

УДК 581.162.41

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ЕЛИ (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.) *in vitro*

© 2024 г. М. В. Сурсо^{а,*}

^аФедеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова
Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

*e-mail: surso@fciarctic.ru

Поступила в редакцию 18.04.2024 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Изучено влияние состава сахаров и pH питательной среды на рост и развитие пыльцевых трубок у интрогрессивного гибрида ели европейской и сибирской (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.) *in vitro*. Показана динамика роста пыльцевых трубок ели. Установлено, что относительно высокая скорость роста пыльцевых трубок во многом обуславливает особенности физиологии их развития. Описана картина быстрого синтеза целлюлозы в процессе гидратации пыльцевых зерен ели. Выявлены различия компонентного состава пыльцы и пыльцевых трубок. Содержание белков, аминокислот, РНК, ДНК, липидов и полисахаридов по градиенту длины пыльцевых трубок у ели возрастали скачкообразно по направлению к растущему кончику и стабилизировались по достижении примерно половины их максимальной длины. При этом общее содержание углеводов в пыльцевых трубках по градиенту длины практически не изменялось. Описаны процессы формирования на поверхности пыльцевых трубок внешних колец, состоящих в основном из целлюлозы и каллозы. Высказано предположение, что такие кольца могут участвовать в регулировании тургора и в частичной компартментализации протопласта в пыльцевых трубках ели. Каллозу в пыльцевых трубках у ели следует рассматривать как ситуативный антистрессовый полисахарид, который не является постоянным компонентом стенки трубки.

Ключевые слова: *Picea abies* × *P. obovata*, амилопласты, ель, каллоза, пыльцевые трубки, тургор, целлюлоза

DOI: 10.31857/S0015330324060146, EDN: LVXCJL

ВВЕДЕНИЕ

Цитологическим и физиолого-биохимическим аспектам роста и развития пыльцевых трубок голосеменных растений в последнее время стало уделяться все большее внимание. Результаты этих исследований обобщены в ряде обзоров [1, 2]. Цитоплазматическая организация пыльцевых трубок голосеменных существенно отличается от организации пыльцевых трубок покрытосеменных, за исключением распределения секреторных пузырьков и гладкого эндоплазматического ретикулума, что связано с различиями в скорости их роста и обусловлено особенностями строения стенок пыльцевых трубок голосеменных растений [3].

Пыльцевые трубки голосеменных четко разделяются на две зоны. Одна (тело трубки) занимает почти весь объем трубки от ее проксимальной части и почти до самого кончика, и включает в себя функциональные ядра развивающегося мужского гаметофита, микротрубочки и микрофиламенты актинового цитоскелета, вакуоли, амилопласты и другие органеллы цитоплазмы.

Другая зона — прозрачная (“чистая”) удлиняющегося (растущего) кончика трубки лишена амилопластов, но включает многочисленные пузырьки Гольджи, которые мигрируют к внутренней поверхности мембраны, где накапливаются в форме полукольца или полумесяца, и сливаются с плазматической мембраной, обеспечивая рост кончика пыльцевой трубки [4].

Прорастание пыльцы и, особенно рост пыльцевых трубок, у голосеменных сильно зависят от интактного актинового цитоскелета, обеспечивающего направленное струящееся движение цитоплазмы [5, 6], представляющее собой регулярный фонтанообразный рисунок, при этом органеллы в теле трубки движутся в сторону кончика по ее центру, а обратно — вдоль кортекса клетки [7].

У покрытосеменных стенка кончика почти полностью состоит из этерифицированного пектина. В субапикальной области пектиновая матрица подвергается деэтерификации, становясь более жесткой, в нее также встраивается небольшое количество микрофибрилл целлюлозы.

