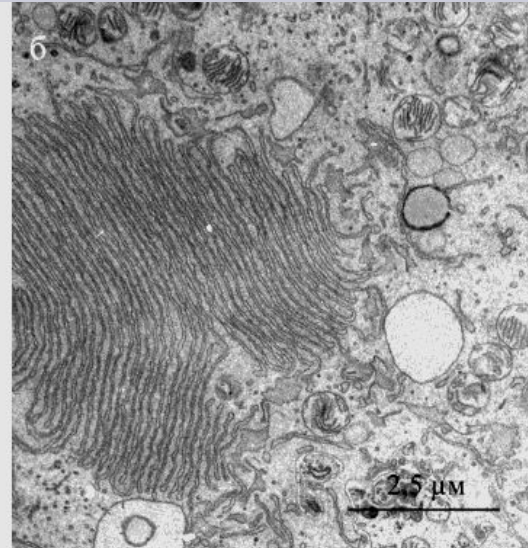
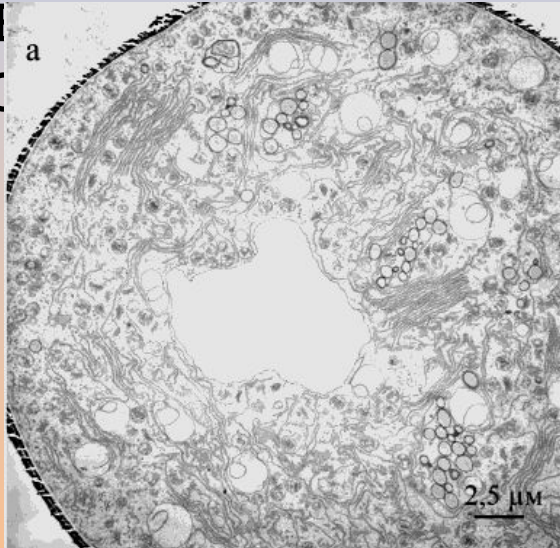


Лекция 3

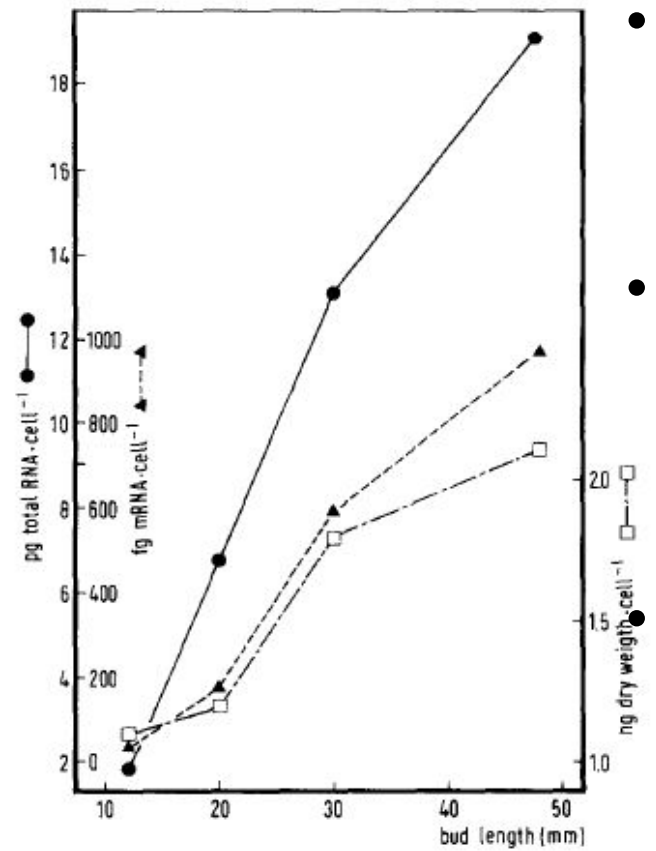
Микрогаметофит. Созревание,
покой и прорастание

Метаболизм мужского гаметофита

- На протяжении развития пыльцевого зерна идет интенсивный рост объема и сухой массы вегетативной клетки, увеличивается число органелл, исчезают вакуоли и накапливаются РНК и белки.
- Мужской гаметофит готовится к выходу из-под защиты спорофита, и в то же время создает ресурсы для прорастания и быстрого роста пыльцевой трубки.
- Перед к физическому приближается к физическому приближается уется.



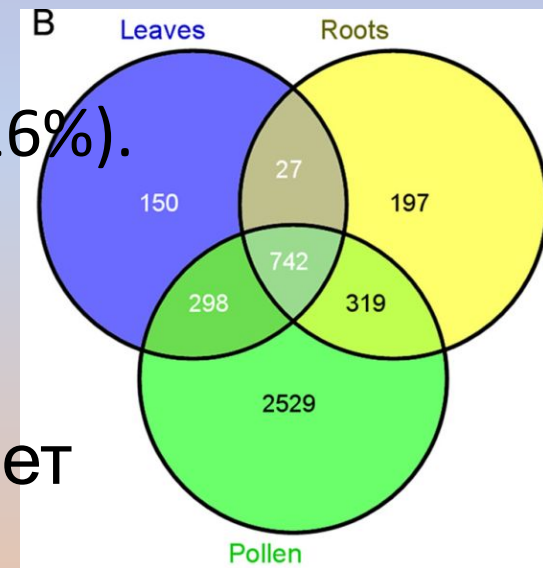
Биосинтетическая активность



- Синтетическая активность вегетативной клетки существенно изменяется на протяжении развития мужского гаметофита.
- Скорость синтеза РНК в премитозной микроспоре табака составляет около 56 фг/ч. В растущем пыльцевом зерне она поднимается до 460 фг/ч – это максимум. Позже скорость снижается. Аналогичным образом проходят через максимум другие показатели биосинтетической активности: доля рибосом, собранных в полисомы, и размеры ядрышка.
- К концу созревания пыльцевого зерна уменьшается интенсивность его дыхания, а внутриклеточный рН сдвигается в кислую сторону.

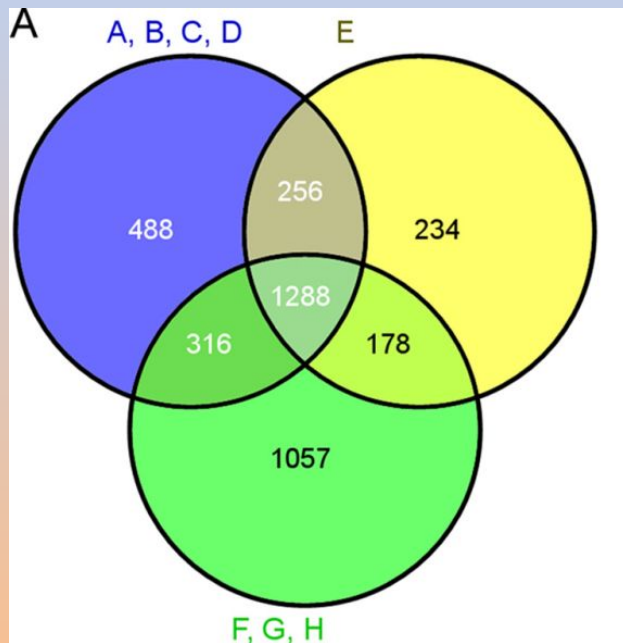
Специфичные и обычные

1. Гены «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), которые экспрессируются также в соматических клетках растений.
 2. Гены, которые встречаются в других клетках, но в ♂ гаметофите экспрессируются более активно (10-26%).
 3. Гены специфичные для микроспор/пыльцы (4 -11%). Для сравнения, в соматических тканях совокупная доля групп 2 и 3 составляет около 3%.
- Относительно высокий уровень экспрессии специфичных и предпочтительных генов отражает



Концепция 3-х стадий (протеом)

- 1 стадия – от микроспороцита до молодой микроспоры
- 2 стадия – поляризованная микроспора
- 3 стадия – пыльцевое зерно и трубка



Stage	Label	<i>n</i> proteins
Microsporocyte	A	1775 (1741)
Meiosis	B	1596 (1573)
Tetrad	C	1748 (1719)
Microspore	D	1288 (1264)
Polarized microspore	E	2004 (1956)
Binuclear pollen	F	1770 (1740)
Dessicated pollen	G	1604 (1580)
Pollen tubes	H	2526 (2485)
Pollen total		3888 (3817)
Leaves		1217
Roots		1285

- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита

→ Дегидратация пыльцевых зерен

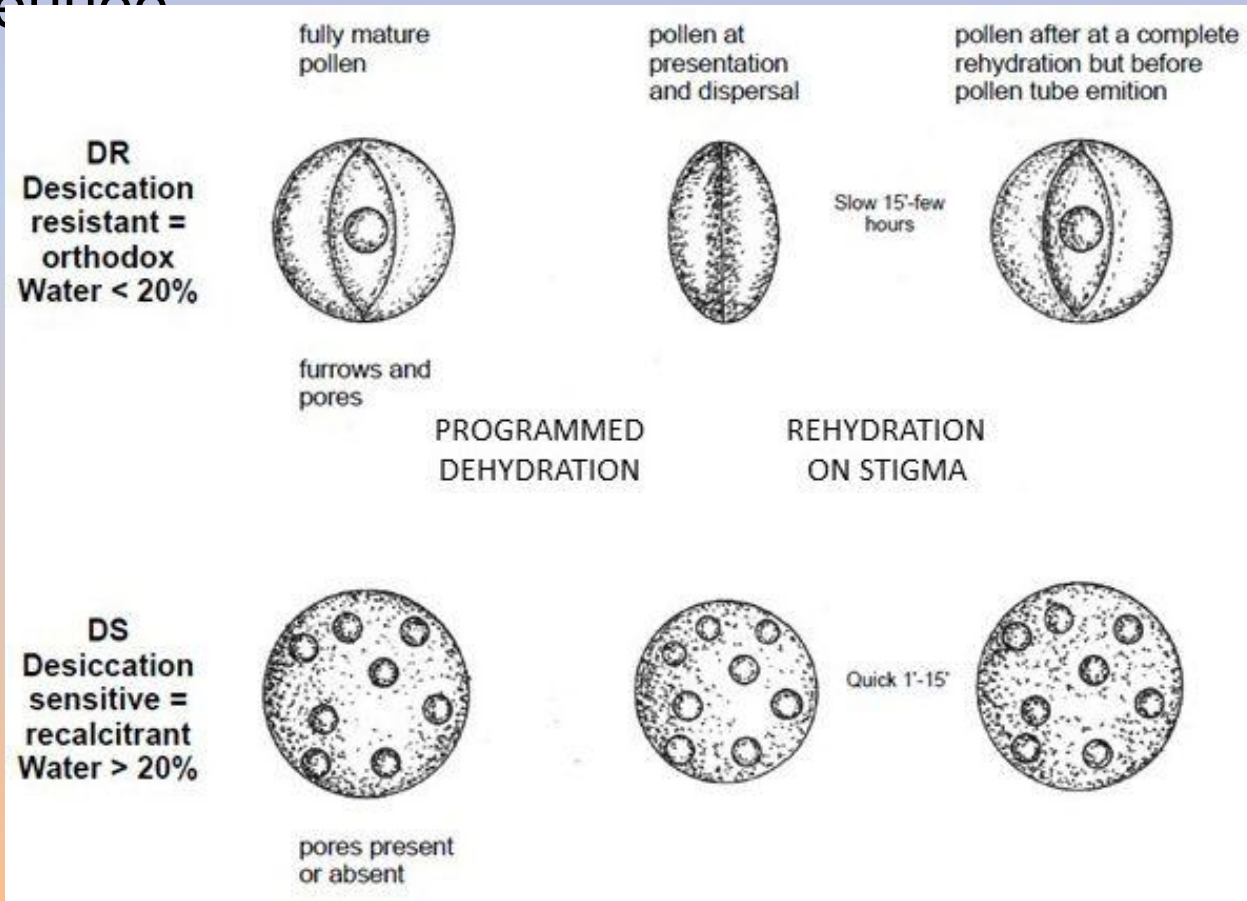
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных
- растений

Изменение оводнённости

- Степень гидратации мужского гаметофита изменяется в ходе его развития.
- 1) Формирование пыльцевого зерна, когда оно погружено в локулярную жидкость, через которую проходят вещества, поставляемые спорофитом.
- 2) Созревание и дегидратация пыльцевого зерна в пыльнике до его раскрытия. Локулярная жидкость в это время реабсорбируется и/или испаряется.
- 3) Фаза презентации, когда пыльца высыпается из раскрывшегося пыльника.
- 4) Распространение пыльцы посредством различных агентов – ветра, животных (насекомых, зверьков и птиц). Эта фаза может длиться, в зависимости от вида растения, от нескольких секунд до нескольких дней.
- 5) Взаимодействие пыльцы и рыльца. Попав на рыльце, при благоприятных условиях пыльцевые зерна регидратируются и начинают прорастать.

