes M. S., Pehar M., Monette J. S., Ross M. F., Hagen T. M., Murphy M. P., Beckman J. S. 2006. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *PNAS USA.* 103 : 15038—15043.
- Scott R. J. 1994. Pollen exine: the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: *Molecular and cellular aspects of plant reproduction.* Cambridge; New York: Cambridge Univ. Press. 49—81.
- Southworth D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *J. Histochem. Cytochem.* 21 : 73—80.
- Southworth D. 1983. Developmental changes in UV absorbance by pollen exine layers in *Gerbera* (Asteraceae). *Grana.* 22 : 115—118.
- Weber M., Ulrich S. 2010. The endexine: a frequently overlooked pollen wall layer and a simple method for detection. *Grana.* 49 : 83—90.
- Wehling K., Niester Ch., Boon J. J., Willemse M. T. M., Wiermann R. 1989. *p*-Coumaric acid — a monomer in the sporopollenin skeleton. *Planta.* 179 : 376—380.
- Willemse M. T. M. 1972. Changes in the autofluorescence of the pollen wall during microsporogenesis and chemical treatments. *Acta Bot. Neerl.* 21 : 1—16.
- Zinkl G. M., Zwiebel B. I., Grier D. G., Preuss D. 1999. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development.* 126 : 5431—5440.

Поступила 22 IV 2011

SPOROPOLLENIN ACCUMULATION IN *NICOTIANA TABACUM* L. MICROSPORE WALL DURING ITS DEVELOPMENT*N. P. Matveyeva,^{1,*} S. V. Polevova,² A. V. Smirnova,¹ I. P. Yermakov¹*¹ Plant Physiology Department and ² Higher Plant Department of Biology Faculty,
M. V. Lomonosov Moscow State University;

* e-mail: n.matveyeva@yandex.ru

Accumulation of sporopollenin components in microspore wall, its polymerization dynamics and possible participation of reactive oxygen species (ROS) in this process has been studied. For this purpose fluorescent and electron microscopy (TEM) was used. It has been determined that phenylpropanoid components of sporopollenin that form the exine accumulate in the microspore cell wall at the middle and late tetrad stages. At the late tetrad stage, they fully cover the microspore surface and accumulate abundantly in aperture areas. In accordance with this, numerous thick sporopollenin lamellae, electron-dense and acetolysis-resistant, emerge in aperture areas. Exine in the areas between apertures includes both acetolysis-resistant sporopollenin and washout components. These particular parts of the wall are intensively stained with fluorescent dye MitoSOX, which detects the presence of ROS. The staining disappeared after the treatment of microspore with superoxide dismutase, demonstrating the presence of superoxide in the exine. Superoxide easily converts to hydrogen peroxide, which can cause oxidative polymerization of sporopollenin components, leading to the formation of chemically stable biopolymer. The data obtained favor the hypothesis of ROS involvement in the formation of sporopollenin.

Key words: exine, microspore tetrad, sporopollenin, ROS.