Непосредственно за этой областью происходит укрепление первичной стенки за счет синтеза каллозы [8, 9]. Каллозный слой составляет основную часть объема стенки у большинства покрытосеменных растений [10]. Тонкая, наружная затвердевшая первичная пекто-целлюлозная и толстая, внутренняя вторичная каллозная стенки поддерживают тургор, предотвращая выпячивание трубки и направляя ее рост [11, 12]. Отложение каллозы в цитоплазме в виде отдельных зерен приводит к образованию каллозных пробок в пыльцевых трубках покрытосеменных растений. Количество и форма таких пробок зависят от способа их образования, присущего каждому виду [13]. Каллозные пробки блокируют цитоплазматическую связь между кончиком и дистальной областью трубки. В результате такого разделения весь энергетический потенциал роста сосредоточен в кончике трубки [14]. Каллозные пробки препятствуют обратному оттоку содержимого пыльцевой трубки, способствуя поддержанию постоянного тургорного давления и, тем самым, предотвращая разрывы стенки трубки [15, 16]. Каллозные пробки образуются в пыльцевых трубках только у покрытосеменных растений с более высокой энергией роста трубок. У голосеменных растений таких отложений в пыльцевых трубках не выявлено [17].

У голосеменных стенка трубки сохраняет первичное строение в течение всего ее роста. Исследования компонентного состава стенок пыльцевых трубок у 14 видов голосеменных из 8 родов и 6 семейств общеизвестными цитохимическими и иммунохимическими методами с использованием моноклональных антител к полисахаридам и арабиногалактановым белкам (AGPs) показало, что у всех изученных видов интина пыльцевых зерен и стенки трубок содержали AGPs и целлюлозу. В стенках пыльцевых трубок видов из сем. Podocarpaceae, Pinaceae, Taxodiaceae и Cupressaceae пектины присутствовали лишь в малом количестве [18]. У ели (*Picea meyerii*) и сосны (*Pinus sylvestris*) этерифицированные пектины локализованы в области кончика пыльцевых трубок. Деэтерифицированные пектины локализованы вдоль всей стенки пыльцевой трубки ели, за исключением кончика. Целлюлоза распределена по всей стенке трубки, включая кончик, однако плотность целлюлозных микрофибрилл в кончике трубки у *Pinus sylvestris* была значительно меньше по сравнению с остальной частью трубки, что указывает на постепенную трансформацию стенки трубки [3, 19]. Целлюлоза является, по-видимому, основным компонентом стенок пыльцевых трубок у голосеменных растений.

У большинства голосеменных растений каллоза не выявляется, или выявляется слабо при

окрашивании пыльцевых трубок анилиновым синим [1]. Однако у *Pinus sylvestris* каллоза была обнаружена в кончиках и дистальной области пыльцевых трубок, но утрачивалась при дальнейшем росте трубок [3]. Каллоза была обнаружена на стенках пыльцевых трубок у *Podocarpus nagi* и *Chamaecyparis obtusa* [18], а также у *Cupressus arizonica* [20]. Принято считать, что в пыльцевых трубках голосеменных растений каллоза является резервным антистрессовым полисахаридом [21]. Однако недавние исследования показали, что каллоза — это многофункциональный полимер, участвующий во многих фундаментальных биологических процессах развития растений [22].

Пыльцевые трубки у ели характеризуются довольно высокой энергией роста и относительно короткой продолжительностью жизни. Это накладывает отпечаток на особенности их физиологического развития, касающихся, прежде всего, синтеза полисахаридов и локализации их в стенке трубки. Изучение ряда этих особенностей и явилось основной целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проращивание пыльцы. Для исследований использовали свежесобранную пыльцу интрогрессивного гибрида ели европейской и сибирской (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.), естественно произрастающего на северо-западе европейского континента [23]. Пыльцу проращивали в водной суспензии, содержащей 1.0 mM KNO₃, 2.0 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 0.5 mM H₃BO₃, 5.0 mM CaCl₂, 2.0 mM MgCl₂. Суспензию культивировали в пробирках Eppendorf объемом 2.0 мл на мульти-ротаторе Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия) при скорости вращения 5 об./мин в течение 12–96 ч (в зависимости от цели исследования) при комнатной температуре. Для проращивания пыльцы на агаризованной среде использовали агар бактериологического класса (VWR International LLC, США). Пыльцу проращивали в чашках Петри на 1% агаре с добавлением 5% сахарозы (w/v) в течение 12–124 ч в термостате при температуре 26.5°C. Пророщенную пыльцу смывали с поверхности субстрата водой и для удаления сахарозы трижды промывали в дистиллированной воде. Полученные водные суспензии проросшей пыльцы, отмытые от излишков сахарозы, сразу же использовали для дальнейшей работы. Каждый раз для исследований готовили свежие образцы.