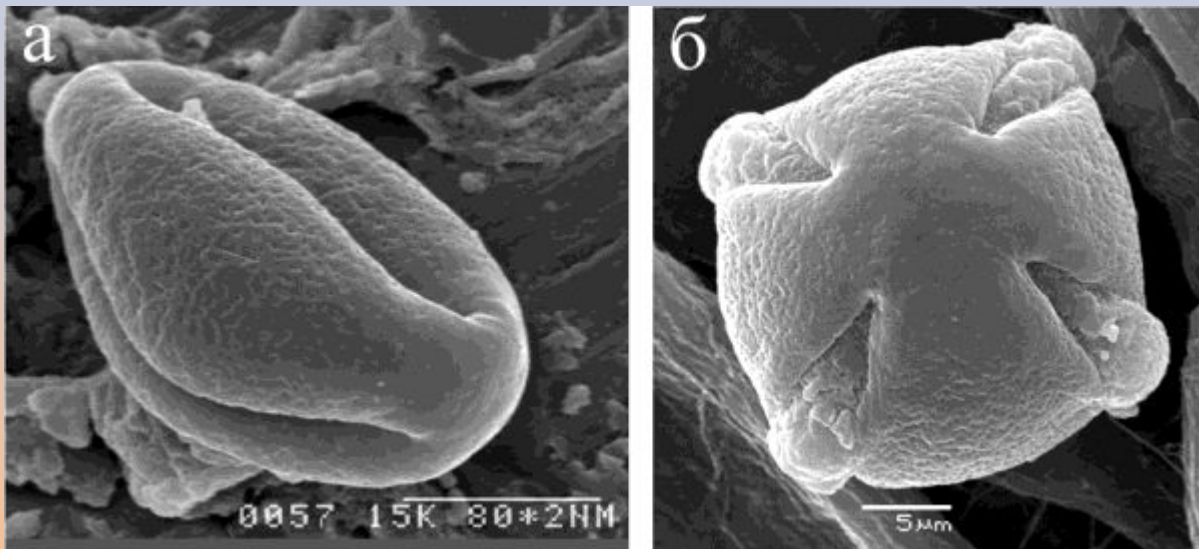
Дегидратация

- Пыльцевые зёрна подразделяют на частично дегидратированные (<20-30%) и частично гидратированную (>20-30%). Первая сохраняется дольше, прорастает медленнее



Дессиком

- Это набор генов, белков и метаболитов, обеспечивающих устойчивость клеток к дегидратации
- Включает регуляторные механизмы и сигнальные пути, контролирующие индукцию защитных механизмов



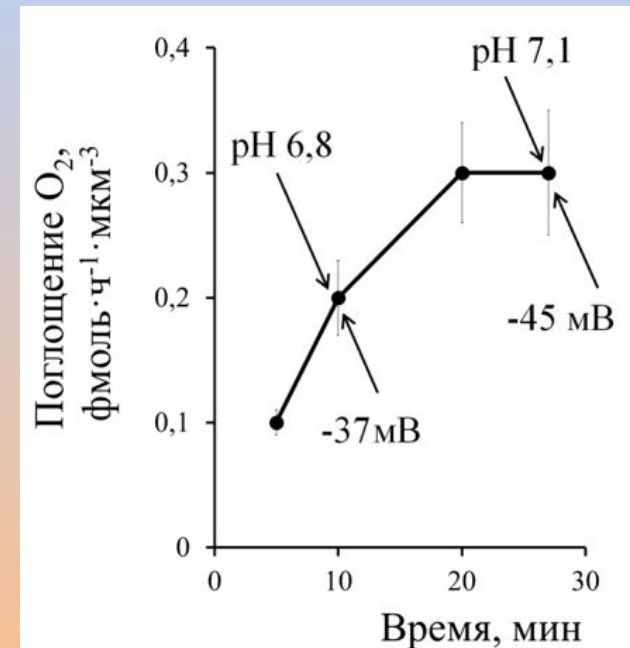
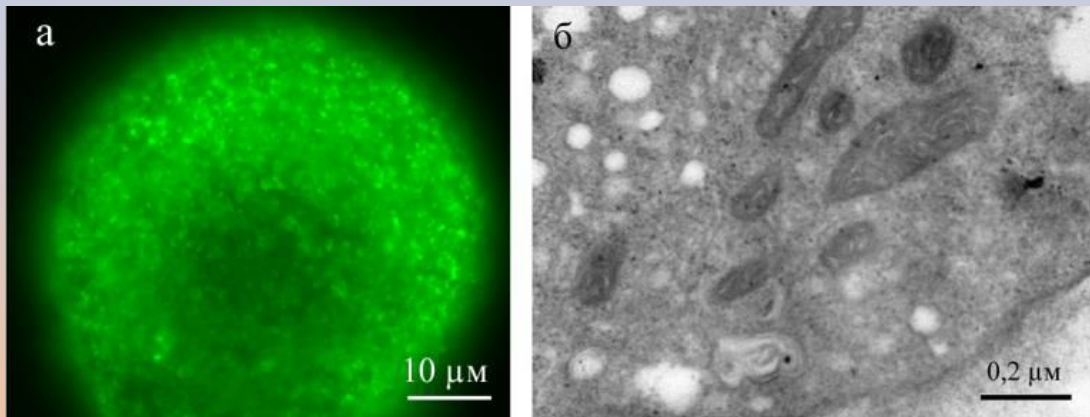
Гены, входящие в десикком

- Стабилизация мембран и белков с помощью невосстанавливающих сахаров, белков теплового шока и LEA-белков, которые могут действовать как шапероны или «молекулярные щиты», препятствуя агрегации клеточных белков.
- Защита от окислительного стресса с помощью антиоксидантов.
- Защита клеточных структур: стенки, эндомембран, цитоскелета и др.

- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
- Дегидратация пыльцевых зерен
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных
- растений

Активация пыльцевого зерна

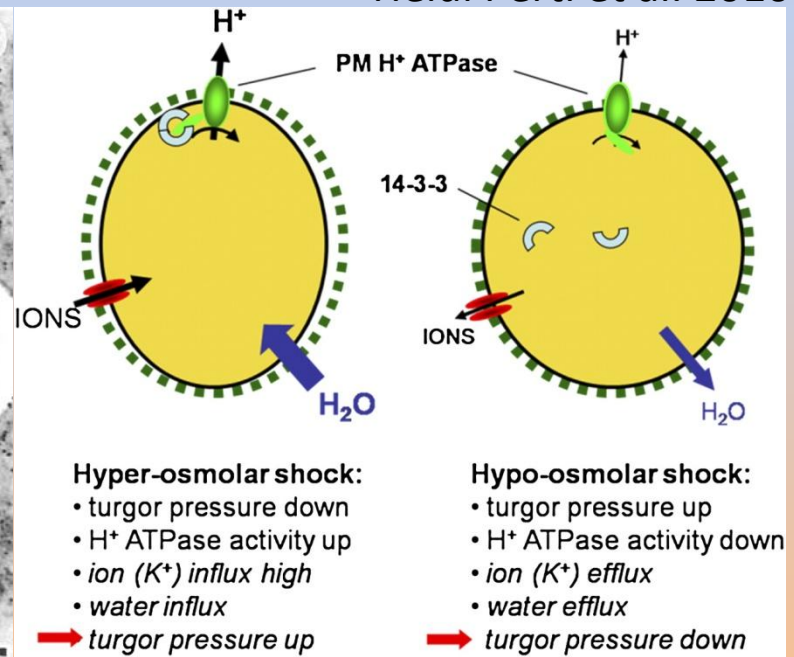
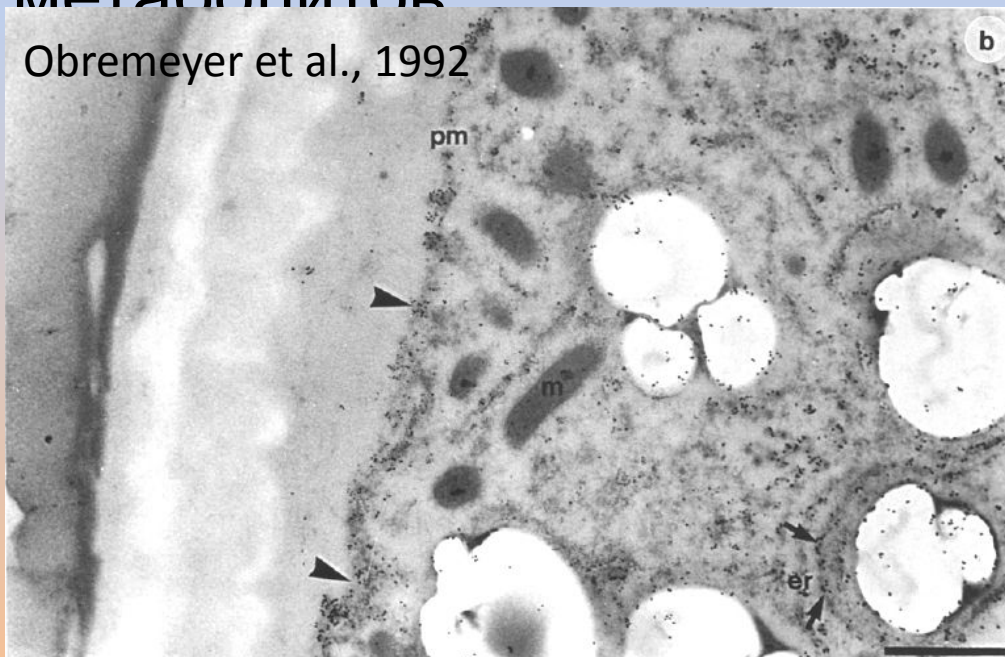
- Активация дыхания (скорость процесса зависит от состояния митохондрий)
- Сдвиг pH в щелочную сторону
- Гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки



H⁺-АТФаза плазмалеммы

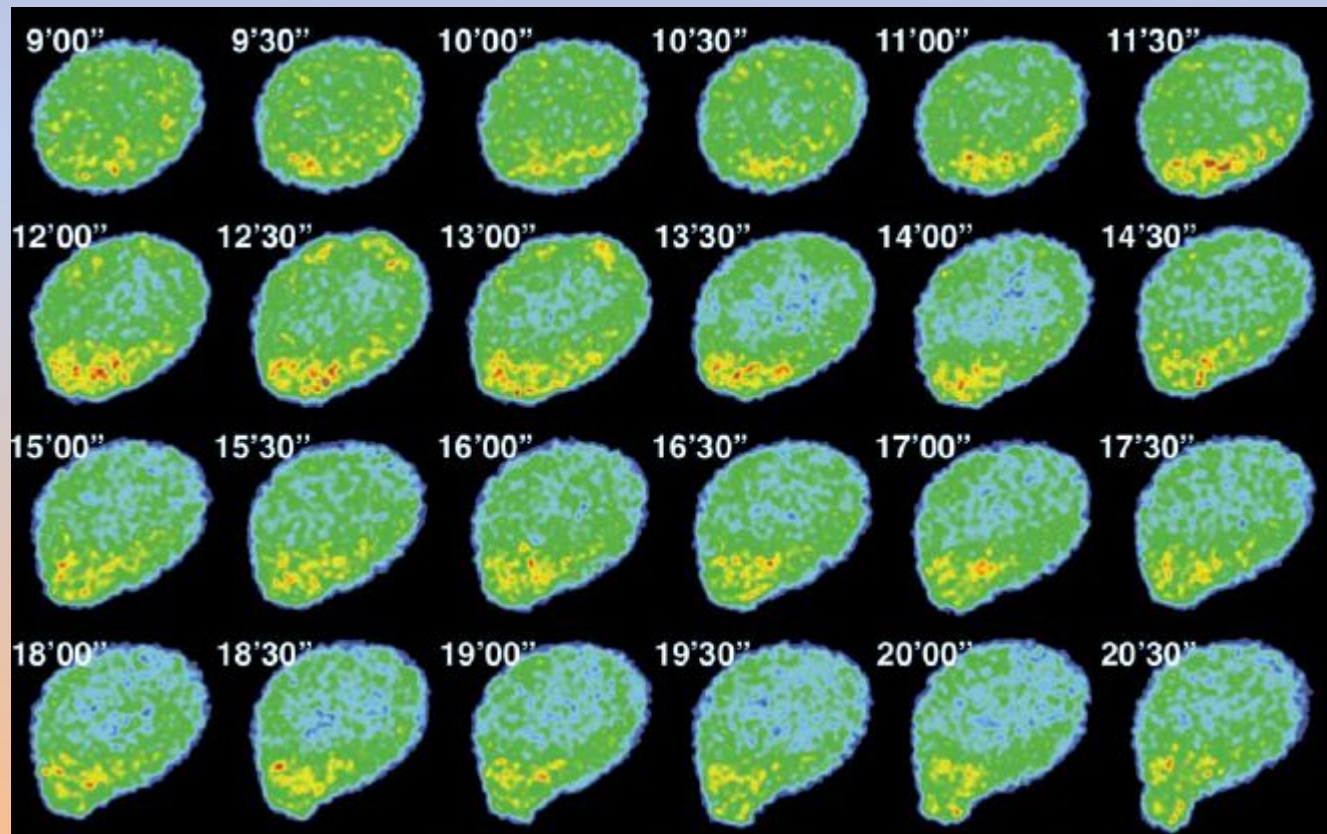
- Этот фермент – один из важнейших в растительной клетке. Выкачивая протоны, он влияет на величину внутриклеточного рН, генерирует протонный электрохимический градиент и формирует мембранный потенциал, обеспечивая тем самым трансмембранное перемещение ионов и метаболитов

