

Лекция 2. Образование микроспоры и микрогаметофита

Смена поколений

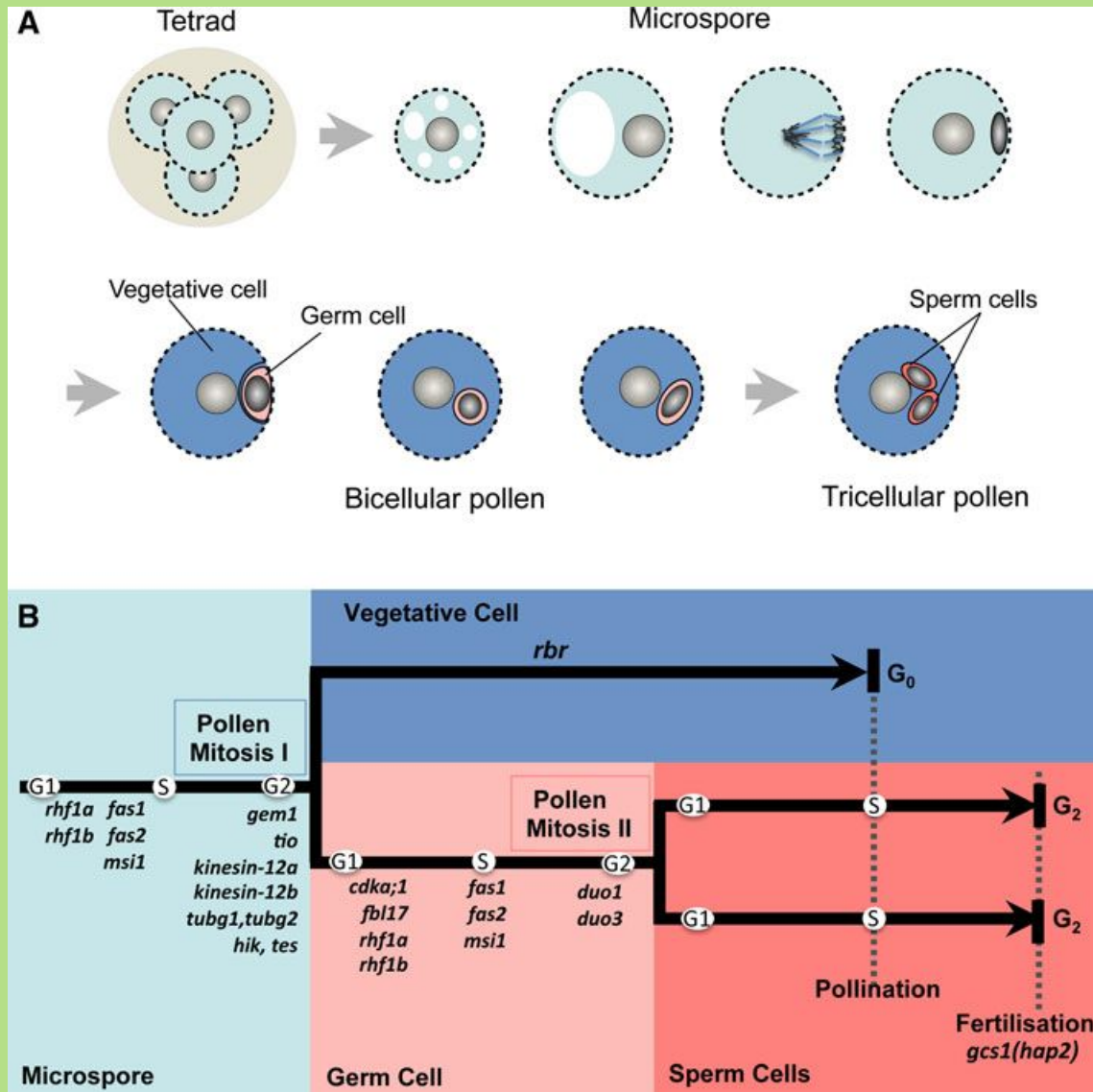


- Начало гаплоидному поколению растений дает мейотическое деление диплоидных спорогенных клеток. При этом образуются споры, из них развиваются гаплоидные организмы – гаметофиты, которые образуют гаметы.
- Слияние гамет при оплодотворении и образование зиготы – это рубеж, отделяющий гаплоидное поколение от диплоидного.

Особенности гаплоидного поколения

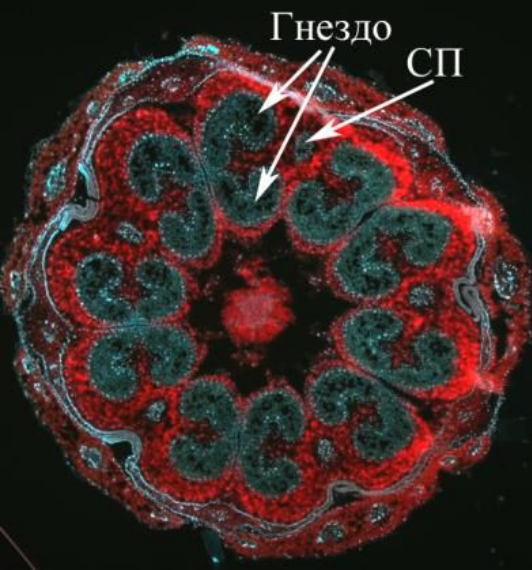
- Особенности физиологии гаметофитного поколения определяется его местом в жизненном цикле растений.
- Гаметофиты у семенных растений зависят от спорофита, находятся на нём, выполняя специализированные функции, связанные с половой репродукцией.
- К ключевым свойствам физиологии гаметофитов относятся **развитая система восприятия и передачи сигналов**, а также
- **строгий пространственный и временной контроль клеточных**

Образование микрогаметофита

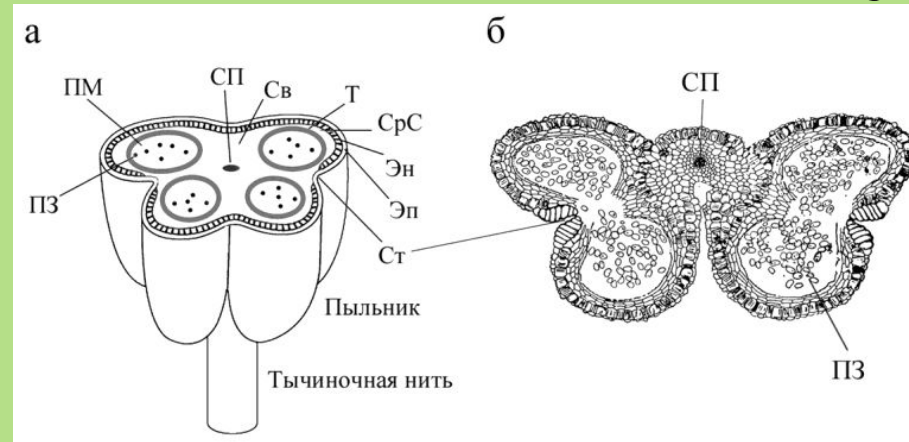


Аспекты физиологии мужского гаметофита

- 
- Пыльник. Формирование, поляризация и деление микроспоры, формирование оболочки
 - Метаболизм, транскриптом и протеомом 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



Пыльник. Тапетум.



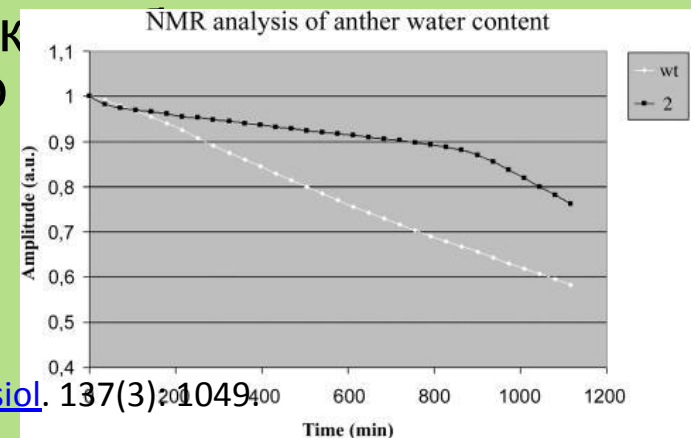
- У цветковых растений образование гаплоидных микроспор и развитие пыльцевых зерен происходит в пыльнике.
- В гнездах пыльника формируются микроспороциты (материнские клетки микроспор), которые вступают в мейоз и дают начало гаплоидному поколению.
- Стенка пыльника развивается из нерепродуктивных клеток. Она включает эпидермальный слой, различное число субэпидермальных слоев и внутренний слой – тапетум.
- Тапетум выстилает гнездо (полость, локулу) пыльника, где расположены репродуктивные клетки. Он отличается коротким временем жизни и активным метаболизмом.
- Главная функция тапетума – питание растущей микроспоры и пыльцевого зерна. Но вместе с тем в клетках тапетума синтезируются важные ферменты, предшественники спорополленина и компоненты трифины.