Световая микроскопия (проходящий свет). Для выявления различных цитологических структур в пыльцевых трубках ели использовали водные растворы бромкрезолового пурпурного, эриохрома черного, метилового зеленого — пиронина G, сафранина, Кумасси R-250. Концен-

трации красящих растворов и время окрашивания подбирали эмпирически. Амилопласты в пыльцевых трубках у ели контрастировали в 1% водном растворе йода с йодистым калием (реактив J₂KJ). Результаты окрашивания визуализировали на прямом микроскопе Axio Scope A1 (Zeiss, Германия). Для изучения динамики роста пыльцевых трубок ели *in vitro* через каждые 4 ч с момента посева пыльцы на агаровый субстрат и до окончания эксперимента проводили измерения длины пыльцевых трубок. В каждой повторности измеряли длину у 20 случайно взятых пыльцевых трубок. Измерения длины пыльцевых трубок и редактирование изображений во всех случаях проводили на прямом микроскопе Axio Scope A1 с помощью программы AxioVision Rel. 4.8. Для изучения влияния кислотности среды на прорастание пыльцы и энергию роста пыльцевых трубок ели было использовано четыре индивидуальных образца пыльцы с высокими исходными показателями жизнеспособности. Показатель pH среды регулировали введением в ее состав 1.0 N HCl (увеличение кислотности), или 0.1 M Трис (снижение кислотности). При изучении состава сахаров на прорастание пыльцы и энергию роста пыльцевых трубок ели концентрация каждого из сахаров (сахарозы, глюкозы, раффинозы, фруктозы, мальтозы, маннозы, галактозы или целлобиозы) в агаровой среде составляла 5%. Во всех случаях для этих опытов использовали одни и те же индивидуальные образцы пыльцы (всего 10 образцов). Проросшей считали пыльцу, если длина пыльцевой трубки более чем в два раза превышала высоту тела пыльцевого зерна. Процент проросшей пыльцы в каждом образце определяли по 400 случайно взятым пыльцевым зернам. Среднюю длину пыльцевых трубок в каждом образце рассчитывали на основе измерений длины у 20 случайно взятых трубок.

Флуоресцентная микроскопия. Для выявления целлюлозы в пыльце и пыльцевых трубках их водные препараты окрашивали калькофлуором (Calcofluor White Stain, Biotium, США) в темноте. К водной суспензии исследуемого образца добавляли равный объем 5 мМ водного раствора красителя. Продолжительность окрашивания составляла 10–15 минут. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1 Led (Альтами, Россия) и фотографировали в УФ-режиме (светофильтр UV 330–400 нм).

Для выявления каллозы в пыльцевых трубках препараты проросшей пыльцы окрашивали водными растворами анилинового синего. Конечная концентрация красителя в водной суспензии исследуемого образца составляла 0.1%. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали и фотографировали на флуорес-

центном микроскопе Altami Lum 1 Led в УФ-режиме (светофильтр UV 330–400 нм).