Heidi Pertl et al. 2010



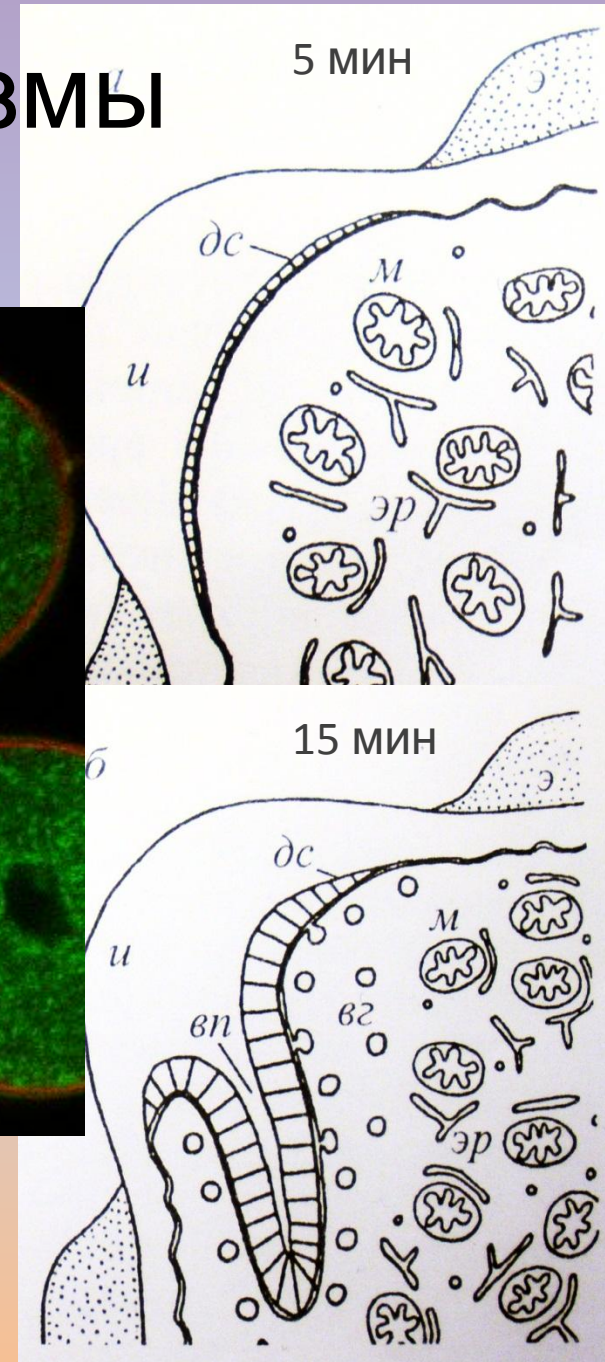
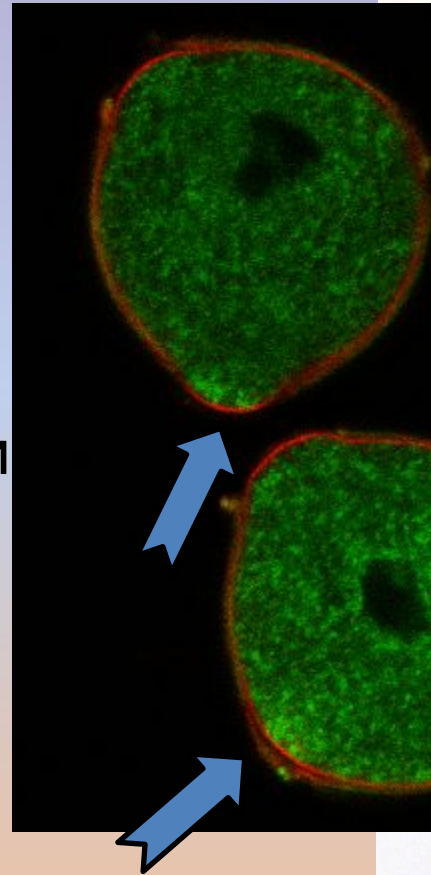
Всему голова – Ca^{2+}

- Концентрация кальция возрастает в месте выхода пыльцевой трубки
- Ингибиторы подавляют прорастание.

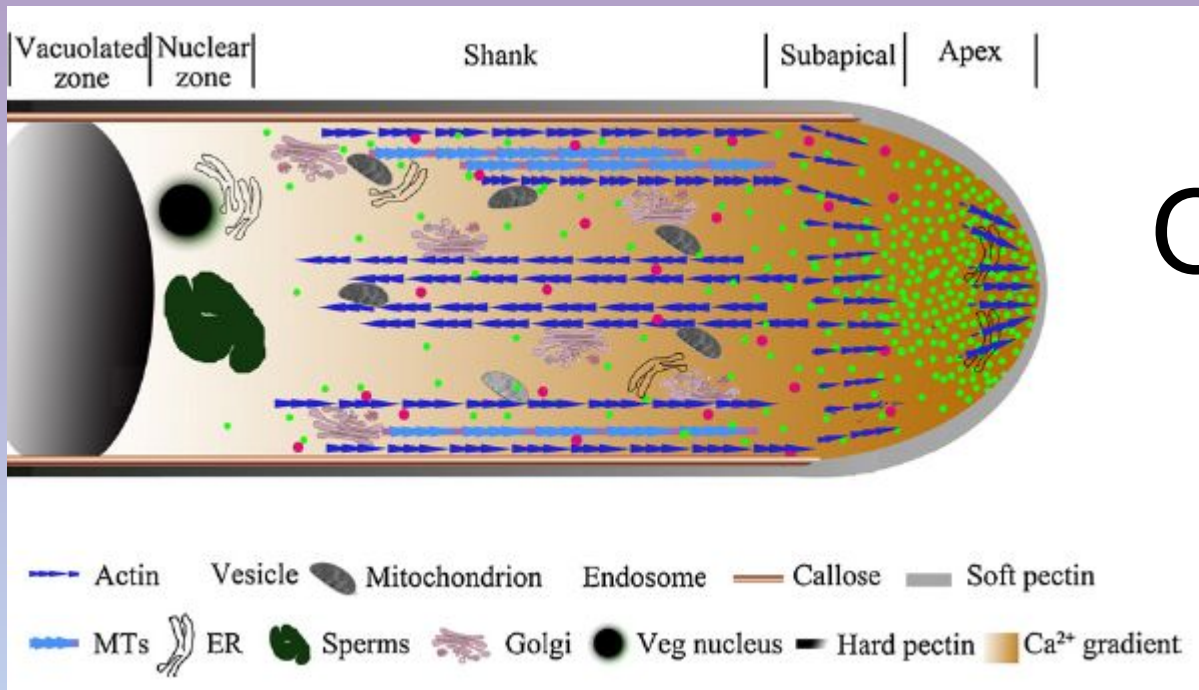


Реорганизация цитоплазмы

- Вблизи апертуры, через которую выйдет пыльцевая трубка, собираются везикулы Гольджи, митохондрии и короткие цистерны ЭПР, подготавливая строительство новой стенки
- Рибосомы собираются в полисомы, стопки ЭПР распадаются на отдельные цистерны, увеличивается активность аппарата Гольджи.
- К моменту прорастания пыльцевое зерно имеет



- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
- Дегидратация пыльцевых зерен
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных растений



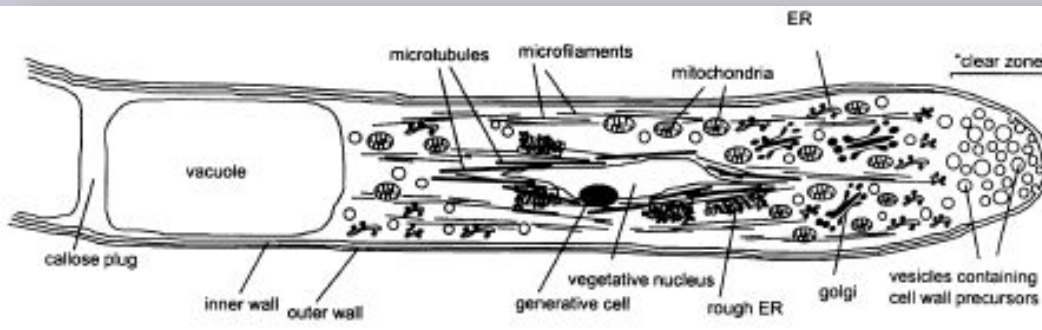
Основные игроки

- Везикулярный транспорт и движение органелл по цитоскелету: доставка стройматериалов и энергообеспечение
- Клеточная стенка – механическая составляющая
- Ионные градиенты и мембранный потенциал
- ГТФазы и другие компоненты сигнальных каскадов (активно изучаются)
- АФК (малоизучено)

Полярность структуры

Апикальный рост пыльцевой трубки поддерживается за счет полярной организации цитоплазмы и циклоза.

Пыльцевая трубка разделена на функциональные



Функции циклоза

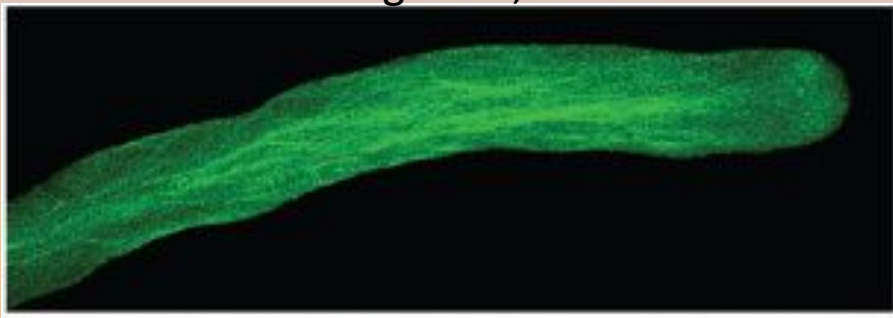
1. Транспорт мужского гаметного модуля (MGU).
2. Транспорт в апекс сигнальных молекул и ферментов для взаимодействия с пестиком.
3. Строительные материалы, включая фосфолипиды, полисахариды, стеночные ферменты.
4. В апексе везикулы доставляются в определенные зоны поверхности, где происходит их экзоцитоз.
5. Эндоцитоз обеспечивает приток в трубку из пестика питательных веществ и сигнальных молекул, поддерживает «уникальность апекса» и правильное соотношение между материалами для строительства стенки и плазмалеммы.



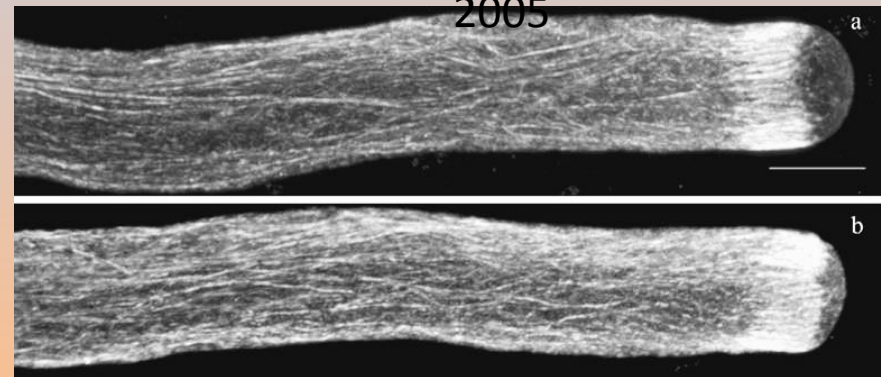
Микрофиламенты

- Актиновый цитоскелет играет ключевую роль в поддержании полярного роста
- Продольные актиновые тяжи обеспечивают ток цитоплазмы и органелл (циклоз)
- Микрофиламенты взаимодействуют с микротрубочками в процессе доставки мужского гаметного модуля
- Кольцевая структура в субапикальной зоне обеспечивает обособление растущего компартмента