Водный статус пыльника

- В качестве одного из главных механизмов обезвоживания рассматривают перераспределение воды в пыльнике и ее отток через сосудистые пучки по направлению к основанию цветка
- 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
- Специфичные гены аквапоринов обнаружены в пыльниках ряда растений. Белки PIP2 накапливались на поздних стадиях развития пыльника

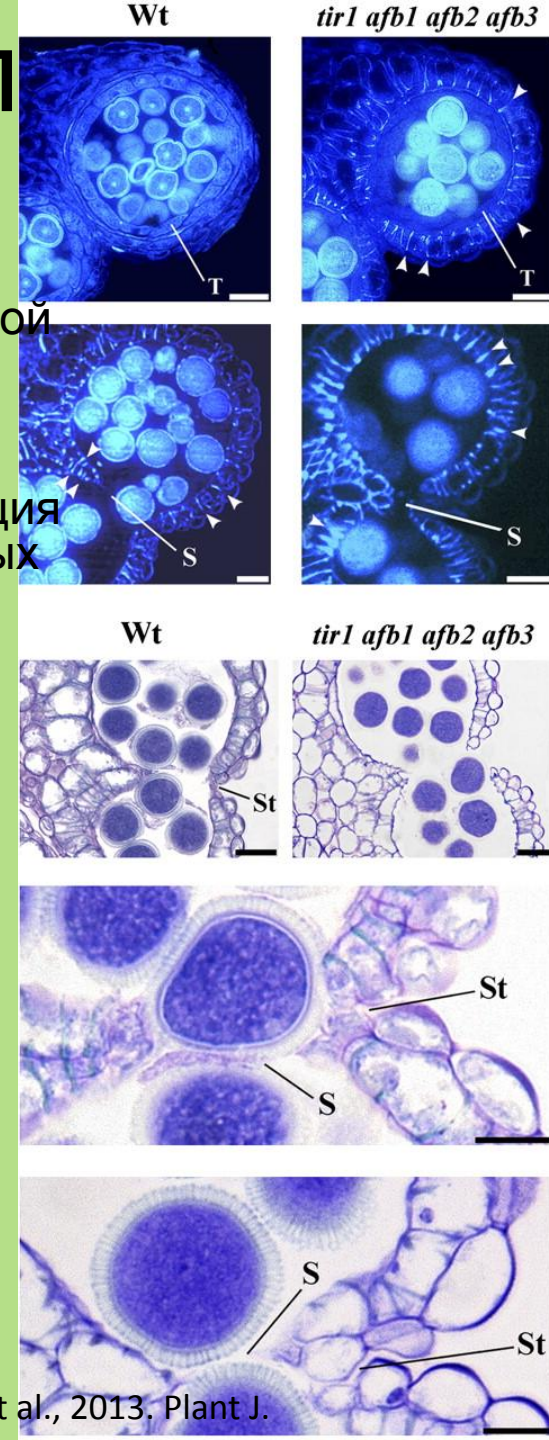
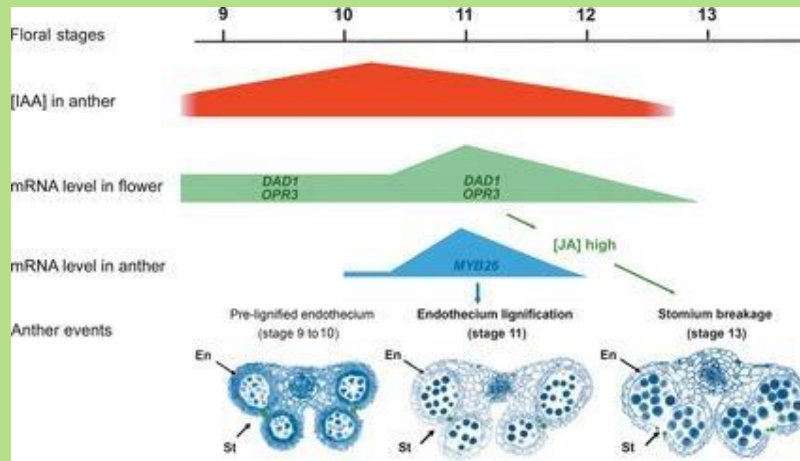


Bots et al., 2005 [Plant Physiol.](#) 137(3):1049



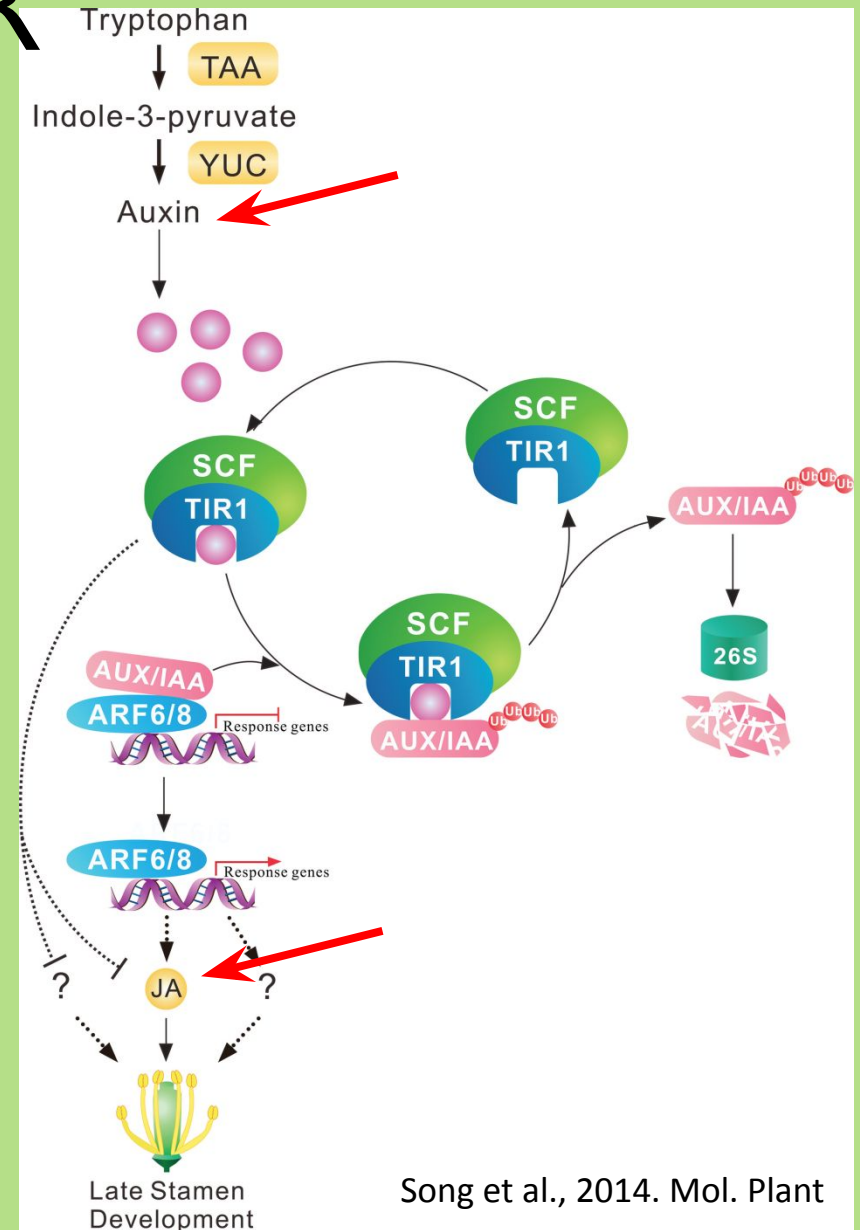
Гормональный контроль

- Для развития тычинки и раскрытия пыльников нужны фитогормоны.
- Наиболее изучен ауксин. 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 лигнификация эндотеция.
- У мутантов, дефектных по перцепции ауксина, лигнификация эндотеция, раскрытие пыльника и созревание пыльцевых зерен происходили преждевременно, а удлинение тычиночной нити было недостаточным.
- Как полагают, ауксин превращает преждевременную лигнификацию эндотеция, репрессируя ген, контролирующий этот процесс (*MYB26*).
- На последних стадиях развития пыльника концентрация ауксина уменьшается, снимая блок с гена *MYB26*, и запускается лигнификация эндотеция.



Ауксин и ЖК

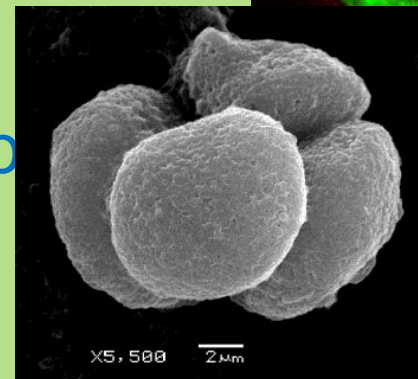
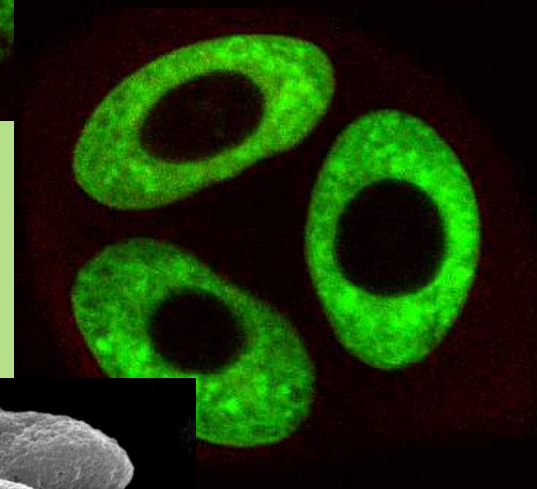
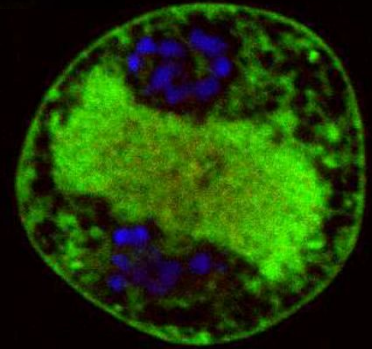
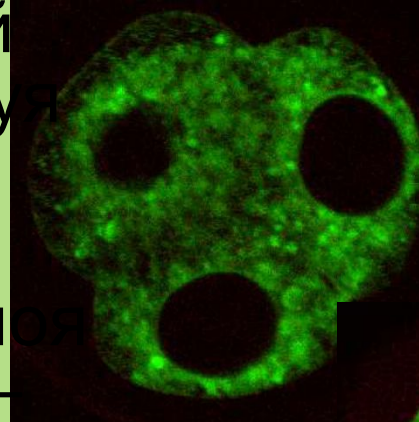
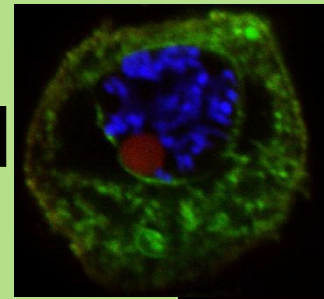
- Одновременно увеличивается экспрессия генов, контролирующих синтез жасмоновой кислоты.
- Последующая дегидратация эндотеция приводит к деформации пыльника из-за того, что часть его стенки лигнифицирована, а другая – нет. Возникают механические силы, полностью раскрывающие стоматум.
- Из раскрывшегося пыльника высвобождается пыльца, готовая для