Гидролитическое расщепление каллозы на поверхности пыльцевых трубок проводили с использованием ламинариназы (1,3-β-D-глюконаза, КФ 3.2.1.39) – полиспецифического фермента, который катализирует реакцию гидролиза [24]. К суспензионной культуре проросшей пыльцы добавляли небольшое количество водного раствора ламинариназы и равный объем 0.2% водного раствора анилинового синего. Каплю полученной смеси наносили на предметное стекло, сверху накрывали покровным стеклом. Процесс гидролитического расщепления каллозы на поверхности пыльцевых трубок контролировали визуально через каждые 10 мин.

Для контрастирования ядерных структур использовали флуоресцентные красители DAPI [25] и SYPRO Rubi Protein Gel Stain (Sigma-Aldrich). Пыльцевые трубки инкубировали в растворе 300 нМ DAPI в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 30 мин в темноте и после 3-кратной промывки в фосфатном буфере просматривали и фотографировали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1LED (светофильтр UV, 330–400 нм). Окрашивание SYPRO Rubi Protein Gel Stain проводили путем добавления к водной суспензии проросшей пыльцы равного объема продажного красителя, окрашивание производили в темноте в течение 1.5–2 ч. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали и фотографировали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1 LED (светофильтр B, 420–485 нм).

FT-IR-спектроскопия. Сканирование лиофильно высушенных пыльцевых трубок ели, отмытых от сахарозы, в инфракрасной области спектра по градиенту длины трубки проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре Vertex 70v (Bruker, Германия) с помощью инфракрасного микроскопа Hyperion 3000 (Bruker, Германия). Использовали точечный МСТ детектор, позволяющий снимать инфракрасные спектры в точке размером 1 мкм. Условия записи спектров: фон – алюминиевая фольга (без напыления), режим записи спектров – отражение, объектив 36 × IR. В каждой трубке сканировали по 40 равноудаленных точек: первая точка – максимально близко к дистальной апертуре пыльцевого зерна, не входя в тело зерна, последняя – максимально близко к кончику трубки, не выходя из него. Число сканирований в каждой точке позиционирования – 1024, разрешение – 0.0004 мкм. В качестве внутреннего стандарта выбрана полоса поглощения 2920 см.

Пиролизная газовая хроматография – масс-спектрометрия. Анализ проводили на системе газовой хроматографии – масс-спектрометре QP-2010 Plus (Shimadzu, Япония), оснащенном

пиролизером EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония) и криоуловителем с жидким азотом. Образцы проросшей пыльцы были приготовлены аналогично методу ИК-спектроскопии. Образцы пыльцы использовали для анализа без дополнительной пробоподготовки. Образцы проросшей пыльцы или пыльцевых зерен (1.8–2.7 мг) помещали в микротигли из нержавеющей стали и подвергали термическому разложению в атмосфере гелия путем нагревания от 50 до 600°C со скоростью 50°C/мин. Хроматографическое разделение продуктов пиролиза проводили на капиллярной колонке HP-5ms (Agilent, США) размером 30 × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа-носителя использовался гелий высокой чистоты со скоростью потока 1 мл/мин. Температурный режим колонки был запрограммирован следующим образом: 40°C выдерживали в течение 2 мин; затем линейный подъем на 3°C/мин до 320°C в течение 5 мин. Масс-спектрометрическое детектирование проводили с электронной ионизацией (70 эВ) в режиме сканирования в диапазоне 35–600 кДа при скорости сканирования 2 кДа/с. Обнаруженные соединения идентифицировали с использованием библиотеки NIST/Wiley 2011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У ели, как и у большинства других видов сем. Pinaceae, прорастание микроспоры в микрогаметофит начинается еще внутри микроспорангия. В результате трех последовательных делений, сначала ядра микроспоры, а затем антеридиальной клетки образуется 4-клеточный (реже 5-клеточный) мужской гаметофит, включающий обычно две рудиментарные проталлиальные, генеративную и сифоногенную (вегетативную) клетки. Первая проталлиальная клетка довольно быстро дегенерирует, превращаясь в пикноту, вторая приобретает линзовидную форму и может сохраняться еще некоторое время. Дальнейшее развитие мужского гаметофита у ели происходит уже после раскрытия микроспорангия и попадания пыльцевого зерна на нуцеллус семязачатка, где пыльца прорастает в пыльцевую трубку. Ядро сифоногенной клетки перемещается в пыльцевую трубку, постоянно двигаясь в сторону ее растущего кончика. В результате деления генеративной клетки образуются сперматогенная (базальная, спермиогенная) и стерильная (стебельковая) клетки. Сперматогенная клетка делится, образуя два спермия, один из которых оплодотворяет яйцеклетку. Оплодотворение у ели происходит спустя приблизительно месяц после опыления [26, 27].