Cheung et al., 2008

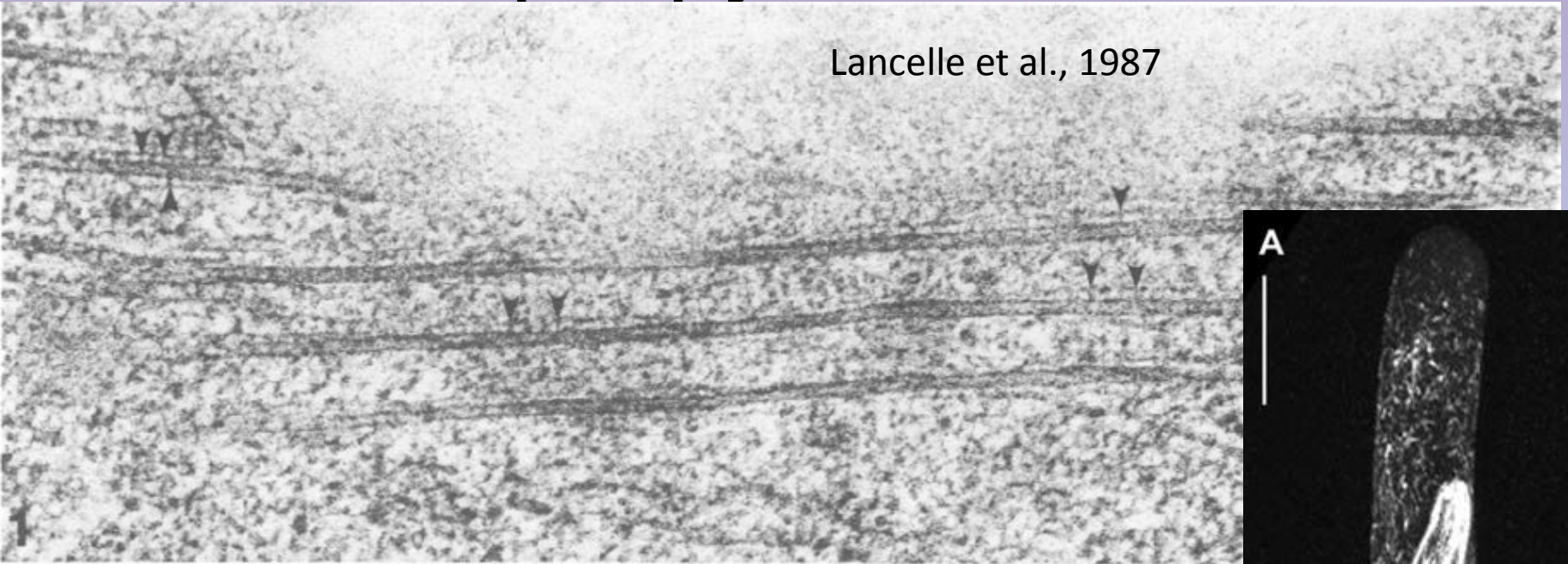


Lovy-Wheeler et al.,
2005

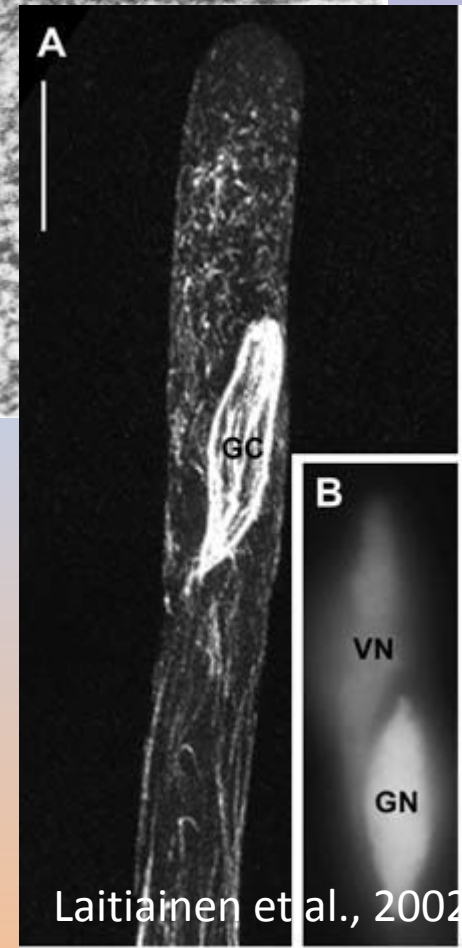


Микротрубочки

Lancelle et al., 1987

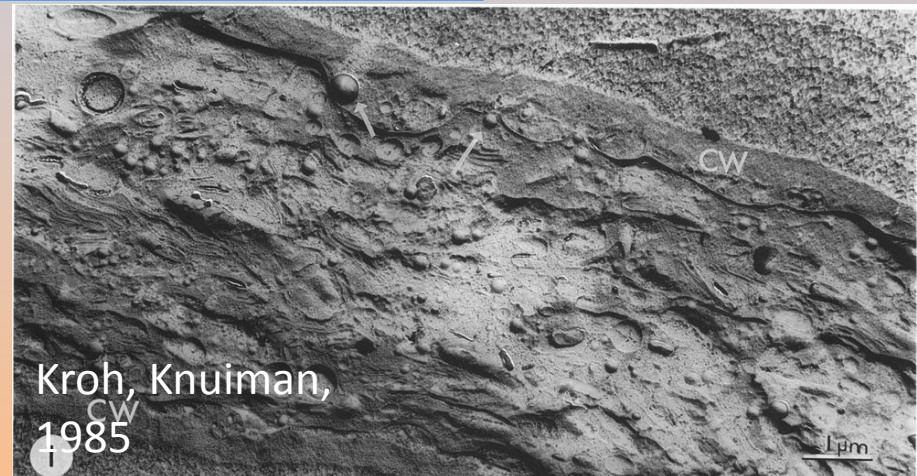
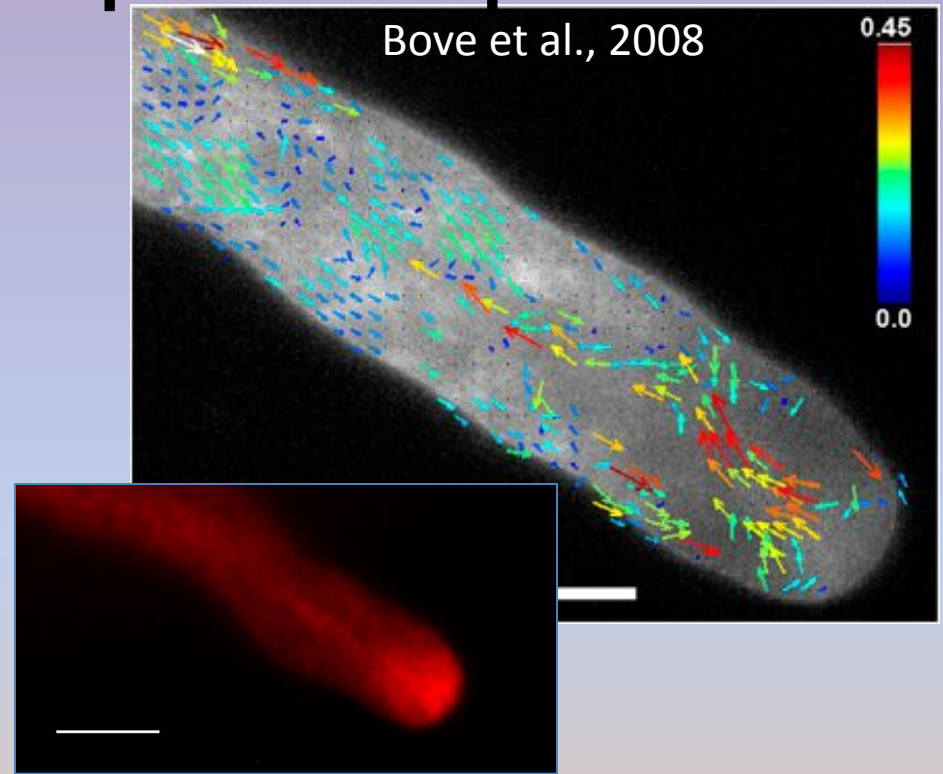


- Играют ключевую роль в доставке мужского гаметного модуля
- У цветковых не участвуют в циклозе
- У голосеменных участвуют в циклозе
- Часто располагается вместе с микрофиламентами, а также образует комплексы с ПМ и ЭПР



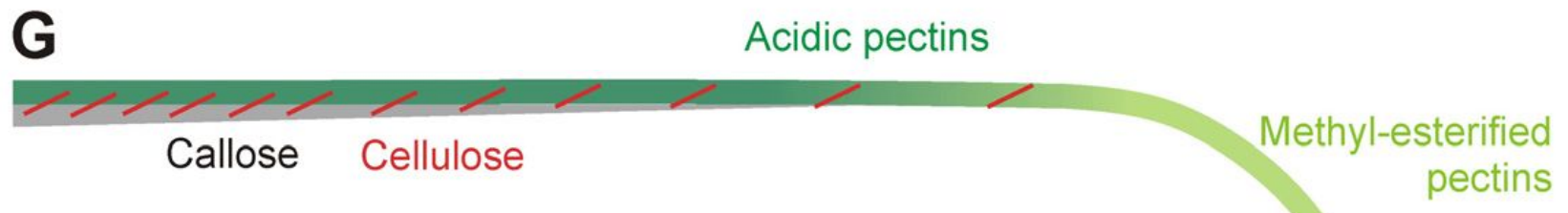
Везикулярный транспорт

- Везикулы аппарата Гольджи, содержащие материал для строительства апикальной мембраны и стенки, путешествуют в апекс по актиновым филаментам.
- В субапикальной зоне происходит рециклирование мембран (необходимо для поддержания полярности – «уникальность апекса»).
- В кончике трубки

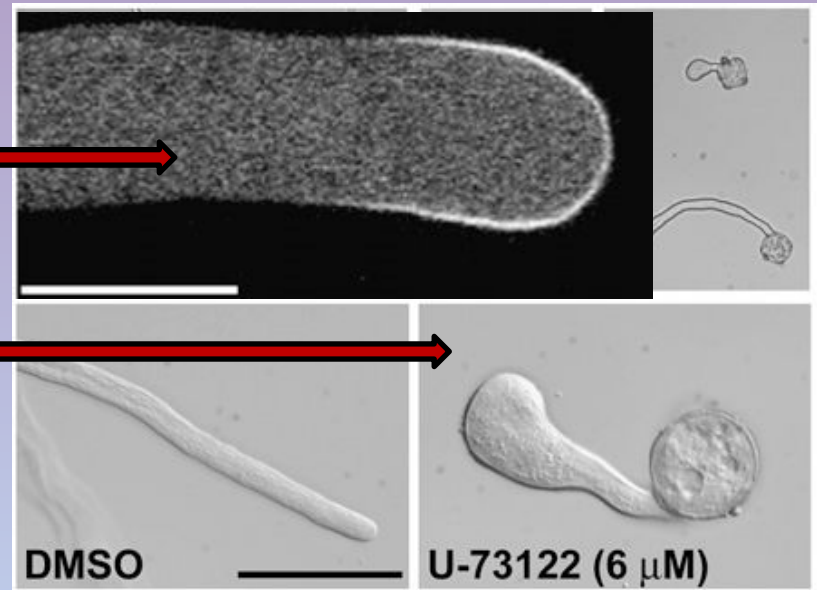


Клеточная стенка: градиент жёсткости

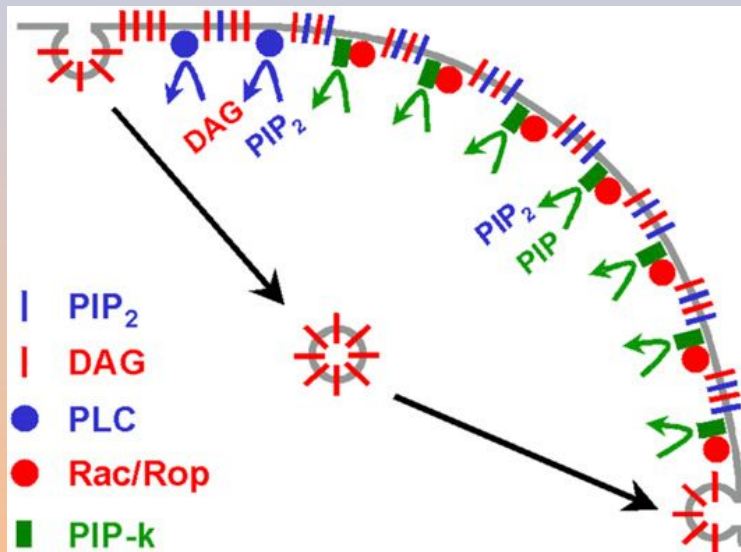
- Движущей силой для роста является тургорное давление. Однако, оно не является направленной силой, а одинаково в каждой точке. За счет чего же рост становится направленным?
- Механический градиент жесткости обеспечивают компоненты клеточной стенки, в первую очередь, пектины (разной степени сшитости), целлюлоза и каллоза.



- Фосфатидилинозитолдифосфат (PIP₂) есть только в апикальной мембране растущих ПТ
- Его узкая локализация обеспечивается белком phosphatidylinositol transfer protein (PITP) и фосфолипазой C (PLC), которая режет PIP₂ с образованием инозитол-3-фосфата (IP₃) и диацилглицерола (DAG)
- Этот процесс необходим для поддержания ионных градиентов и полярной структуры актиновых тяжей (через регуляцию актин-связывающих белков).

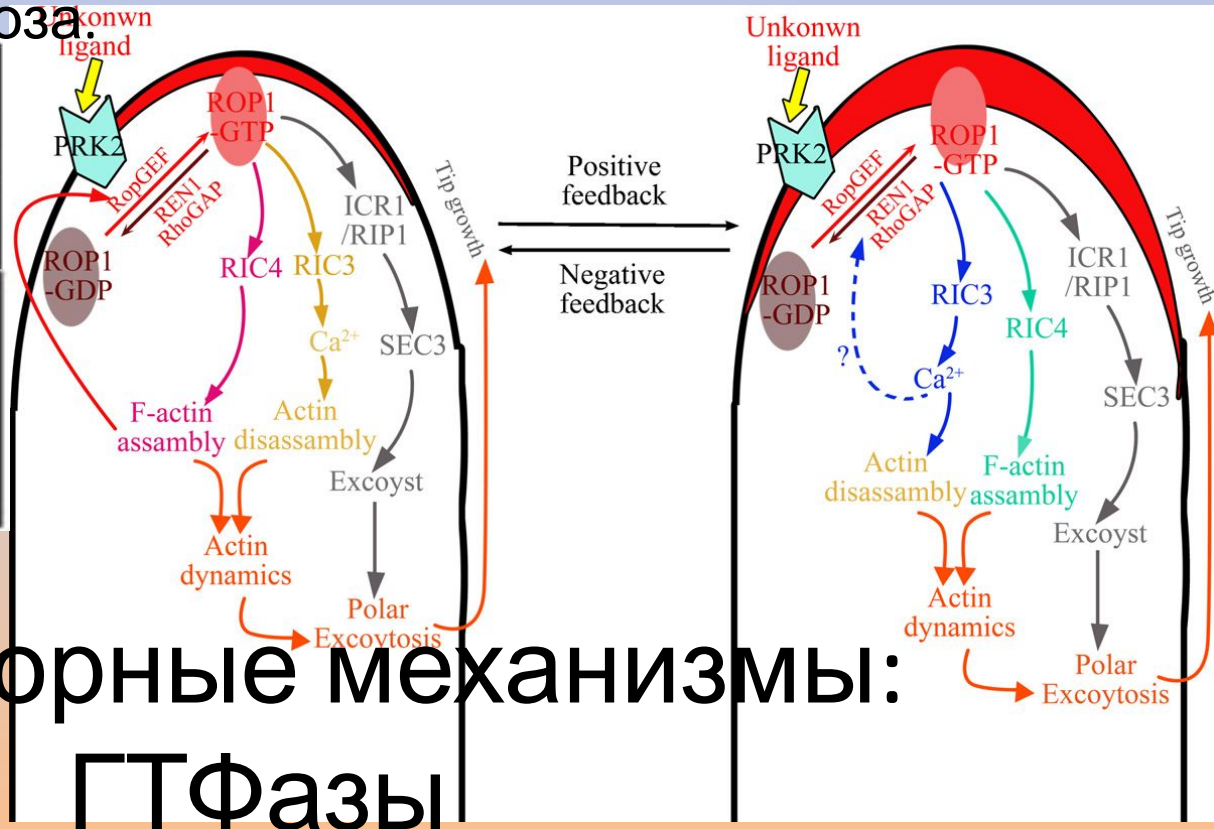
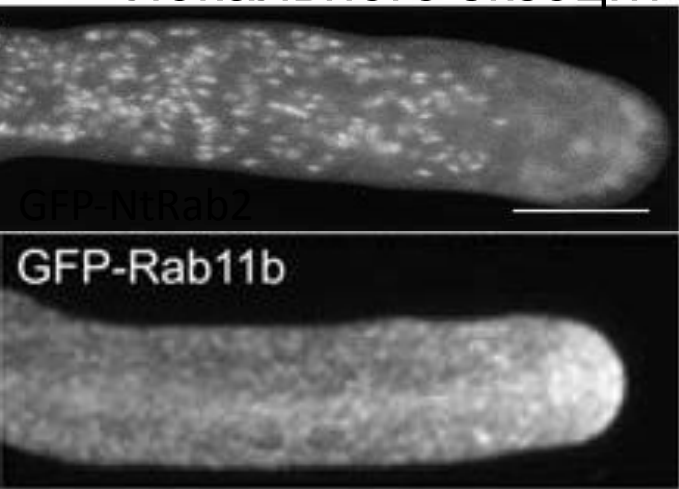