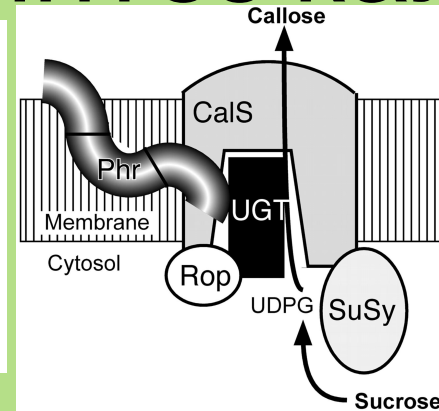
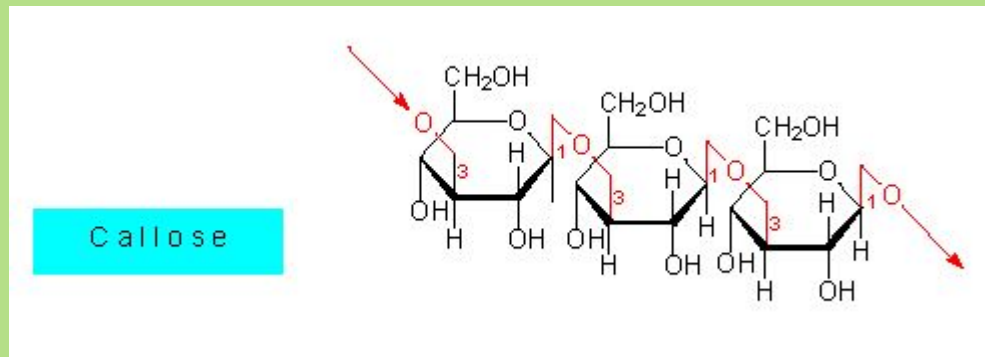
Тем временем в гнезде
пыльника...

Формирование тетрады

- После мейоза микроспороцита четыре гаплоидные клетки вначале остаются под общей **каллозной** оболочкой, образуя **тетрады** микроспор
- В тетрадах начинается формирование наружного слоя оболочки пыльцевого зерна – сложно устроенной **ЭКЗИНЫ**.
- Под действием ферментов, которые синтезируют клетки тапетума, оболочка, объединяющая микроспоры, разрушается, и **свободные микроспоры** выходят в гнездо микроспорангия.



Особенности и синтез каллозы

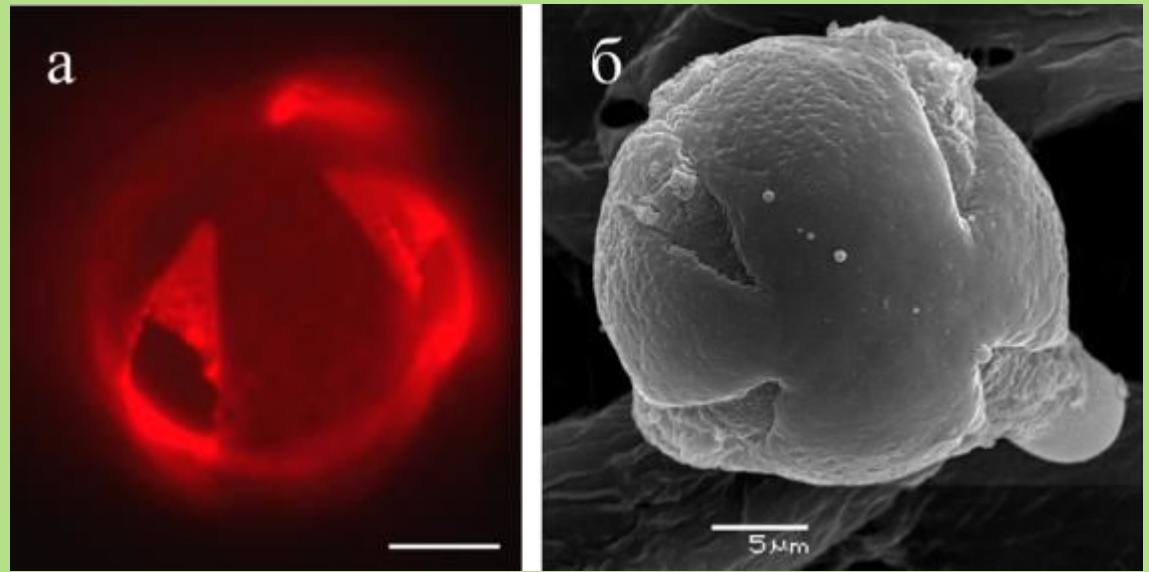


- Характерная особенность каллозы – быстрый синтез и быстрая деградация
- Этот полисахарид играет важную роль в репродуктивном развитии семенных растений, но каллоза обнаруживается и в клетках вегетативных органов.
- Каллоза представляет собой водонерастворимый линейный гомополимер β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан.
- Синтез каллозы катализирует ферментный комплекс, ассоциированный с плазматической мембраной.
- Главный его компонент – трансмембранный белок каллозосинтаза, субстратом для которой служит UDP-глюкоза

Зачем же нужна каллоза?

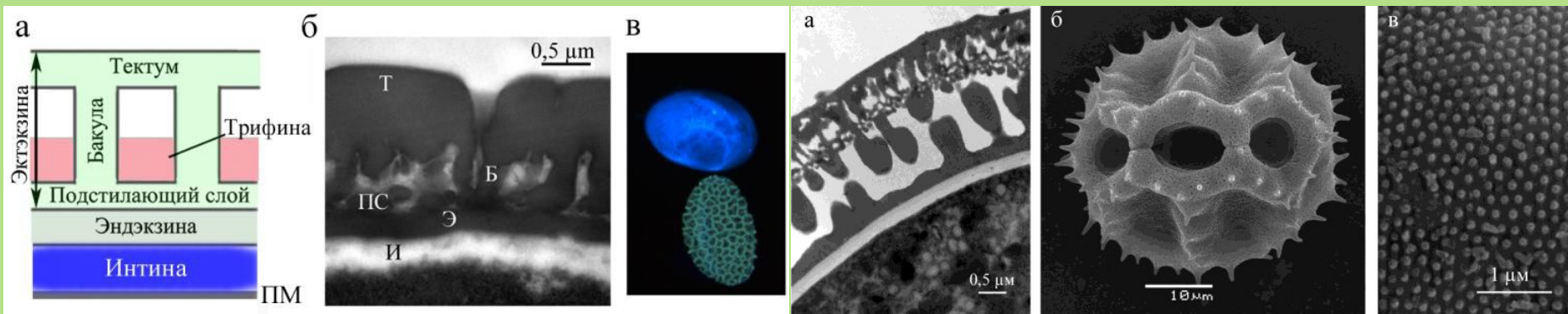
- В ранних работах обсуждали две главные функции каллозной оболочки: во-первых, физическая изоляция микроспороцитов от тканей спорофита (каллозу называли молекулярным фильтром); во-вторых, участие каллозы в формировании экзины и детерминации положения апертур.
- Предположение об изолирующей способности каллозной оболочки до сих пор не доказано. Нет причин полагать, что каллоза менее проницаема, чем первичная КС. Кроме того, оспаривается сама необходимость изоляции микроспор.
- Существуют примеры растений без каллозной оболочки, у которых микроспоры развиваются нормально.
- В то же время, предположение об участии каллозы в формировании экзины получило развитие.

Экзина и апертуры



- Экзина, наружная оболочка пыльцевого зерна, защищает гаметофит от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды – физических, химических и биологических (патогенов).
- Она обеспечивает возможность распространения пыльцы на достаточно большие расстояния и создает условия для прикрепления пыльцевых зерен к «подходящему» рыльцу.
- Важную роль в этих процессах играют апертуры – участки поверхности пыльцевых зерен, где экзина существенно редуцирована или отсутствует. Именно здесь выходит из пыльцевого зерна пыльцевая трубка.

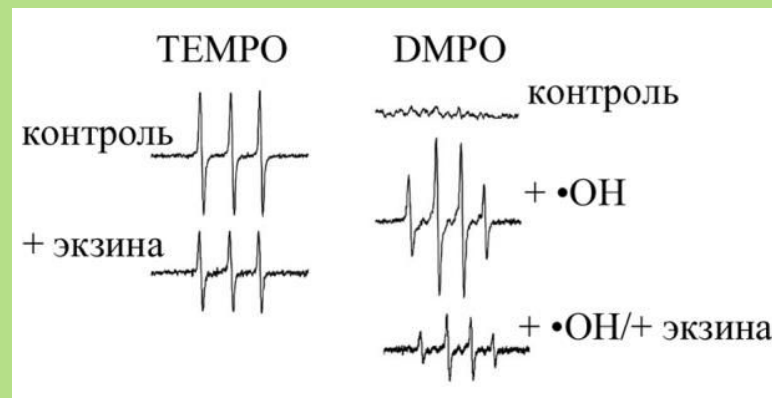
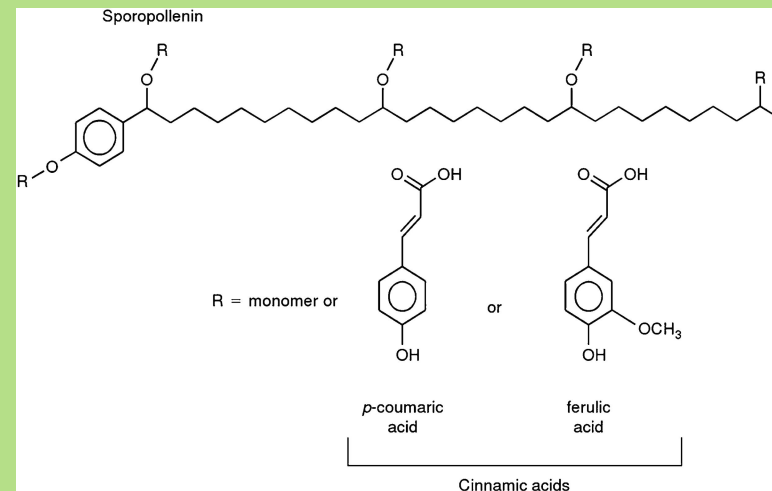
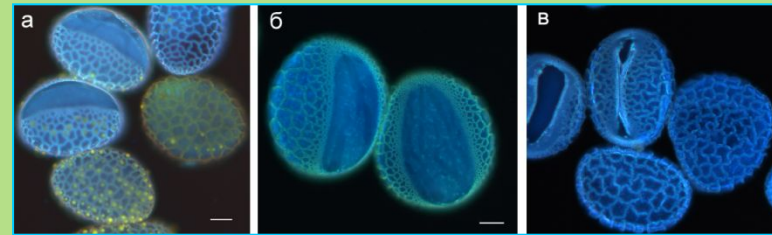
Строение экзины



- Экзина у многих растений имеет уникальный рельеф.
- Обычно она состоит из двух слоев: наружный слой – эктэкзина (сэкзина), внутренний слой – эндэкзина (нэкзина).
- Для цветковых растений типична бакулатная (столбиковая) эктэкзина. Она, в свою очередь, подразделяется на внешний покровный слой (тектум), внутренний подстилающий слой и радиально ориентированные бакулы между ними.
- Спорополленин - один из самых прочных и долговечных органических материалов, существующих в природе.