Источником углеводов, необходимых для построения тела пыльцевой трубки, главным об-

разом ее стенок, служат водорастворимые сахара. Традиционно для проращивания пыльцы на искусственных средах используют сахарозу [28, 29]. Пыльца у ели может прорасти и на дистиллированной воде, используя собственные запасы сахаров, но пыльцевые трубки в этом случае растут гораздо медленнее и в них образуется значительно меньше амилопластов. Показатели жизнеспособности пыльцы, пророщенной на средах, содержащих сахарозу и глюкозу, были достоверно выше по критерию t_{st} по сравнению с другими вариантами опыта. На средах, содержащих целлобиозу, процент проросшей пыльцы был относительно невысок, но при этом формировались довольно длинные пыльцевые трубки. В целом, пыльцевые трубки у ели лучше росли на средах, содержащих глюкозу (табл. 1).

Таблица 1. Влияние состава сахаров на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок ели *in vitro*

Углеводный компонент среды	Жизнеспособность пыльцы ($X \pm m_x$), %	Длина пыльцевой трубки ($X \pm m_x$), мкм
Сахароза	75.5 ± 11.7	283.4 ± 30.5
Глюкоза	93.4 ± 9.5	416.7 ± 34.7
Раффиноза	1.1 ± 0.8	122.4 ± 25.4
Фруктоза	33.4 ± 15.5	254.5 ± 29.6
Мальтоза	13.5 ± 7.0	244.0 ± 28.0
Манноза	0	—
Галактоза	6.0 ± 3.2	105.3 ± 15.5
Целлобиоза	18.4 ± 7.3	410.5 ± 33.3

Однако лучшие результаты были получены при проращивании пыльцы ели на средах, содержащих сахарозу с добавлением небольшого количества (не более 0.001 мг/мл) борной кислоты. Добавление бора в среду в столь малых концентрациях не влияло на pH среды. Стимулирующее влияние бора на прорастание пыльцы впервые обнаружил Т. Schmucher [30]. Позднее это было подтверждено многими исследованиями [31–34].

Для проращивания пыльцы ели наиболее подходят слабо кислые или близкие к нейтральным питательные среды. Пыльца ели почти одинаково хорошо проросла на агаровых средах в диапазоне pH 5.8–8.2. Показатель энергии роста пыльцевых трубок, о котором косвенно можно судить по их длине, был более чувствителен к изменению pH среды, по сравнению со способностью пыльцы к прорастанию (рис. 1).

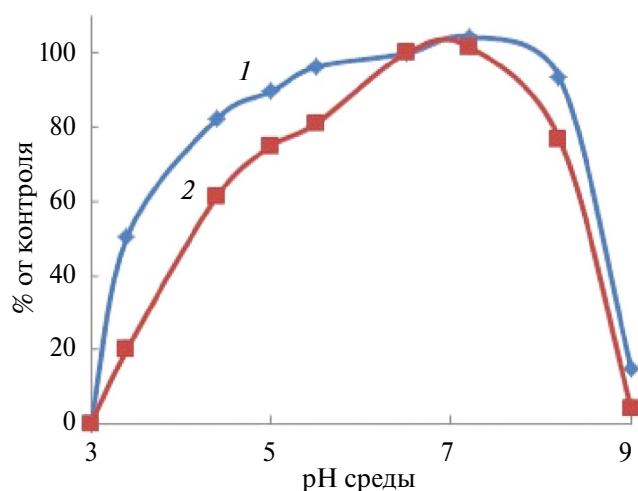


Рис. 1. Влияние pH среды на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок ели *in vitro*: 1 – жизнеспособность пыльцы; 2 – средняя длина пыльцевой трубки.