Helling et al., 2006



Регуляторные механизмы: фосфолипиды

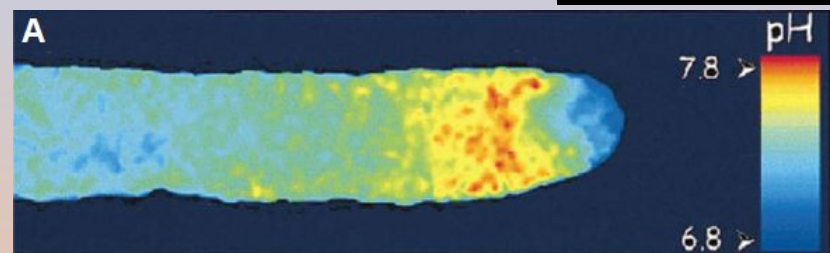
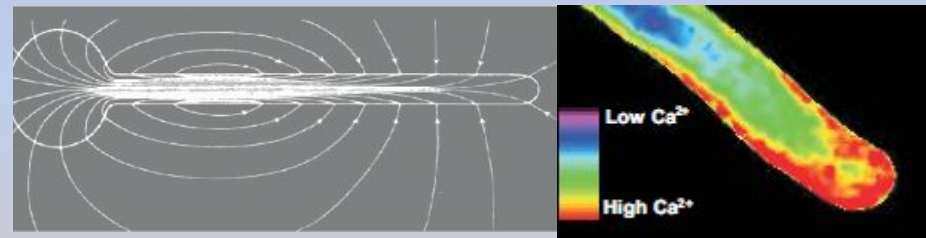
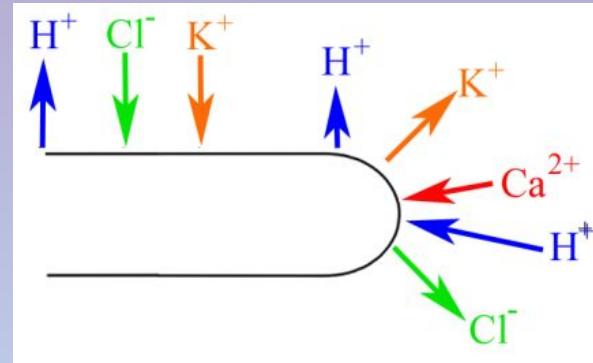
- Маленькие ГТФ-связывающие белки - универсальные переключатели сигнальных путей.
- Rab2 осуществляет контроль секреторного пути между ЭПР и аппаратом Гольджи в растущей пыльцевой трубке (Cheung et al., 2002), локализован в аппарате Гольджи.
- Rab11b локализован в везикулах и отвечает за терминальный участок секреторного пути: слияние везикул с плазмалеммой (de Graaf et al., 2005)
- ROP1 локализован в апикальной ПМ и важен для поддержания локального экзоцитоза.



Регуляторные механизмы:
ГТФазы

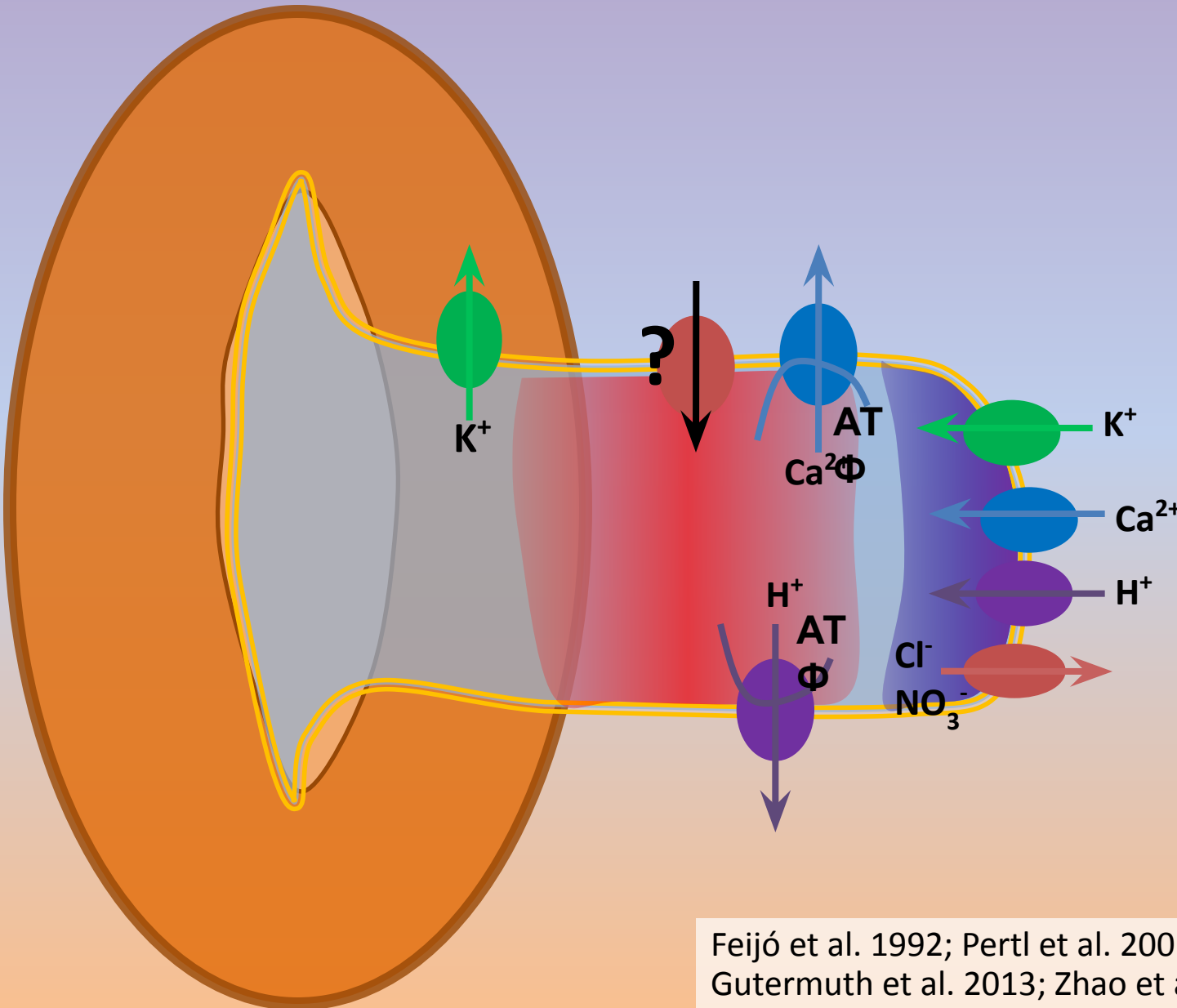
Ионная регуляция

- Таким образом, пыльцевая трубка – прекрасная модель для изучения ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА, которая включает в себя
- Работу ионных каналов и помп
- Их дифференциальную регуляцию
- Градиенты концентрации ионов в цитоплазме
- Электрическое поле и мембранный потенциал



Michard E. et al. 2009. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 1609-1622; Gutermuth T. et al., 2013. *Plant Cell.* 25: 4525.

Основные закономерности прорастания и роста пыльцевого зерна: ионный статус



Ряд известных белков, обеспечивающих транспорт ионов:

ACA9

SPIK, TPC1

CNGC7, CNGC8, CNGC9, CNGC10, CNGC16, CNGC18, GLR1.2, GLR1.3, GLR2.1, GLR3.3, GLR3.7, GLR1

SLAH3, SLAC1, ALMT12, CLCC, CLCD

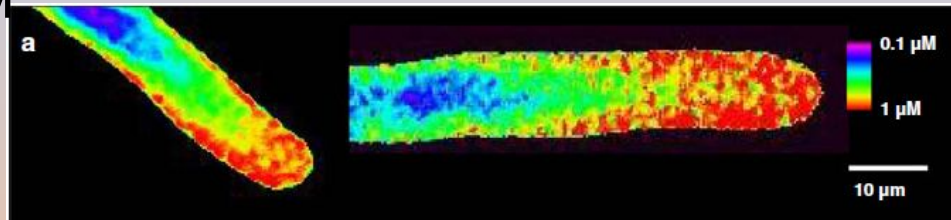
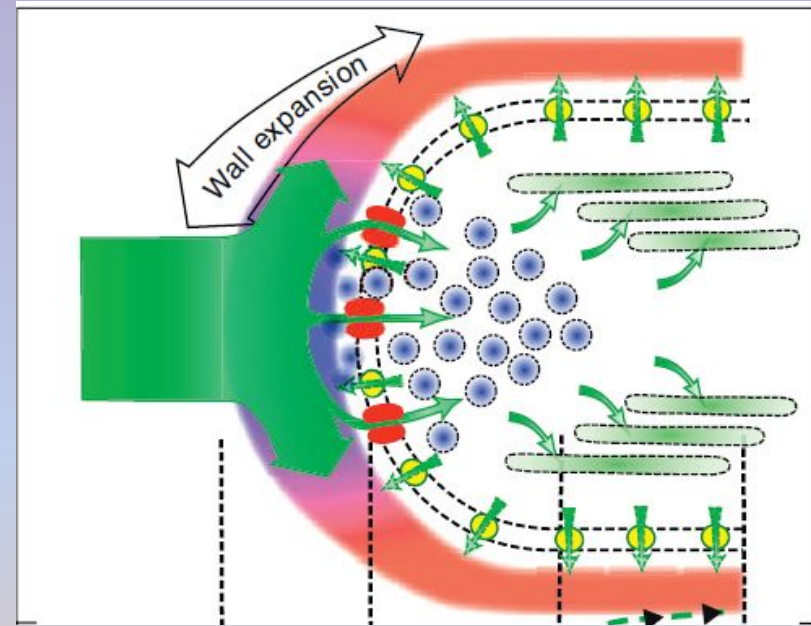
Feijó et al. 1992; Pertl et al. 2001; Hepler et al. 2006; Gutermuth et al. 2013; Zhao et al. 2013

Регуляторные механизмы:

кальций

- Кальций входит в кончике трубки через каналы, а в субапикальной области входит в органеллы и выкачивается наружу.
- Таким образом, поддерживается крутой градиент его концентрации в апикальной зоне
- Кальциевый градиент определяет место слияния везикул с ПМ и, таким образом, задает направление роста
- Кальций регулирует динамику актиновых филаментов через Ca-чувствительные актин-связывающие белки (ABPs),
- Кальций модулирует активность Ca-зависимых протеин-киназ (CDPKs)

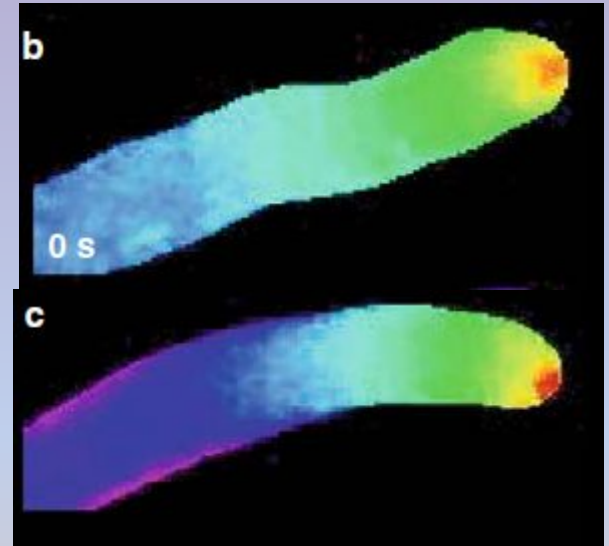
Hepler, 2012



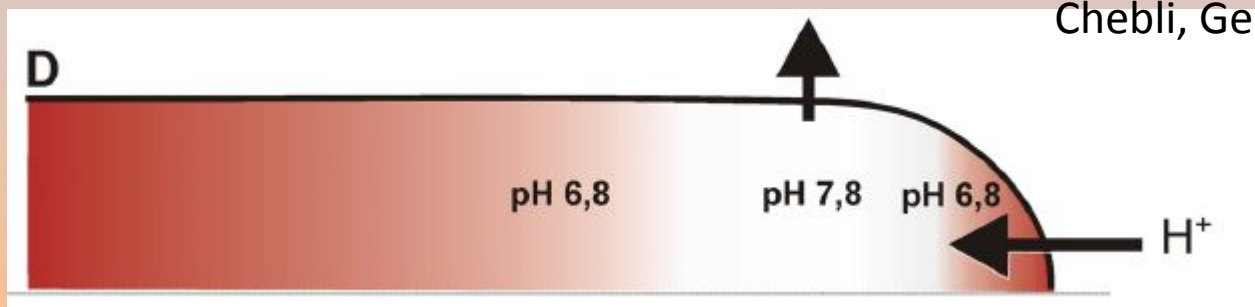
Michard et al., 2008

Протонный градиент

- В кончике рН кислый, протоны входят в цитоплазму, предположительно, через неспецифичные катионные каналы. Кислый кончик присутствует только в растущих трубках.
- В субапикальной зоне обнаружен «щелочной пояс», именно в этой зоне работают H^+ -АТФазы, выкачивающие протоны. Присутствует даже в нерастущих трубках.