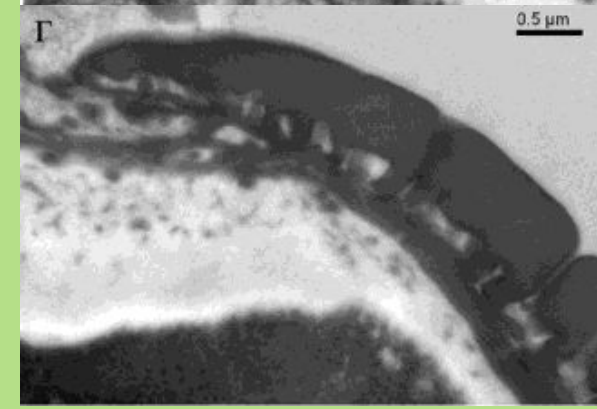
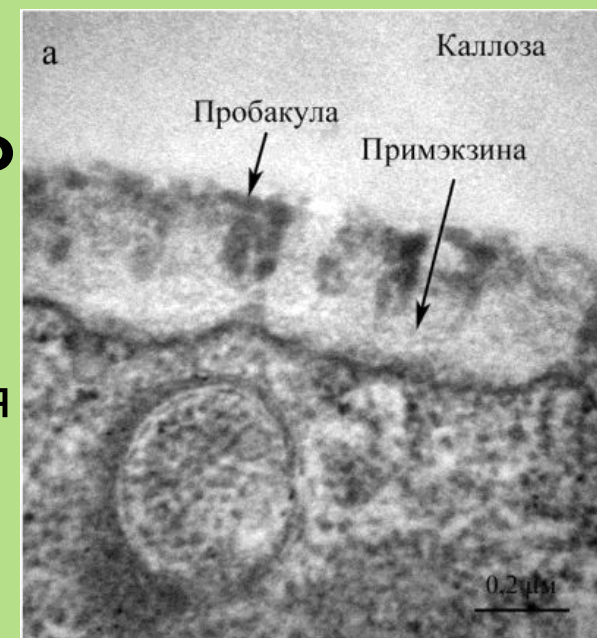
Спорополленин

- Спорополленин обеспечивает не только механическую прочность экзины, но и ее высокий антиоксидантный потенциал.
- Это свойство экзины было выявлено методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).
- Анализ показал, что антиоксидантная способность экзины связана с присутствием в составе спорополленина оксикоричных кислот. В



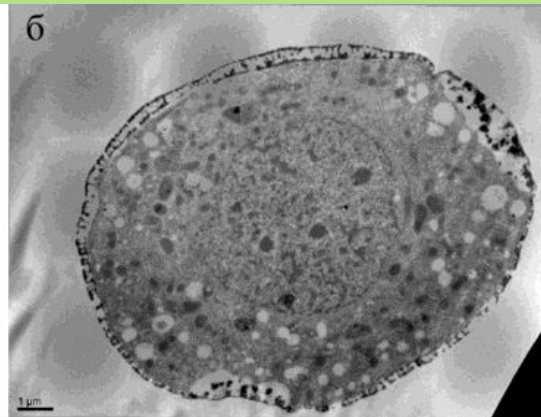
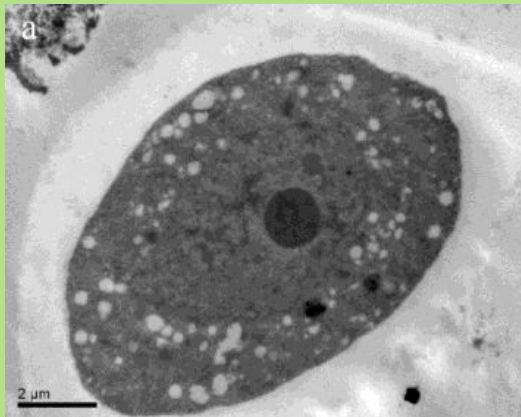
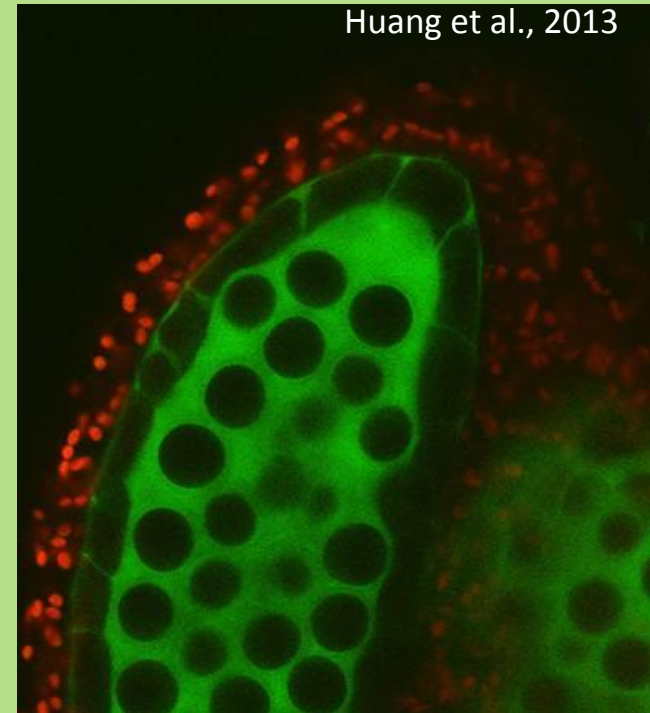
Формирование экзины

- Образование экзины начинается, когда микроспора еще находится в тетраде под толстой каллозной оболочкой и заканчивается после растворения каллозы и высвобождения микроспор из тетрад.
- Анализ мутантов показывает, что каллоза необходима для этого процесса.
- Вскоре после завершения мейоза на поверхности микроспоры под каллозной оболочкой откладывается примэкзина. Её рассматривают как матрицу (или рецепторную поверхность), на которой накапливаются предшественники спорополленина и формируется характерный для данного вида паттерн экзины.
- Предшественники спорополленина, синтезированные в клетках тапетума, переносятся на поверхность микроспоры