В течение первых 12–14 ч после посева пыльцы ели на питательную среду происходила гидратация пыльцевых зерен. В это время пыльцевые зерна выделяют АТФ, необходимую для инициации прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок во внеклеточный матрикс [35, 36]. В это же время в пыльцевых зернах происходит интенсивный синтез целлюлозы. При окрашивании калькофлуором пыльцы ели, гидратированной в течение 2–3 ч в водной суспензии, проявлялась яркая флуоресценция в виде узкой полосы в меридиональной плоскости по обе стороны внутренней поверхности оболочки пыльцевого зерна (в интине), перпендикулярно дистальной борозде прорастания. Это полузамкнутое кольцо имело разрыв в проксимальной зоне пыльцевого зерна (рис. 2а, б). В наших опытах при окрашивании гидратированных пыльцевых зерен ели анилиновым синим флуорес-

ценция в них отсутствовала. При окрашивании калькофлуором не гидратированной пыльцы флуоресценция также не наблюдалась (рис. 2г).

После прорастания пыльцевого зерна в трубку флуоресцирующая полоска быстро исчезала. Вновь синтезированная в процессе гидратации целлюлоза перед прорастанием пыльцы скапливалась вблизи дистальной борозды, а затем, вероятно, перемещалась в пыльцевую трубку, участвуя в построении ее стенки. В самом кончике трубки целлюлоза, по-видимому, отсутствовала, или ее количество было очень мало (рис. 3а).

При окрашивании калькофлуором на поверхности пыльцевых трубок ели в УФ свете проявлялось замкнутое поперечное кольцо целлюлозы (рис. 3а, в, д).

Максимальная скорость роста (примерно 12 мкм/ч) пыльцевой трубки у ели наблюдалась в течение 10–15 ч (спустя 30–45 ч после посева пыльцы). Затем скорость роста трубок начинала постепенно замедляться. Примерно через 110–112 ч после посева рост трубок визуально не наблюдался. Относительно высокая скорость роста обуславливает некоторые физиологические особенности развития пыльцевых трубок у ели.

Начало прорастания пыльцевого зерна ели в пыльцевую трубку показано на рис. 4а. При проращивании пыльцы ели на средах, содержащих сахарозу, формировались длинные массивные трубки, часто с булавовидным или шаровидным утолщением (вздутием) кончика (рис. 4б). Длина пыльцевых трубок составляла 430–480 мкм, иногда она могла достигать 1000–1200 мкм и более (рис. 4в, г).

При проращивании пыльцы ели *in vitro* наблюдались случаи как простого дихотомического ветвления, так и биполярный рост пыльцевых трубок [37, 38]. Примеры ветвления, биполярного роста и тератологии пыльцевых трубок у ели показаны на рис. 4д, е, ж, з, и. При проращивании пыльцы на сахаросодержащей среде