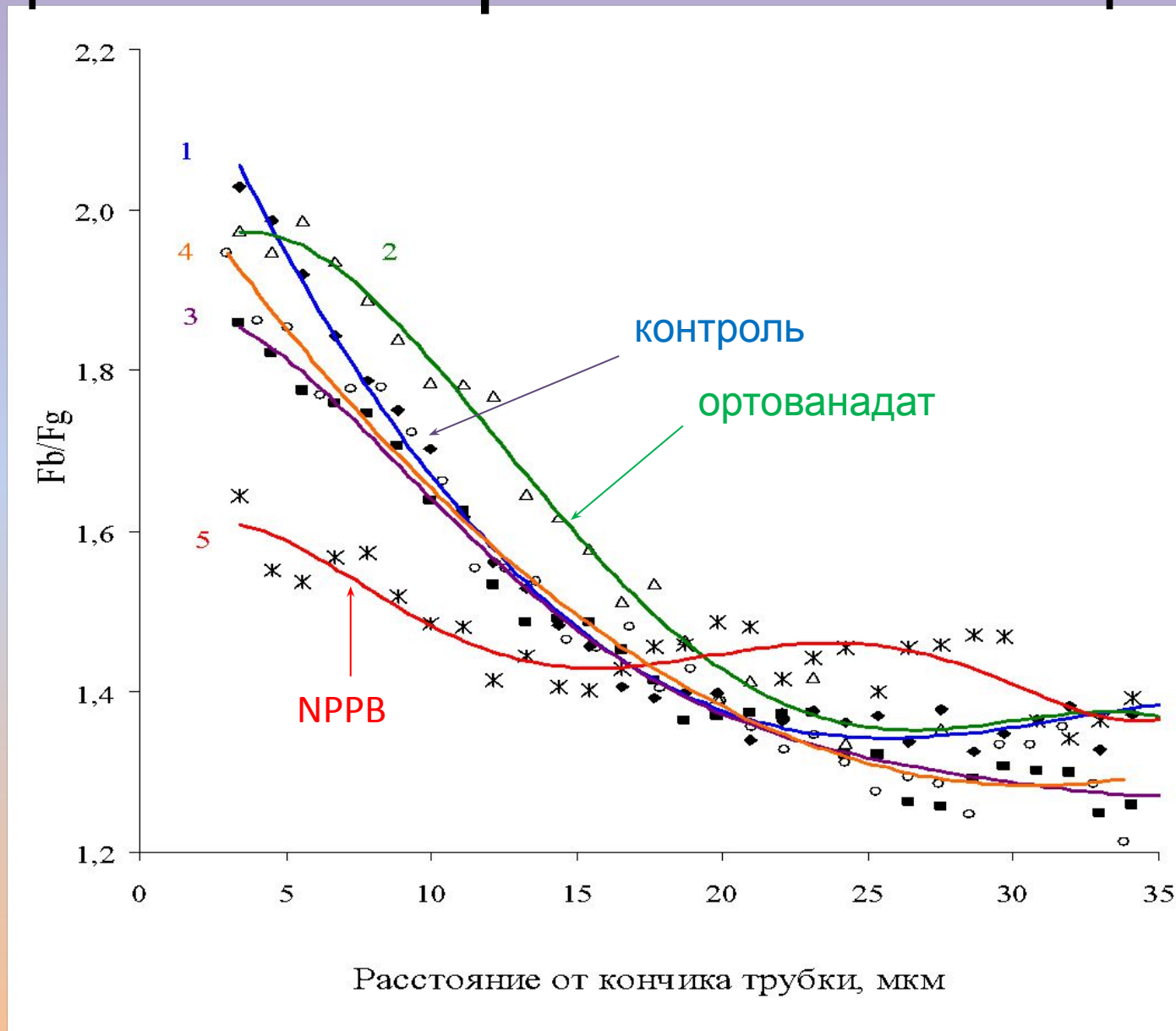


Michard et al., 2008



Chebli, Geitmann, 2007

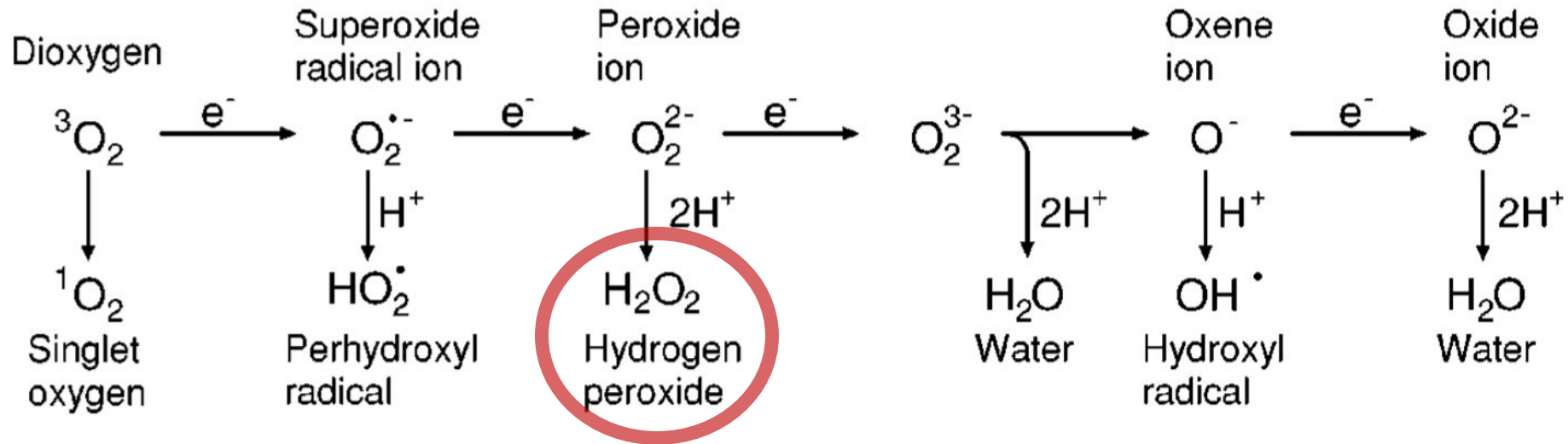
Градиент мембранного потенциала



ДФК  ионный транспорт ?

- ДФК в прогамной фазе оплодотворения, по-видимому, могут передавать сигнал и регулировать рост. Но как?
- В соматических клетках ключевыми мишенями для ДФК являются ионные каналы: Ca^{2+} и K^+ .

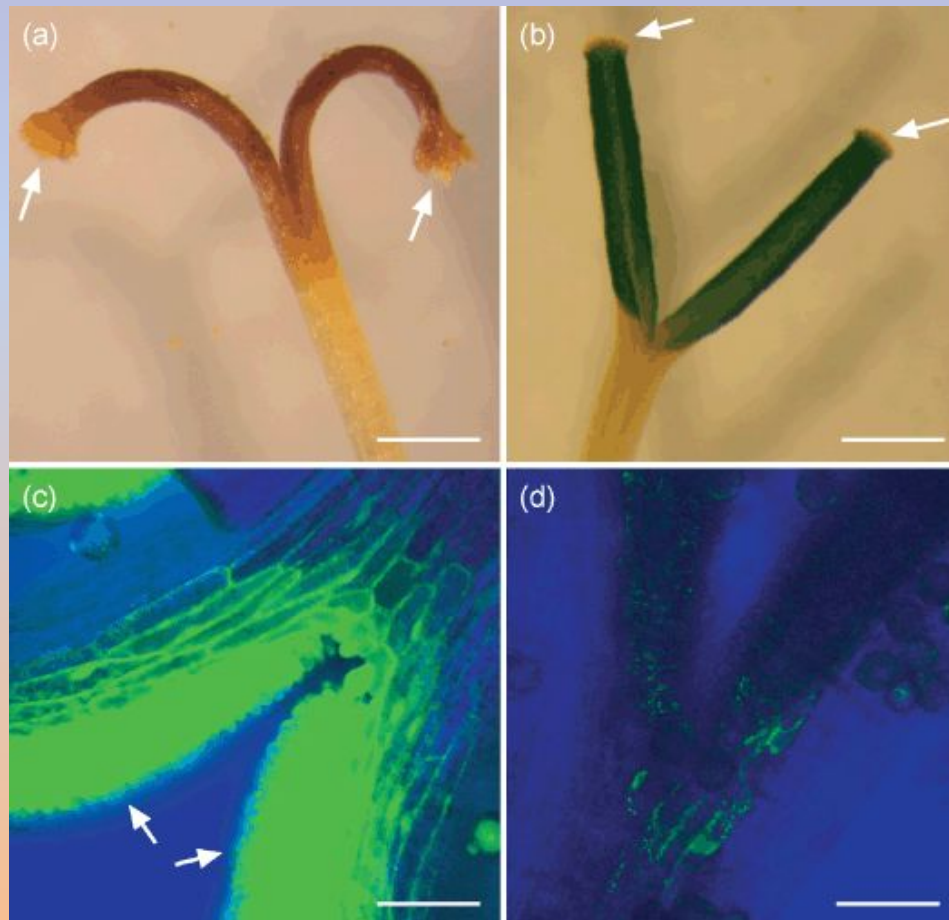
Активные формы кислорода (АФК)



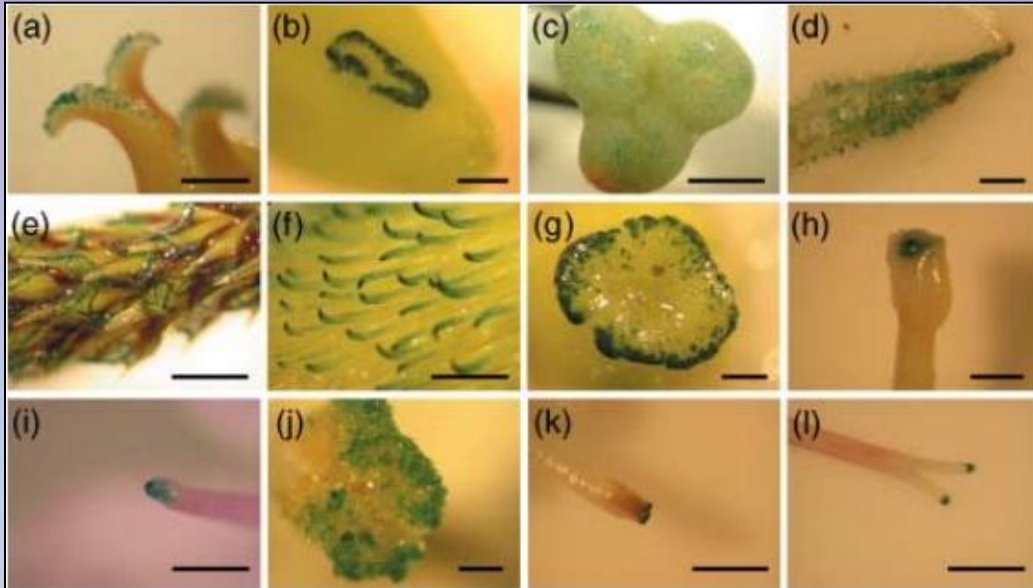
Активные формы кислорода (АФК) - высокореакционные, метастабильными агенты (молекулы, ионы, радикалы), обладающие избыточной энергией по отношению к молекулярному триплетному кислороду ($^3\text{O}_2$).

АФК и пероксидазы на рыльце

- Пероксидазы и АФК накапливаются при подготовке к опылению.