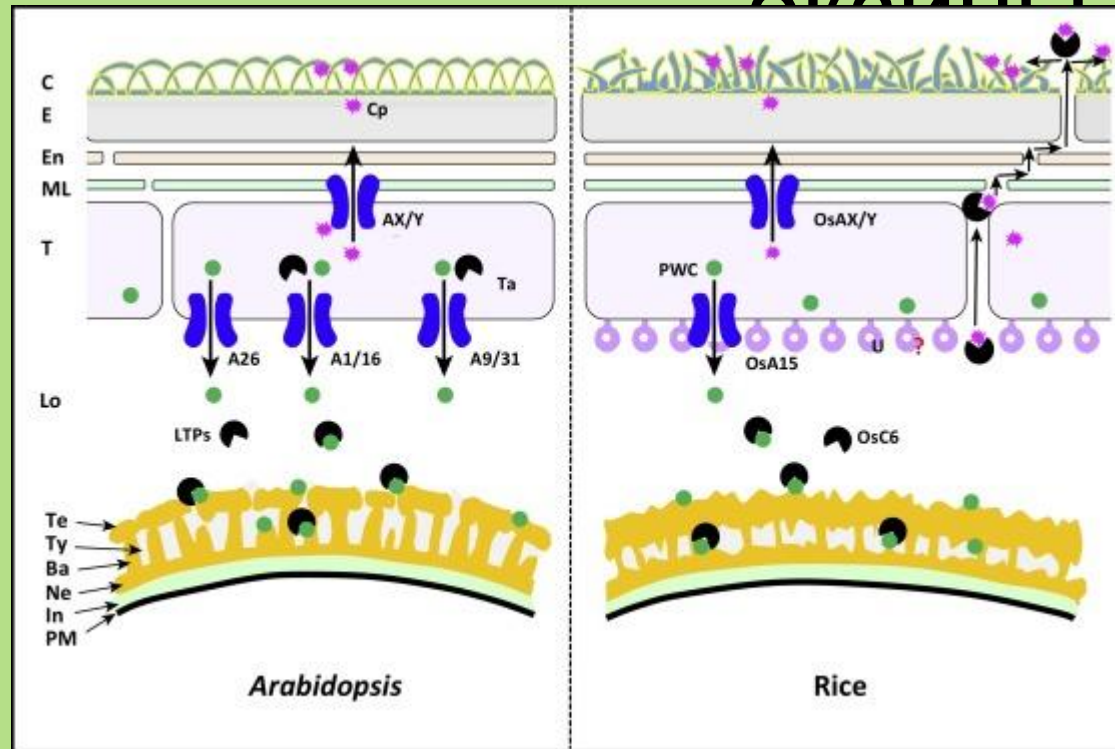


Секреция предшественников СП

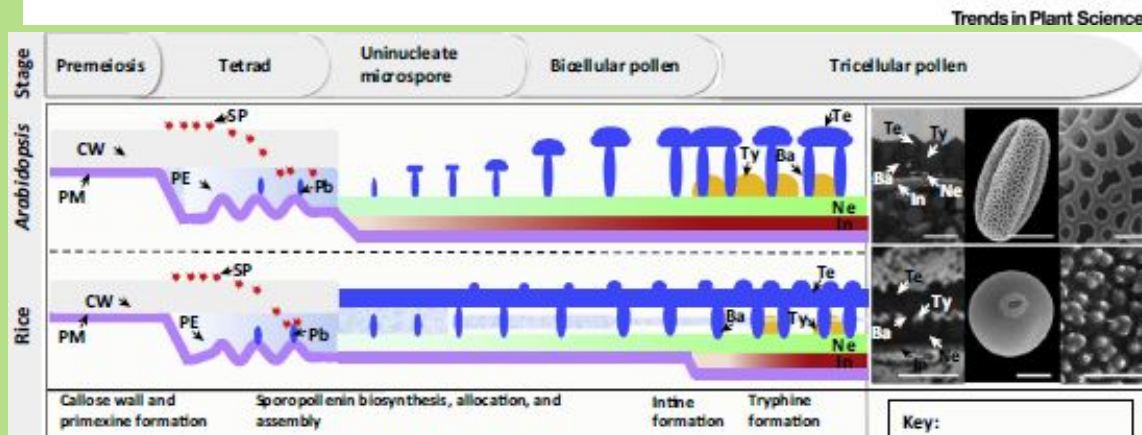
- Для секреции клетками тапетума нужны белки, связанные с плазмалеммой. Эту роль отводят ABC (ATP binding cassette) транспортерам.
- У *Arabidopsis* и риса обнаружены гены ABC транспортеров, специфичные для клеток тапетума, выпадение функций которых нарушало формирование экзины и приводило к дегенерации микроспор. Время экспрессии этих генов соответствует периоду формирования экзины.
- Переносчики мономеров спорополленина через локулярное пространство - липидпереносящие белки (LTP, lipid transfer protein). Это небольшие белки от 6 до 10 кДа, легко проникающие сквозь клеточные стенки. Гены LTP экспрессируются преимущественно или исключительно в тапетуме, максимум экспрессии соответствует периоду формирования экзины.



Общая схема строительства

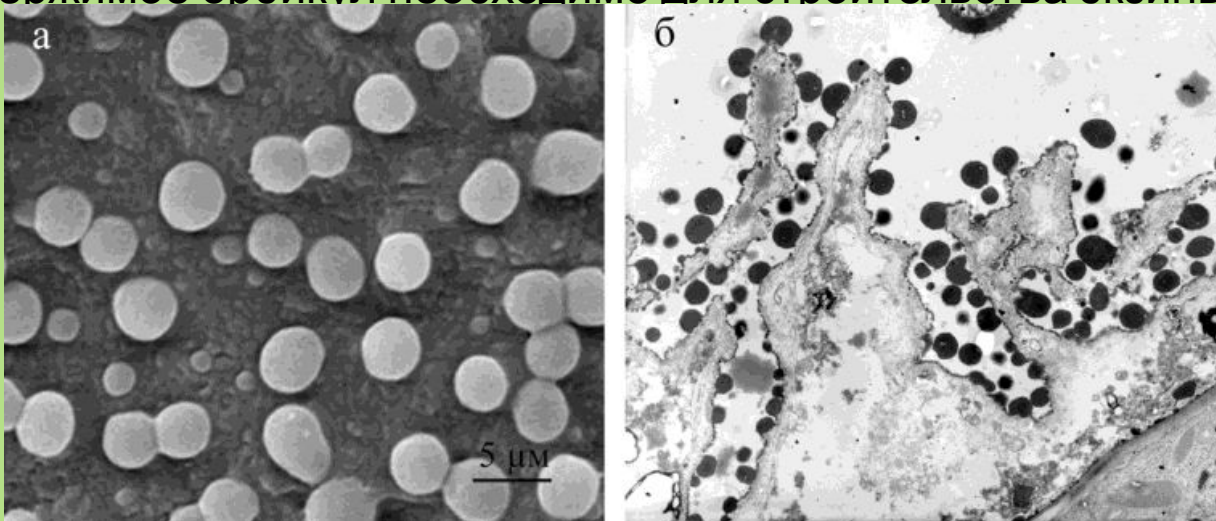


Proposed Model for the Localization of Pollen Wall Components within Anther Tissues. Facilitated by ATP-binding cassette (ABC) transporter G subfamily (ABCG) proteins and/or lipid transport proteins (LTPs), fatty acids, alcohols, poly- and tetra-ketides, flavonoids, and other tapetum-derived monomers are trafficked across tapetal cells to the locule on the pollen surface for the assembly of exine and tryphine. The same set of transporters, or other unknown transporter-like molecules, may transport lipidic and phenolic precursors for anther cuticle formation. Although it is known that *Arabidopsis* tapetosomes and elaioplasts and rice Ubisch bodies transport different pollen wall components, the underlying mechanisms are unknown ('?' indicates the unknown function of Ubisch bodies in the process). Pink burst dots and green circles indicate anther cuticle precursors and pollen wall component precursors, respectively. Abbreviations: A, ABCG; Ba, baculum; C, cuticular wax and cutin (anther cuticle); Cp, cuticle precursors; E, epidermis; En, endothecium; In, intine; Lo, locules; ML, middle layer; Ne, nexine; PM, plasma membrane; PWC, pollen wall constitutes; T, tapetum layer; Ta, tapetosome; Te, tectum; Ty, tryphine; U, Ubisch bodies; X/Y, other unknown transporters. Shi et al., 2015.

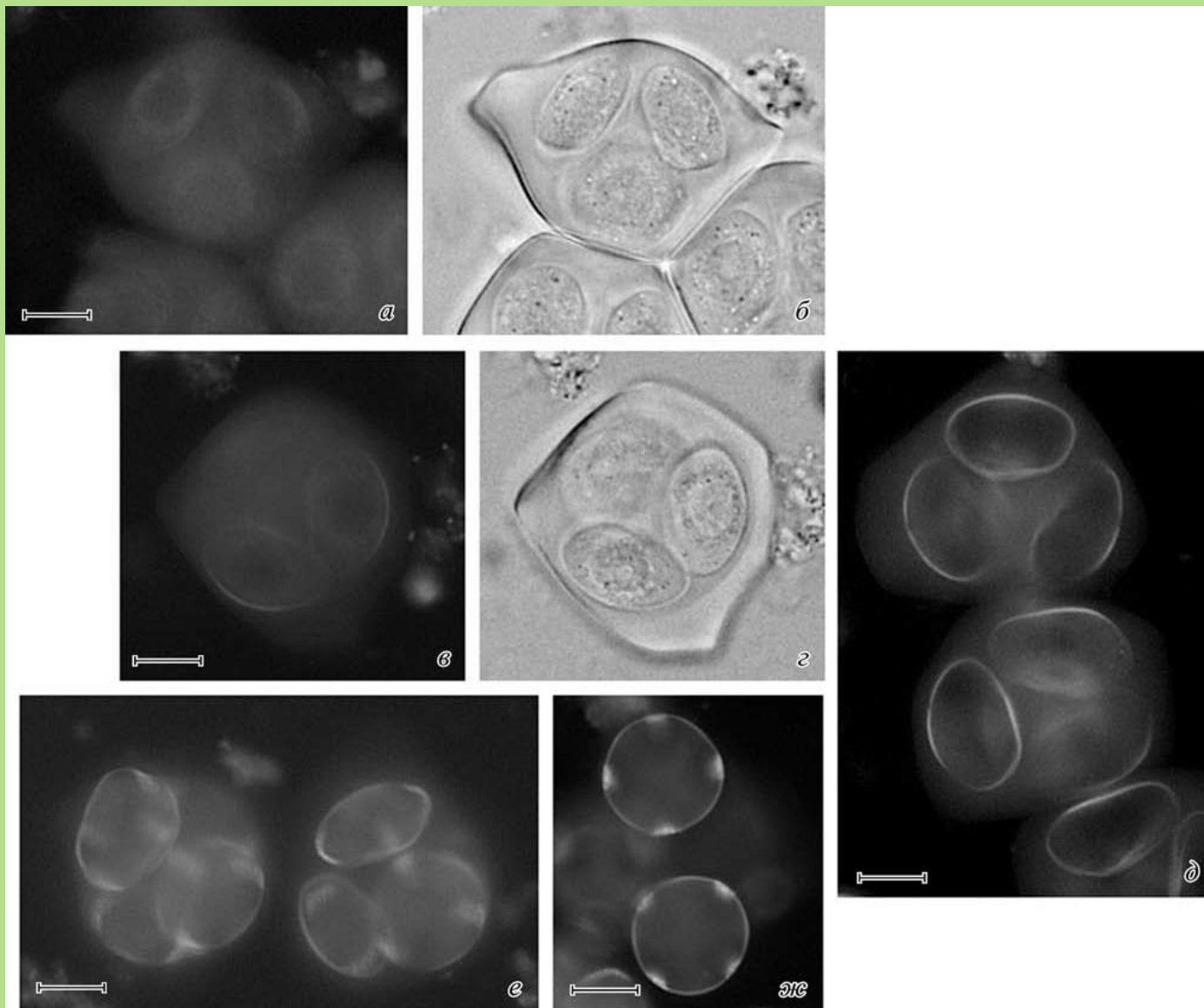


Тельца Убиша

- Они были открыты около 150 лет назад и обнаружены в пыльниках более 300 видов растений. Считается, что их наличие –признак тапетума секреторного типа.
- Тельца Убиша - орбикулы –осмиофильные сферические тела с диаметром до нескольких мкм, в которых выявляется полимеризованный спорополленин.
- Про-орбикулы формируются в клетках тапетума, выходят в гнездо пыльника и здесь, на поверхности тапетума, на них откладывается спорополленин. Этот процесс идет одновременно с отложением спорополленина на примэктине микроспоры.
- Недавно у риса и пшеницы был обнаружен специфичный для пыльников ген, кодирующий белок *RAFTIN*. Из клеток тапетума до элементов эктэктзины микроспоры белок приходил в составе орбикул. Выключение гена *RAFTIN* с помощью РНК-интерференции блокировало образование семян. Пыльцевые зерна коллапсировали, повидимому, из-за дефекта экзины. Это доказывает, что содержимое орбикул необходимо для строительства экзины.