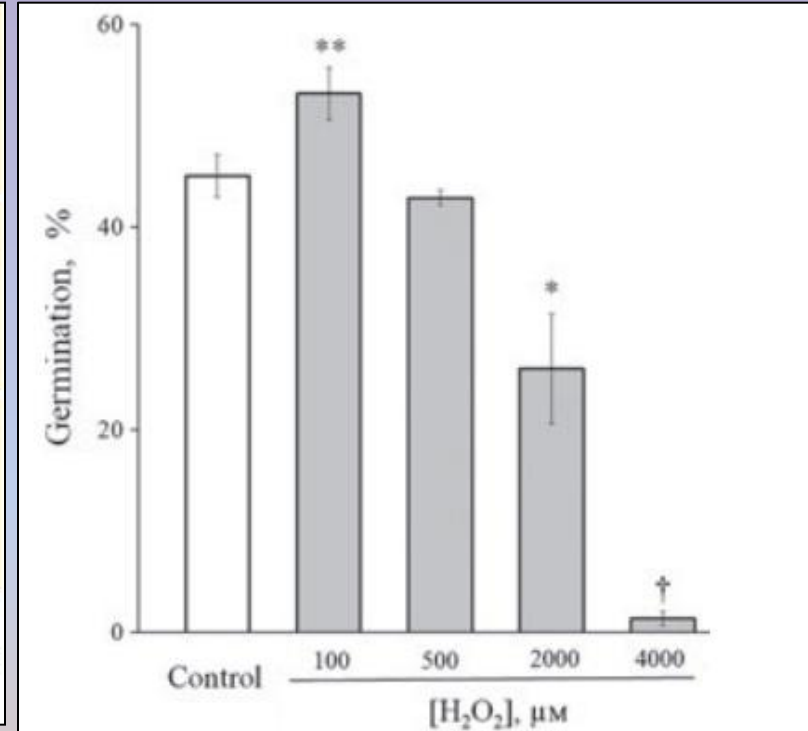
H_2O_2 – один из регуляторов прогамной фазы оплодотворения



New Phytologist (2006) **172**: 221–228

Stephanie M. McInnis¹, Radhika Desikan², John T. Hancock² and Simon J. Hiscock¹

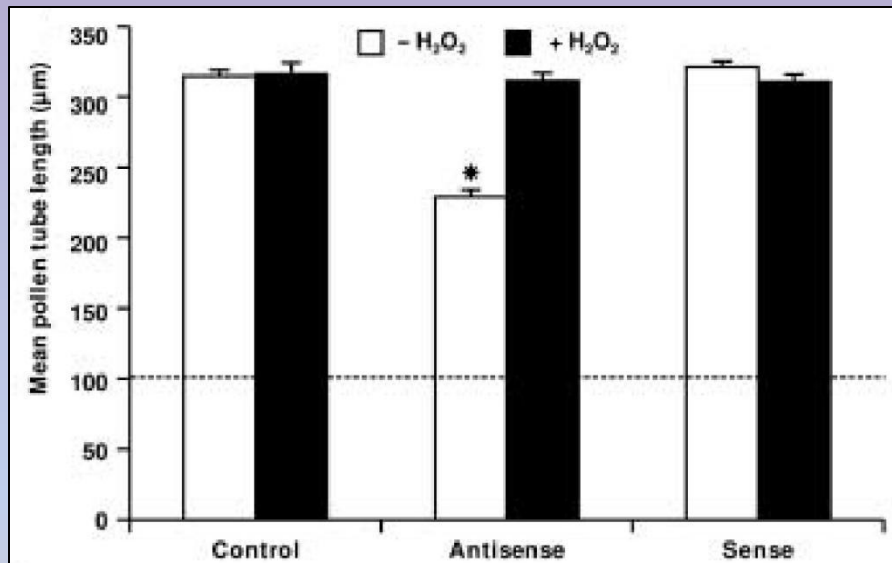
АФК, в основном H_2O_2 , накапливается в тканях рыльца при подготовке к опылению. Предполагается, что АФК могут играть роль межклеточного сигнала и регулировать прорастание пыльцевого зерна и рост пыльцевой трубки *in vivo*



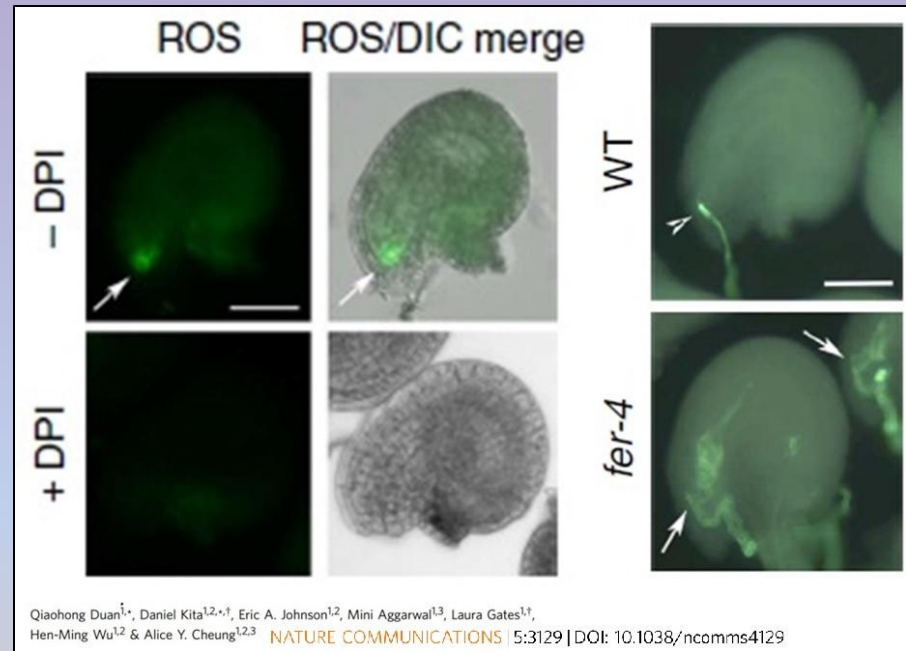
A. V. Smirnova, N. P. Matveyeva & I. P. Yermakov
Plant Biology **16** (2014) 252–257

H_2O_2 в низких концентрациях (100 μM) стимулирует прорастание пыльцевого зерна *in vitro*

H_2O_2 – один из регуляторов прогамной фазы оплодотворения



Martin Potocký^{1,*}, Mark A. Jones^{2,*}, Radek Bezdova³, Nicholas Smirnov² and Viktor Žárský^{1,3}
New Phytologist (2007) 174: 742–751



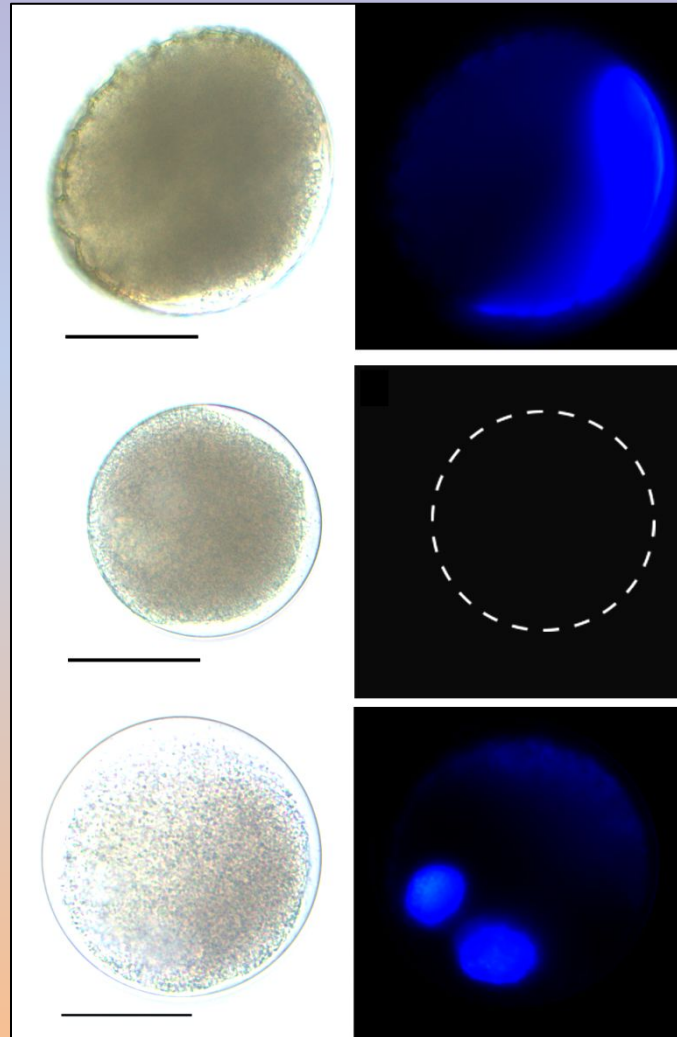
Эндогенным источником АФК в пыльцевой трубке является НАДФН-оксидаза. При подавлении экспрессии НАДФН-оксидазы с помощью антисенс олигодНК происходит ингибирование роста, при этом обработка H_2O_2 (500 μM) восстанавливает скорость роста до контрольного уровня

Регуляторная роль АФК на заключительном этапе прогамной фазы оплодотворения. Локальный максимум АФК вблизи синергид инициирует разрыв пыльцевой трубки и высвобождение спермиев в зародышевом мешке. У мутанта *fer-4*, локальный максимум отсутствует и пыльцевая трубка растет внутри

Цитологическая характеристика протопластов из пыльцевых зерен



Процесс выделения протопластов из пыльцевых зёрен лилии (*Lilium longiflorum* Thumb.)



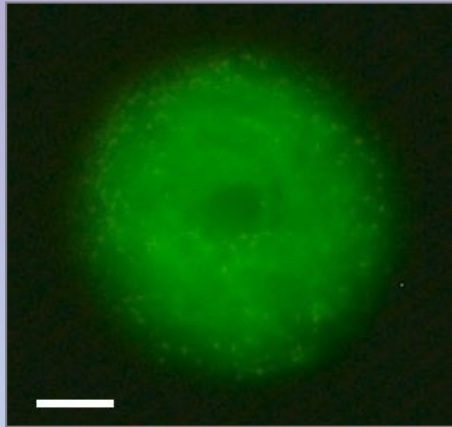
Окрашивание пыльцевого зерна лилии Tinopal (связывается с целлюлозой).

Протопласт не окрашивается Tinopal, клеточная стенка полностью отсутствует.

Окрашивание ядер с использованием DAPI.