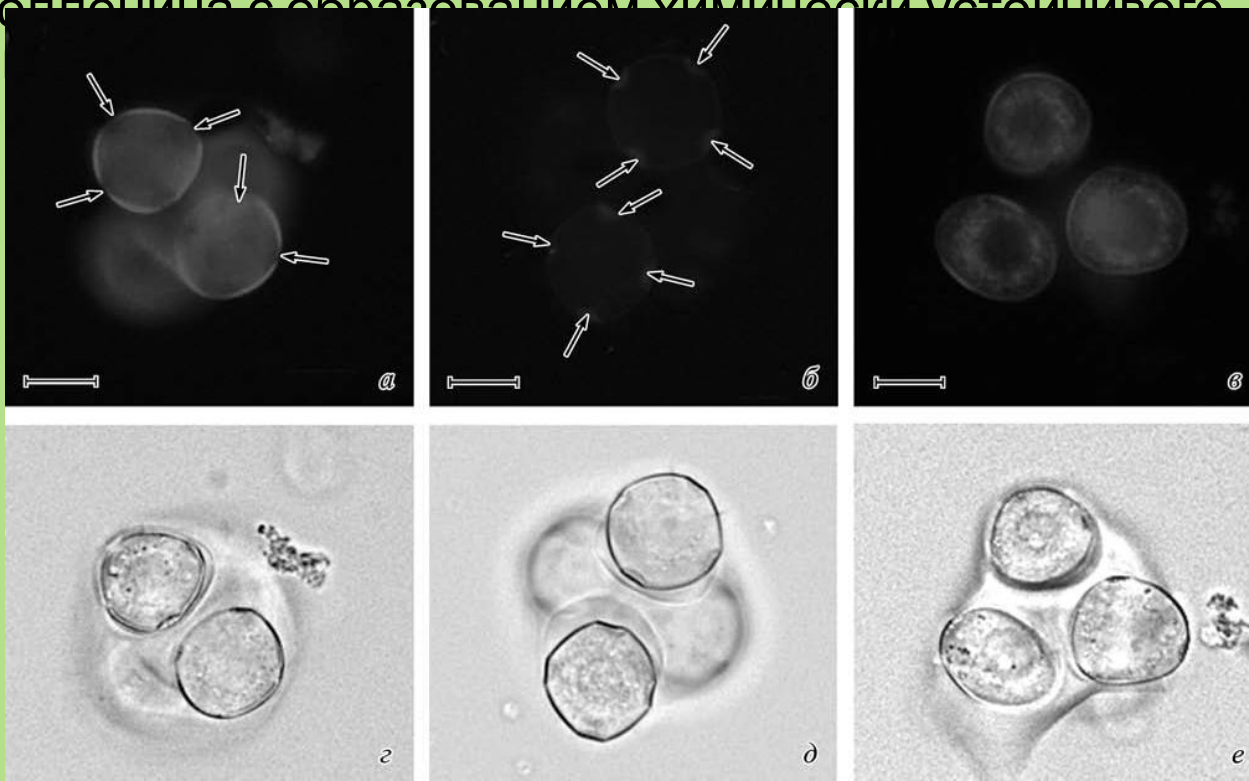


Накопление компонентов СП



Полимеризация спорополленина

- Пока обнаружен лишь один из возможных механизмов полимеризации, в основе которого лежат использование активных форм кислорода (АФК).
- Окрашивание на супероксид-радикал совпадает с автофлуоресценцией компонентов СП. После обработки СОД оно исчезает.
- Супероксидрадикал легко переходит в пероксид водорода, который может участвовать в окислительной полимеризации компонентов спорополленина с образованием химически устойчивого биопол



Формирование уникального рельефа экзины

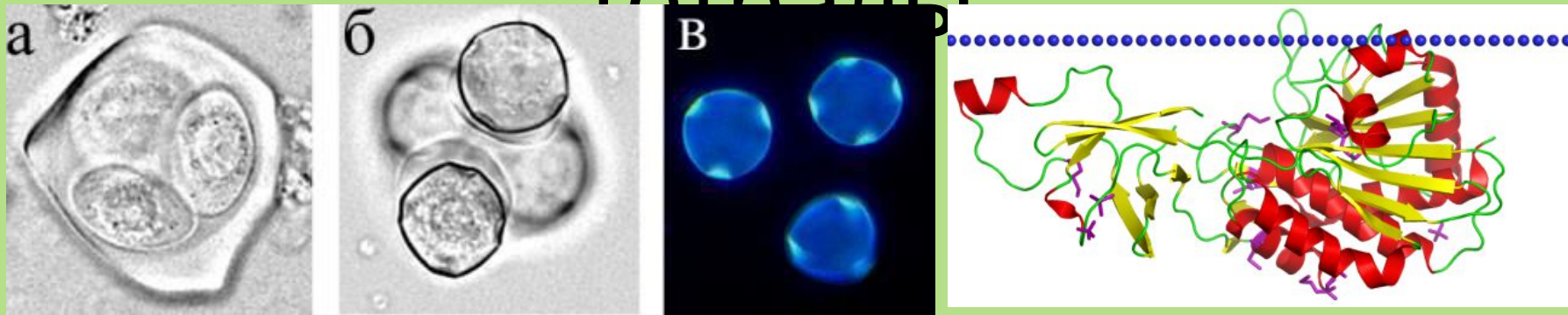
- Согласно актуальной модели, матрикс примэкзины гидратируется в периплазматическом пространстве микроспоры и, с одной стороны, вдавливается в каллозную оболочку, а с другой – нажимает на плазмалемму, и это давление передается на цитоскелет.
- Происходит оптимизация механических напряжений, возникающих в структурном комплексе цитоскелет-плазмалемма-каллоза, и формируются складки плазмалеммы, которые затем разглаживаются.
- Прямые доказательства участия примэкзины и плазмалеммы в формировании экзины дал анализ мутантов *Arabidopsis*. В их числе мутанты, пыльцевые зерна которых лишены экзины (*nef1, no exine formation1*) или имеют дефектную экзину (*dex1, defective in exine formation1* и *rpg1, ruptured pollen grain*), а также мутант с нарушениями раннего этапа образования экзины (*npu, no primexine and plasma membrane undulation*) – у него отсутствует примэкзина и складки плазмалеммы.
- Эти исследования доказали, что полноценная экзина развивается только в том случае, если примэкзина формируется своевременно и достигает нужной толщины, а складки плазмалеммы имеют правильный регулярный контур.

Самосборка экзины

- Другие авторы рассматривают процесс самосборки экзины с позиций коллоидной химии. В рамках этой концепции геном определяет точный состав и концентрации компонентов, необходимых для синтеза экзины. Но в остальном ход событий определяется законами физической химии, диктующими поведение легко деформируемых материалов, так называемых «мягких веществ» («soft matters»), таких как жидкие кристаллы, полимеры, коллоиды и др.
- Эту гипотезу доказывают результаты экспериментов, в которых наблюдали самосборку полностью дезинтегрированного (растворенного в горячем 2-аминоэтаноле) спорополленина. При этом формировались упорядоченные субструктуры, характерные для экзины.
- Самосборку экзины моделировали в искусственных коллоидных системах. В этих случаях вместо предшественников спорополленина использовали стирол, а в качестве липидной фазы – рапсовое масло. Варьируя соотношение компонентов и добавок, меняя скорость процесса полимеризации полистирола, удавалось получать разнообразные трехмерные структуры с шипами, ажурной сеткой и др., сходные с реальными формами экзины различных видов растений.

Растворение и выход из

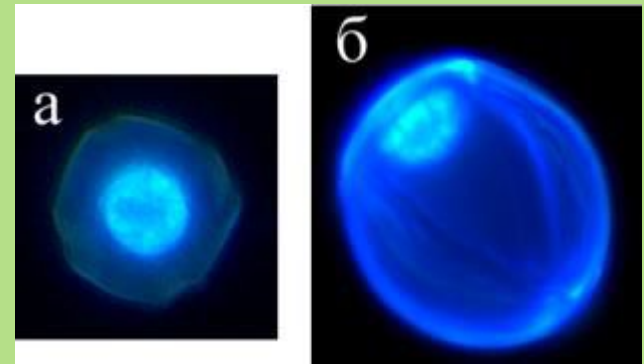
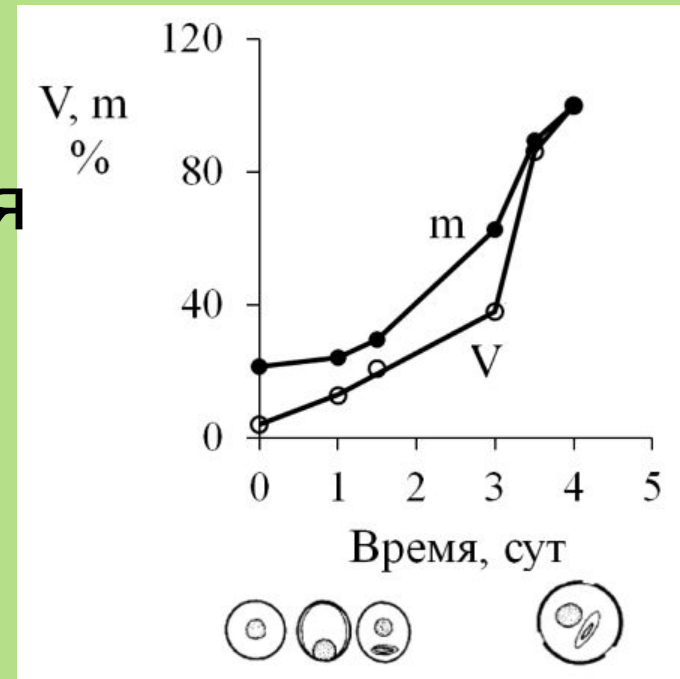
тетрады



- 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 $\rightarrow$ 3)-глюканов с образованием смеси коротких олигоглюкозидов.
- Экзоглюканазы по одной отрезают от них глюкозные единицы, продолжая процесс деградации каллозы
- Однако микроспоры удерживаются в тетраде не только каллозной оболочкой. Оказалось, что нужно растворить также 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