H_2O_2 -индуцированный вход Ca^{2+} через нифедипин-чувствительные каналы

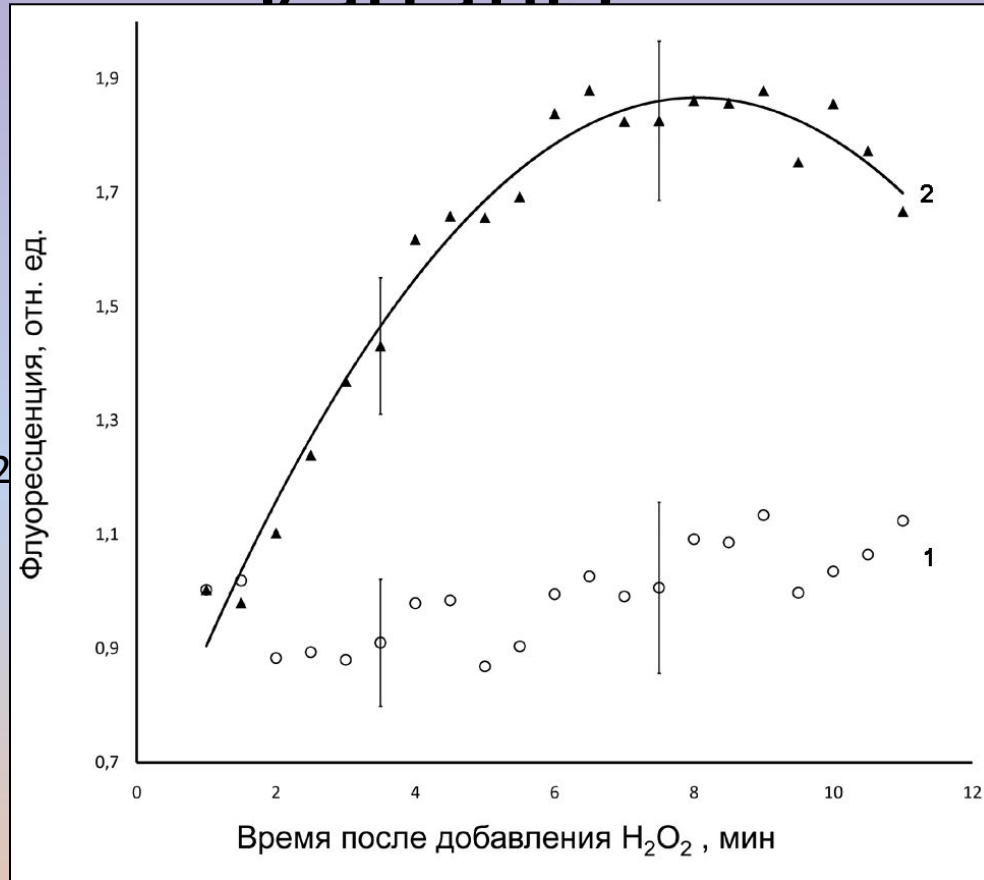
каналы



Окрашивание Ca^{2+} зондом Fluo-3

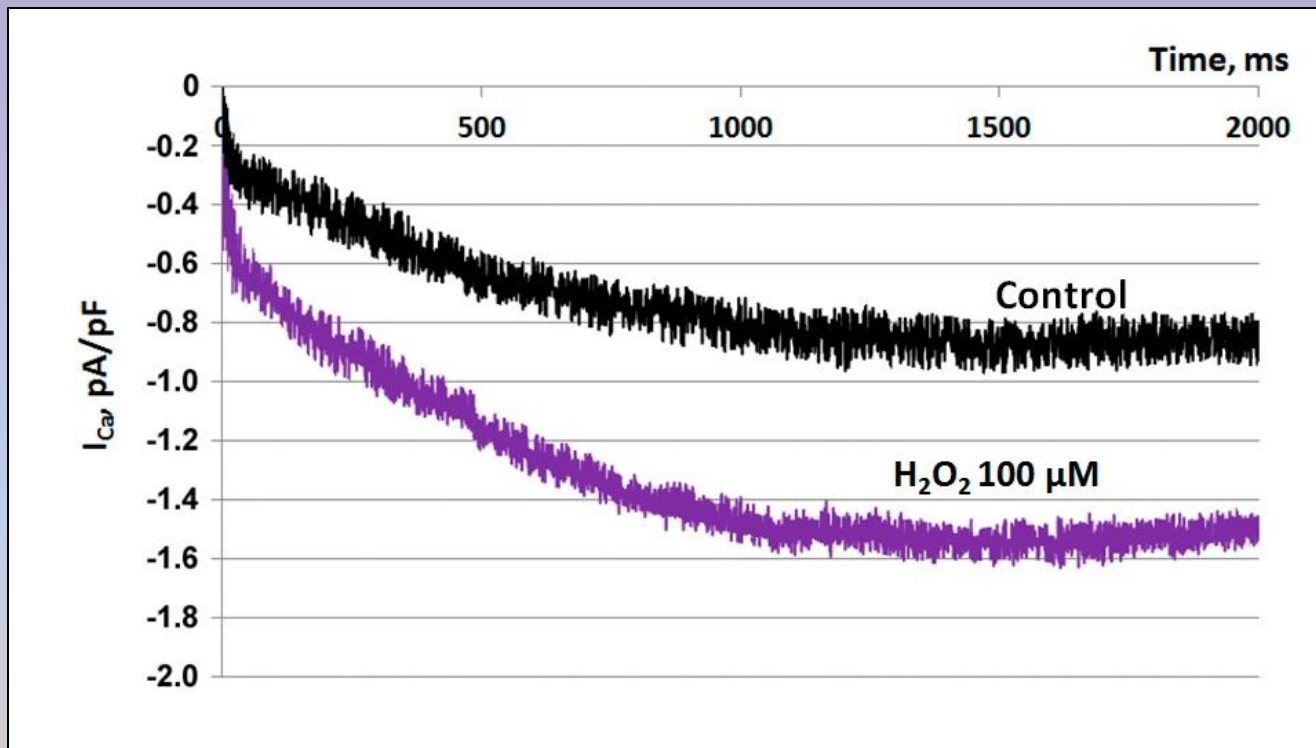


Нифедипин - ингибитор Ca^{2+} каналов L-типа



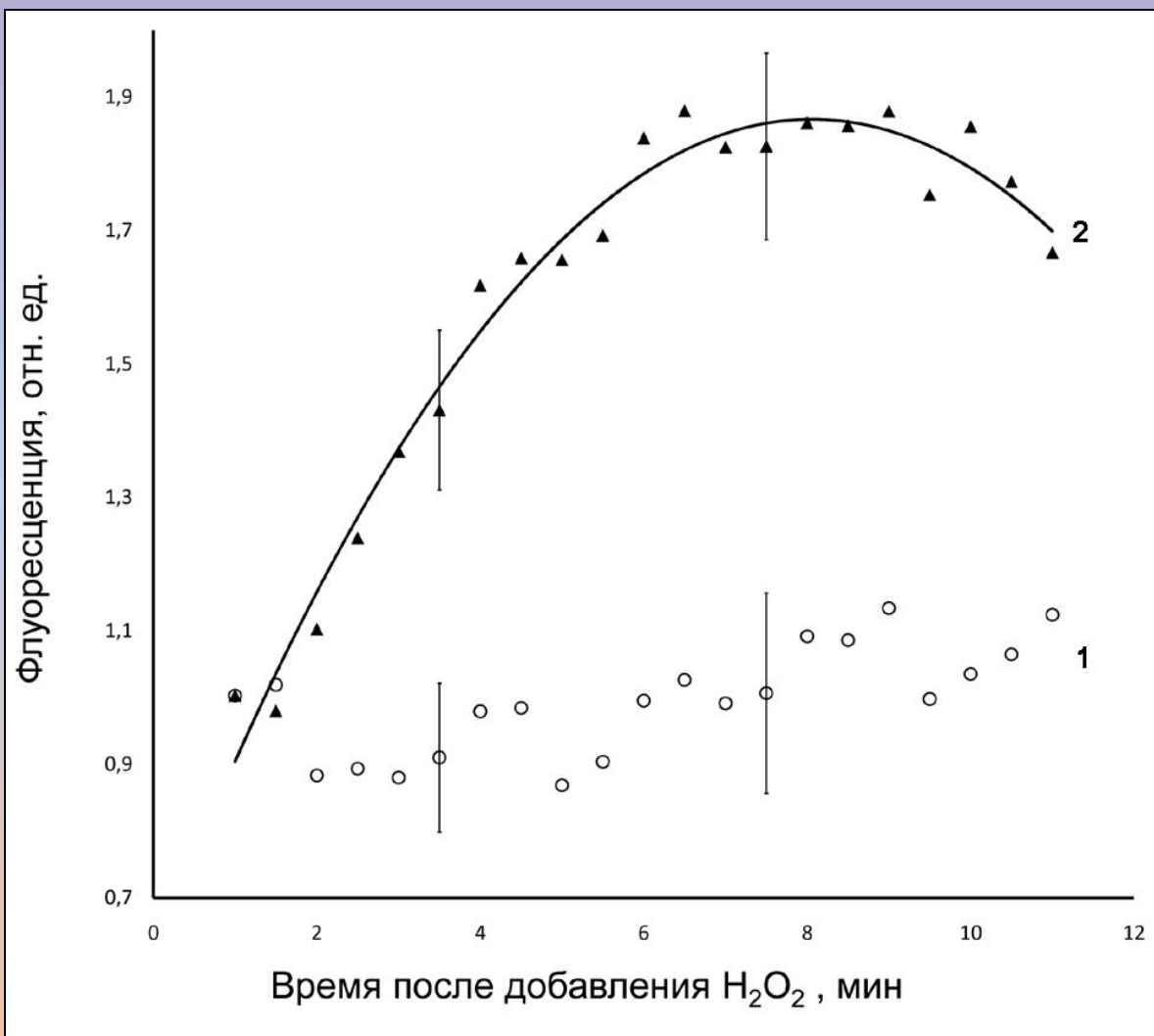
H_2O_2 -индуцированный вход Ca^{2+} (2) в протопласты из пыльцевых трубок ингибируется нифедипином, но не La^{3+} (1); по данным окрашивания флуоресцентным Ca^{2+} -чувствительным красителем Fluo-3

H_2O_2 активирует Ca^{2+} ток в протопластах из пыльцевых зёрен



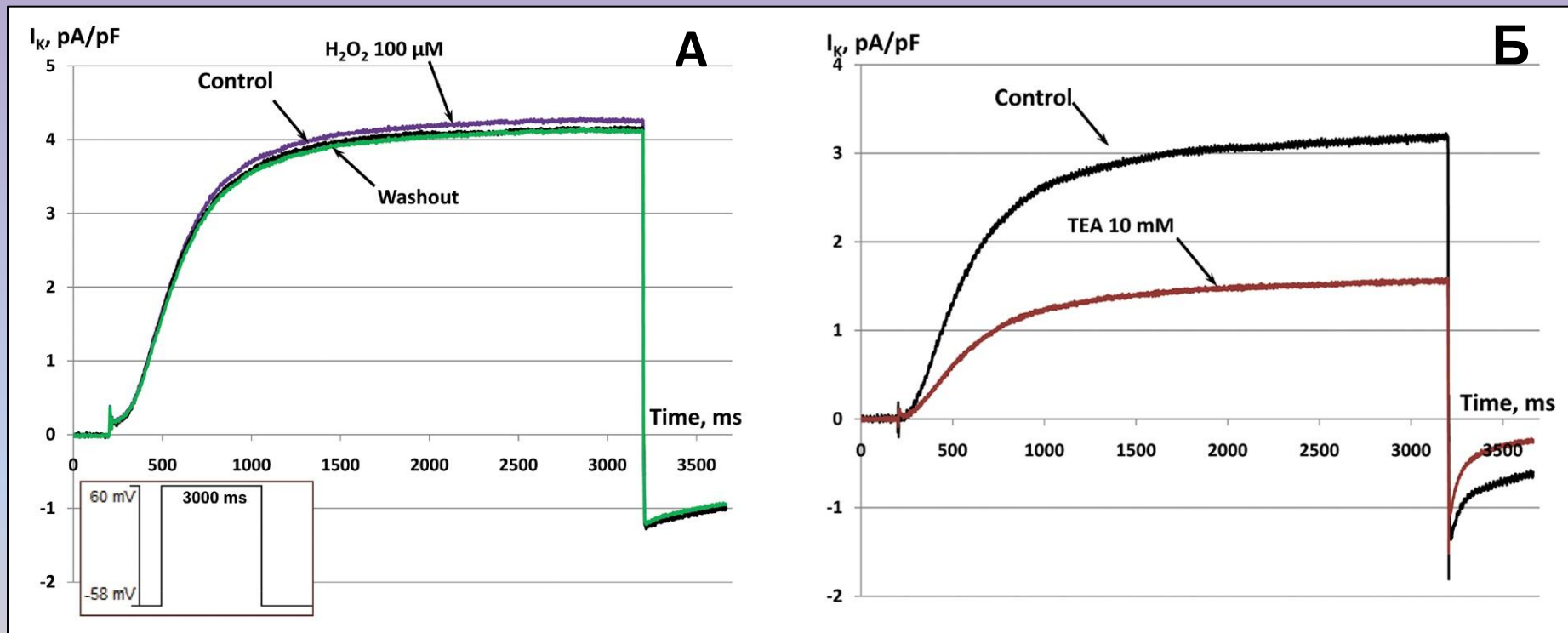
Оригинальная репрезентативная запись входящего Ca^{2+} тока, индуцированного гиперполяризацией (от 0 до -200 мВ, интервал 20 мВ) в контроле и после инкубации протопластов с 100 μM H_2O_2

H_2O_2 инициирует вход Ca^{2+} в субпротопластах из пыльцевых трубок



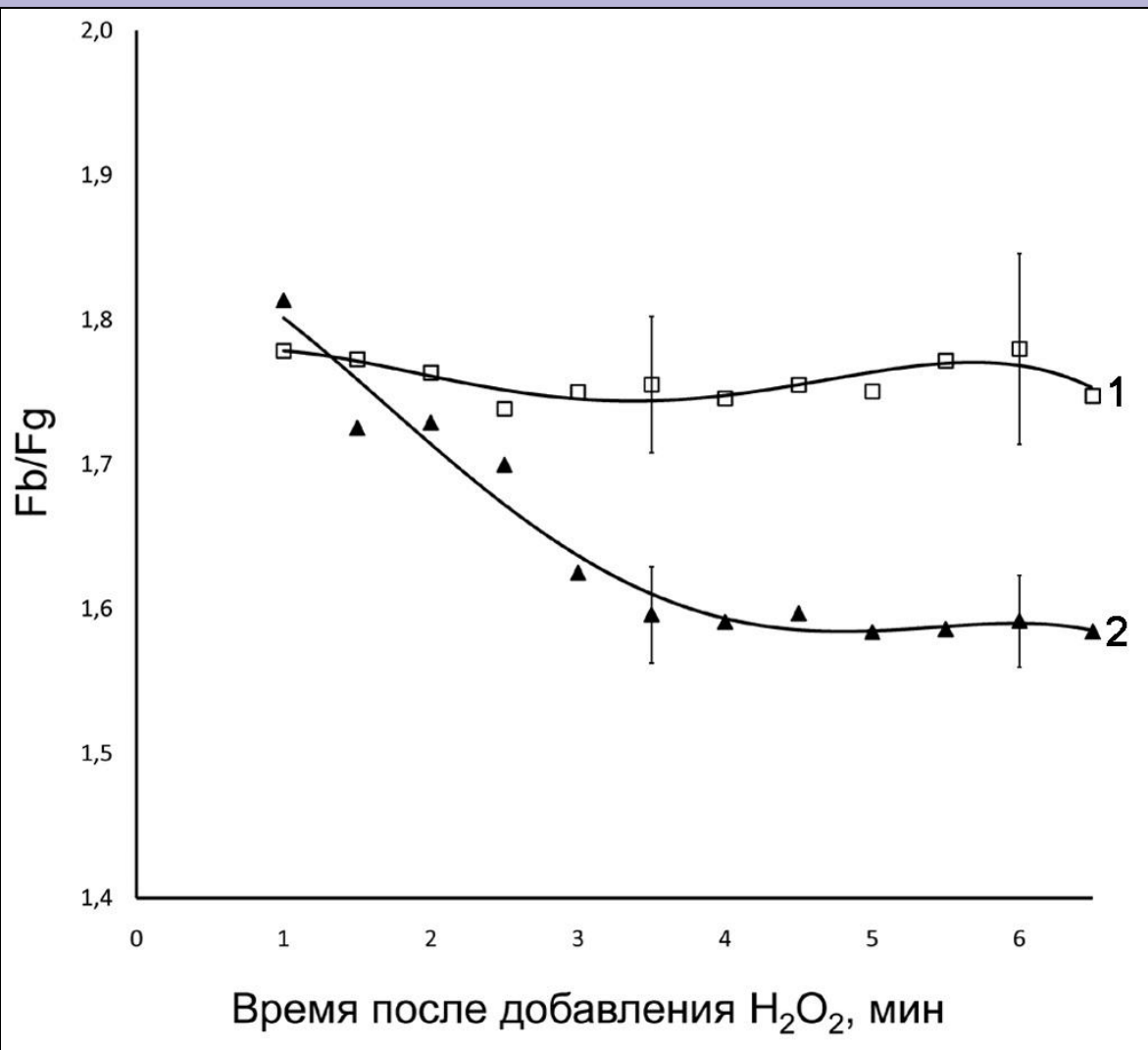
H_2O_2 -индуцированный вход Ca^{2+} (2) в протопласты из пыльцевых трубок ингибируется нифедипином, но не La^{3+} (1); по данным окрашивания флуоресцентным Ca^{2+} -чувствительным красителем Fluo-3

H_2O_2 активирует K^+ ток в протопластах лилии



Оригинальные репрезентативные записи K^+ тока, индуцированного деполяризацией (от -58 до 60 мВ) в контроле, после 5 минут инкубации в среде с 100 μ M H_2O_2 и с последующей отмывкой (А). H_2O_2 активирует выходящий K^+ ток. После отмывки ток возвращается к уровню контроля. Запись K^+ тока в контроле и при действии ингибитора K^+ -каналов тетраэтиламмония (ТЕА) (Б). ТЕА эффективно блокирует K^+ ток.

H_2O_2 вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны субпротопластов из пыльцевых трубок



Гиперполяризация плазматической мембраны субпротопластов из пыльцевых трубок (2) по отношению к контролю (1). Динамика по данным окрашивания флуоресцентным потенциал-чувствительным красителем di-4-ANEPPS