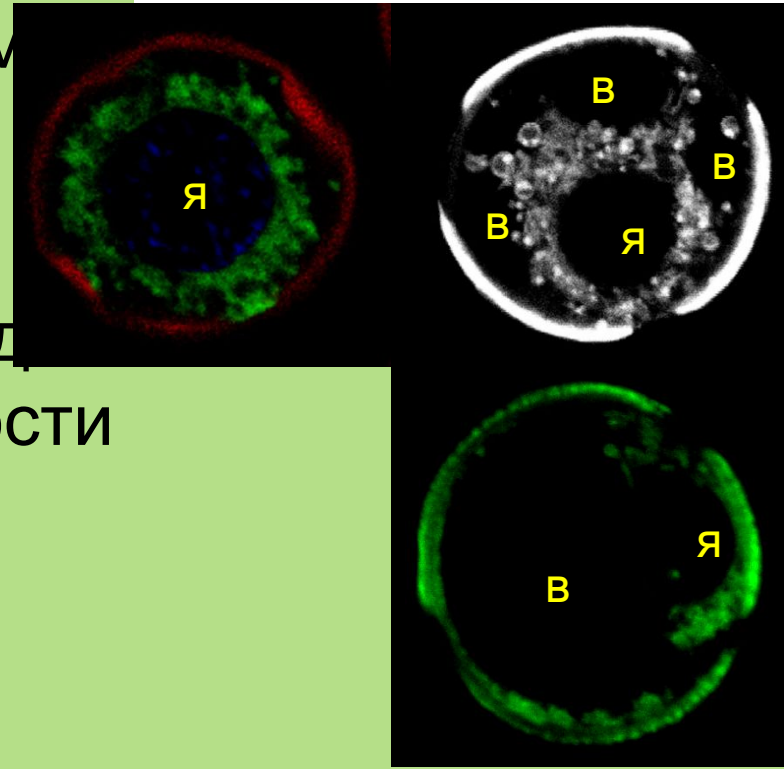
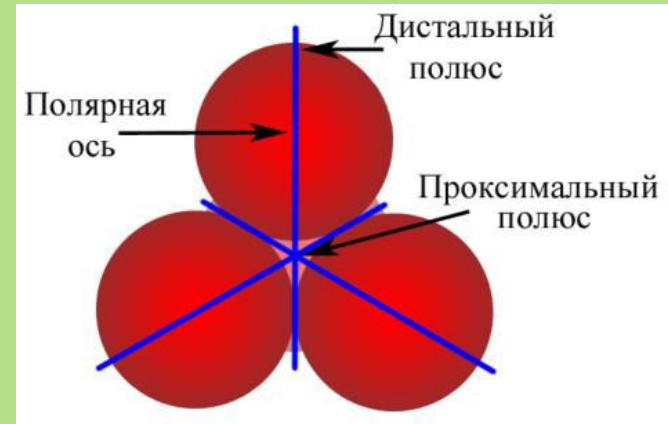
Созревание микроспоры

- В микроспоре растет крупная вакуоль, а ядро перемещается на периферию.
- Микроспора растет практически без увеличения массы сухого вещества – в основном за счет вакуолизации.
- По данным рентгеноспектрального микроанализа, рост микроспоры сопровождается накоплением в ней K^+ .



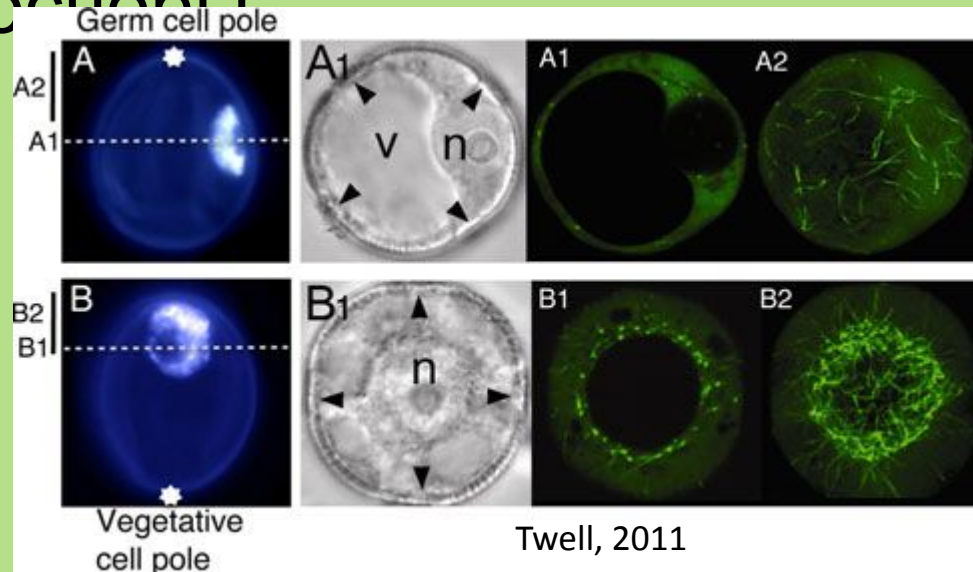
Миграция ядра

- Ядро в премитозной микроспоре прижато к оболочке. Миграция ядра начинается раньше, чем вакуолизация, поэтому считают, что перемещение ядра и рост вакуоли – процессы независимы.
- Направление миграции ядра микроспоры определяется ее полярной осью, которая детерминируется еще в тетраде.
- Ядро микроспоры, в зависимости от вида растения, мигрирует вдоль полярной оси или перпендикулярно ей.



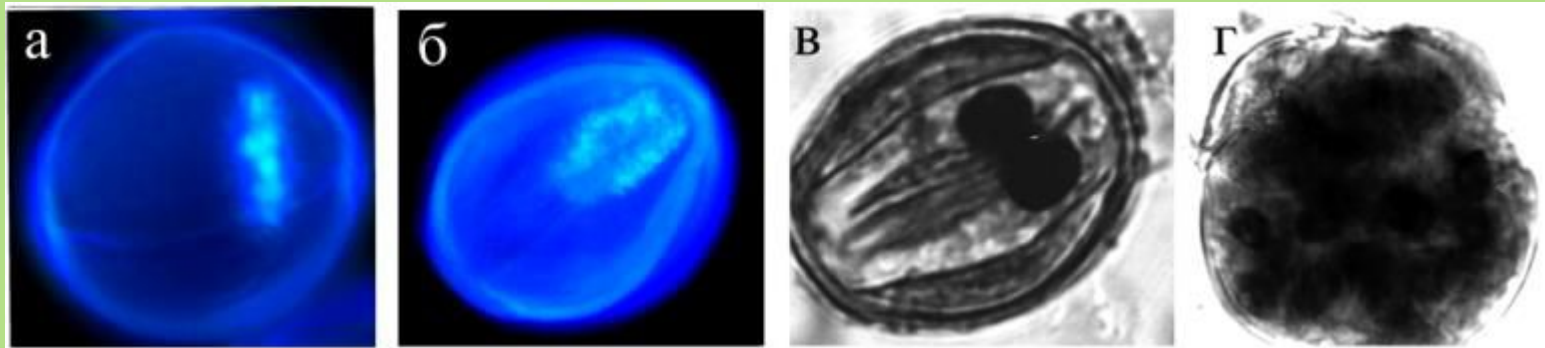
Механизмы поляризации

- Механизмы поляризации микроспоры все еще мало изучены, однако анализ немногочисленных мутантов показал, что важную роль в этом процессе играют микротрубочки.
- Микротрубочки участвуют также в фиксации положения ядра накануне митоза микроспоры.



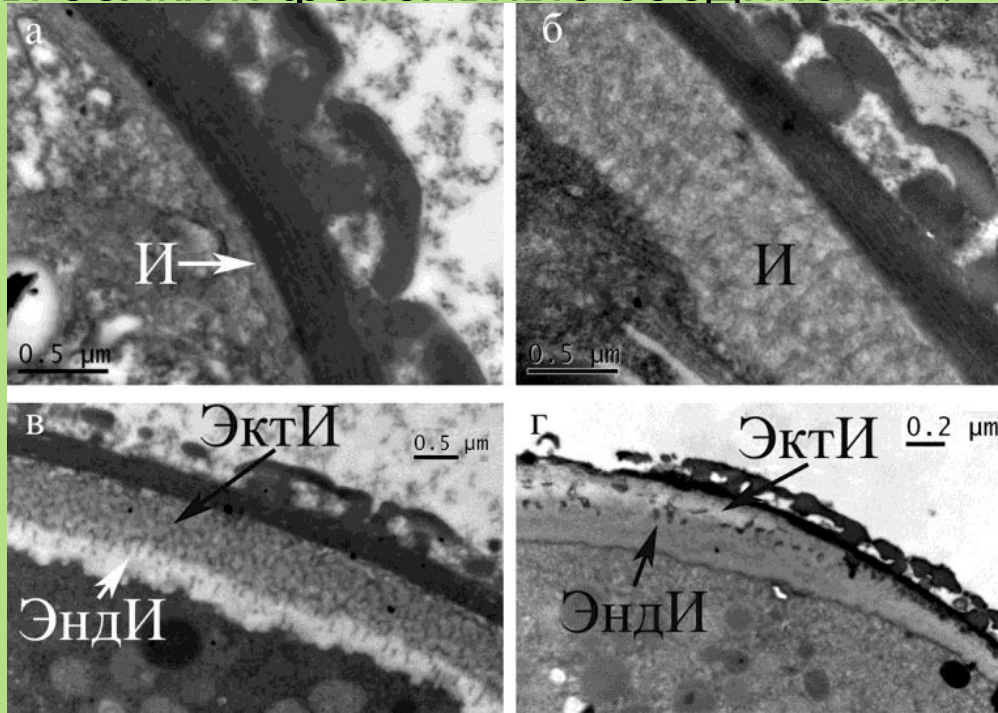
Деление микроспоры

- Поляризованная микроспора вступает в асимметричный митоз (I пыльцевой митоз). Он приводит к образованию пыльцевого зерна.
- Ассиметричность митоза принципиальна для дальнейшего развития ПЗ.
- В случае симметричного митоза (можно индуцировать холодом, ингибиторами) происходит переключение на спорофитный путь развития.
- Этот метод используют для получения



Формирование интины

- Отложение интины начинается до или после митоза микроспоры, как правило, сначала вблизи апертур, а затем – на остальной части поверхности.
- В отличие от экзины, компоненты которой образуются в результате согласованных синтезов в микроспоре и тапетуме, интина полностью синтезируется самим гаметофитом.
- Структурные полисахариды (пектины, целлюлоза, сшивочные гликаны) образуют трехмерную полимерную сеть, в которую включены белки и фенольные соединения.



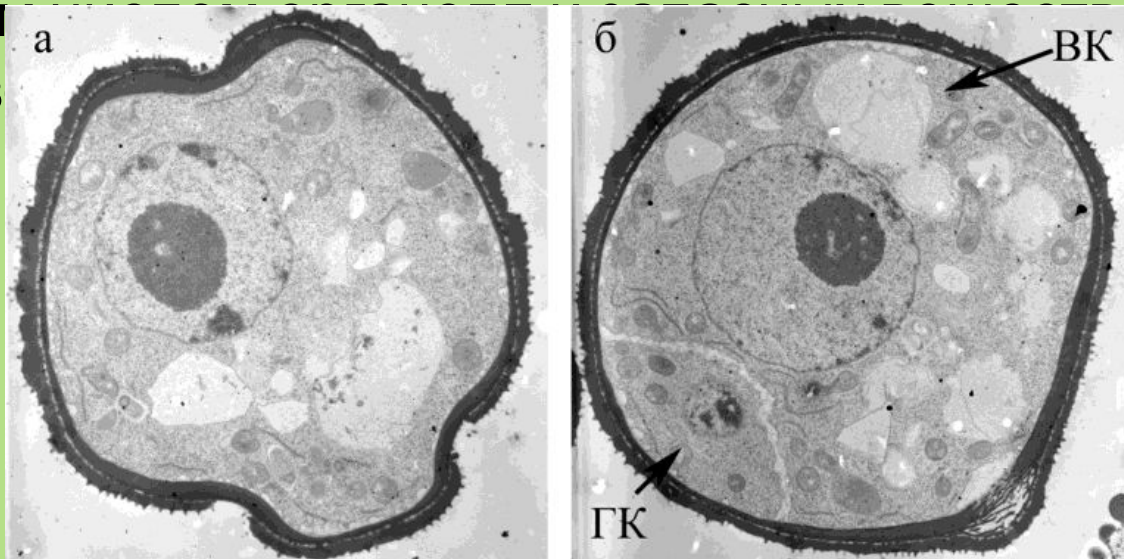
Нарушения формирования ИНТИНЫ

- Число мутантов с нарушениями развития интины сравнительно невелико. Как правило, они затрагивают гены ферментов, регулирующих метаболизм полисахаридов. В их числе полигалактуроназы – ферменты, которые участвуют в деградации пектина. В функциональном отношении наиболее изучены гены двух полигалактуроназ – *BcMF2* (*Brassica campestris* *Male Fertility 2*) и *BcMF9*.
- В этом же ряду работ с *Brassica campestris* изучение гена *BcMF8*, который кодирует арабиногалактановый белок, локализованный в клеточной стенке.
- Нарушения синтеза этих белков приводили к аномалиям в развитии интины и деформации пыльцевых зерен. Пыльцевые трубки, если они возникали, быстро прекращали рост.
- Они лопались (*bcmf8*, *bcmf9*) или формировали шарообразные вздутия в апикальной части (*bcmf2*). Из этих опытов можно сделать вывод о том, что правильное развитие интины – необходимое условие реализации главной функции мужского гаметофита.

Пыльцевое зерно

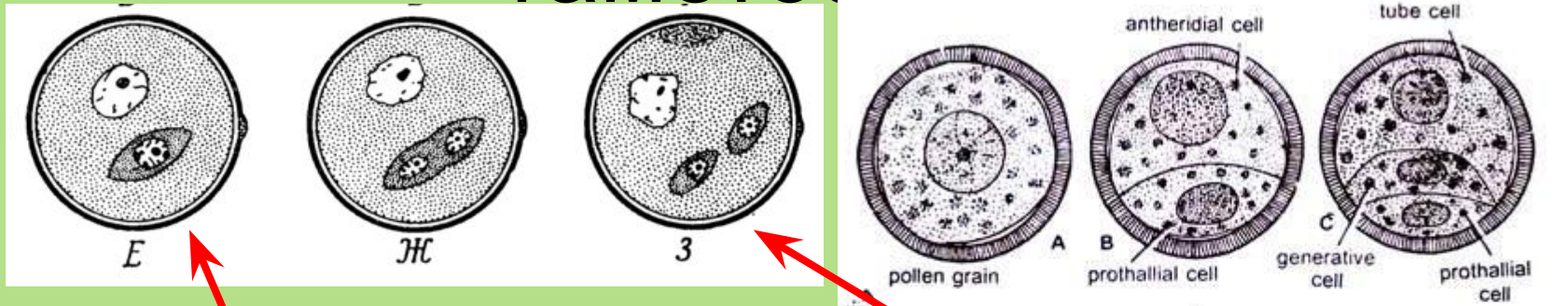
- Двухклеточное пыльцевое зерно цветковых растений – это уникальная конструкция, построенная по типу «клетка-в-клетке».
- Почти вся цитоплазма достается большой вегетативной клетке с крупным диффузным ядром. Она формирует пыльцевую трубку и доставляет спермии к яйцеклетке.
- Внутри этой клетки располагается генеративная (гаметогенная) клетка с конденсированным хроматином,

малый
образ



Она делится с

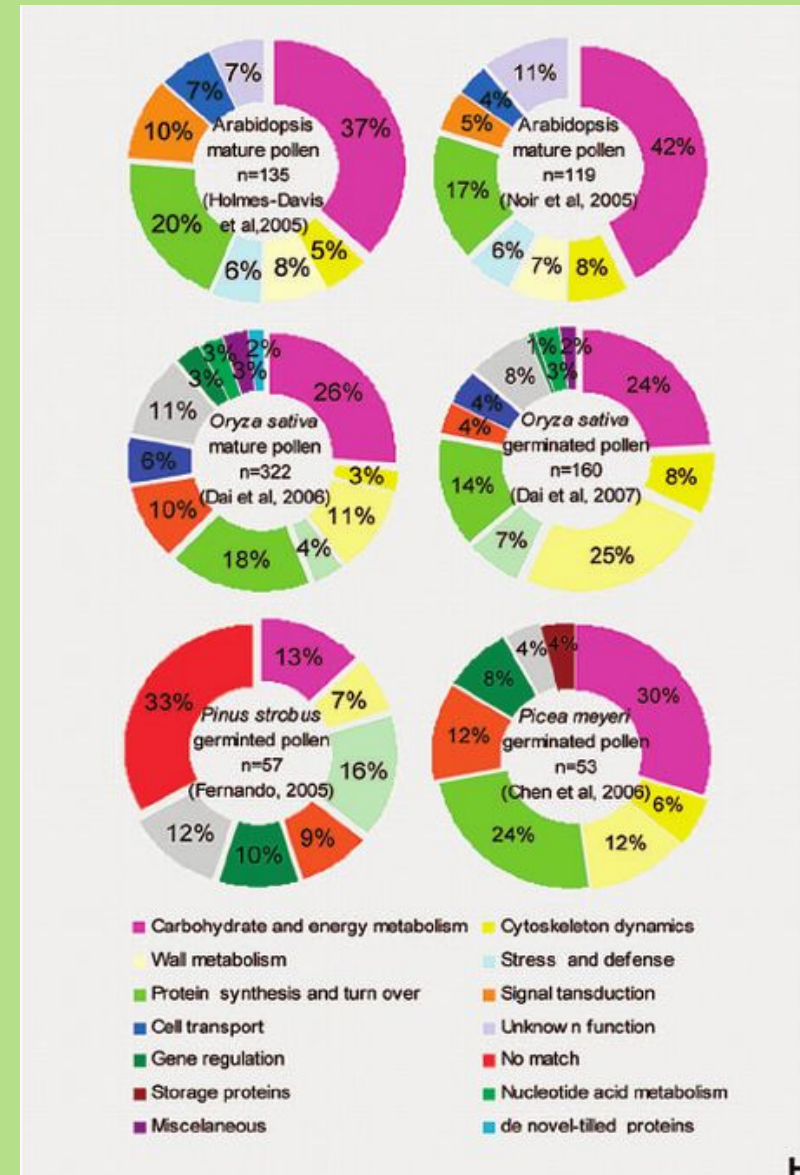
Деления при созревании гаметофита



- Покрытосеменные: 25% 3-клеточных (арабидопсис), 75% 2-клеточных (лилия, табак).
- Микрогаметофит голосеменных претерпевает 3-5 (редко больше) митозов, в числе которых есть и неравные.
- У сосны и гинкго из микроспорангиев высыпается четырехклеточная пыльца, у секвойи – двухклеточная, у можжевельника – одноклеточная. Спермии во всех случаях образуются только после опыления.

«Ранние» и «поздние»

- Экспрессия «ранних» генов начинается в микроспоре и заметно снижается перед созреванием пыльцевого зерна.
- «Поздние» гены экспрессируются после митоза микроспоры, накопление их продуктов продолжается в ходе развития пыльцевого зерна.
- Ранние гены в основном обеспечивают микрогаметофитогенез, а поздние связаны с созреванием пыльцевого зерна, питанием растком



Какие мРНК и белки

запасаются

- После деления микроспоры идет накопление пула долгоживущих **мРНК**, которые не транслируются до прорастания. В основном это продукты активных генов, включенных в метаболизм клеточной стенки, функционирование цитоскелета и сигналинг.
- При этом значительную долю **белков**, запасаемых в процессе созревания, составляют белки углеводного метаболизма.
- По-видимому, запасаются **белки**, необходимые для обеспечения клетки энергией, и **транскрипты** для структурных и сигнальных белков.

Генеративная клетка/спермии

- На протяжении долгого времени считалось, что вегетативная клетка полностью контролирует жизнь генеративной клетки и спермиев.
- Детальные исследования экспрессии генов в спермиях полностью разрушили представления о транскрипционной инертности мужских гамет.
- Функциональный анализ транскриптов, которыми обогащены спермии, выявил гены, связанные с **модификацией и репарацией ДНК, ремоделированием хроматина и убиквитин-зависимым протеолизом**, что указывает на высокую скорость оборота белков.