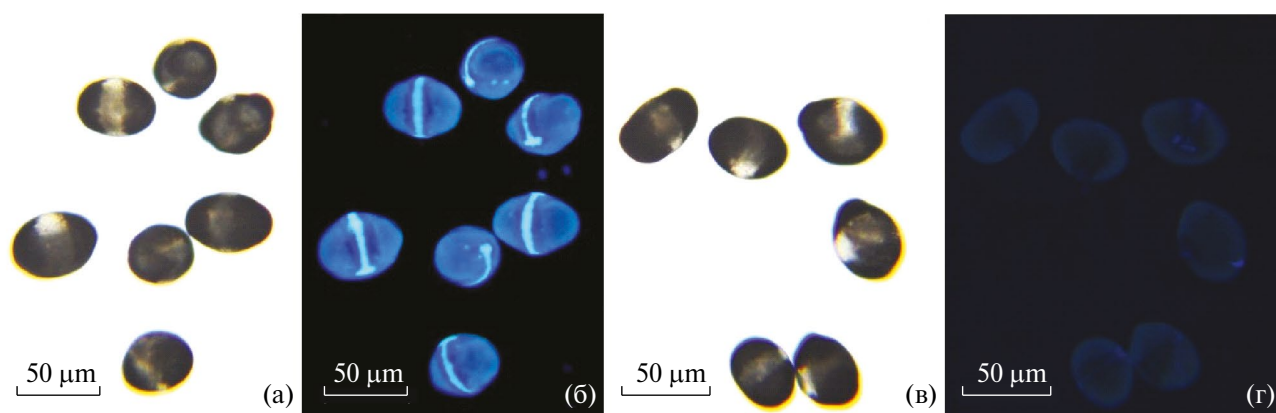


Рис. 2. Характер флуоресценции пыльцевых зерен ели при окрашивании калькофлуором: а, б – пыльца после 3-часовой гидратации в водной суспензии; в, г – не гидратированная пыльца; а, в – проходящий белый свет; б, г – флуоресценция в УФ-свете.

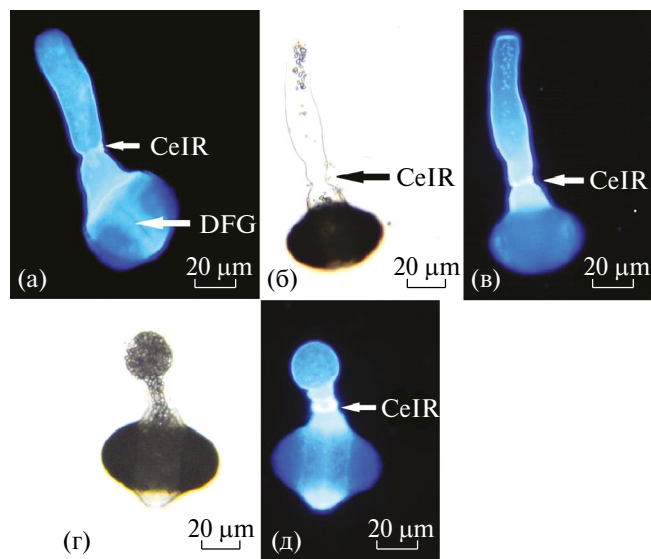


Рис. 3. Пыльцевые трубки ели после прорастивания в течение 24 ч на агаровой среде с 5% сахарозы, окрашенные калькофлуором: б-в, г-д – парные рисунки; б, г – проходящий белый свет, а, в, д – флуоресценция в УФ свете. DFG – дистальная борозда прорастания, CeIR – кольцо целлюлозы.

избыток гидролизованной глюкозы депонируется в форме крахмала в амилопластах, которые могут занимать значительный объем пыльцевой трубки (кроме самого кончика).

Пыльцевые зерна у ели *in vivo* прорастают в трубки на 2–3 день после попадания на нуцеллус семязачатка. Период между опылением и оплодотворением у нее составляет около 30 дней. Образование спермиев происходит непосредственно перед оплодотворением. При культивировании *in vitro* пыльцевые трубки развиваются относительно автономно и растут значительно быстрее, поэтому у ели можно наблюдать заключительные стадии развития мужского гаметофита, включая образование спермиев [39].

В растущих пыльцевых трубках происходит активный синтез и накопление крахмала, являющегося источником глюкозы, необходимой для последующего биосинтеза полисахаридов, в основном и формирующих стенку пыльцевой трубки у голосеменных. В образцах проросшей пыльцы ели значительно больше, по сравнению

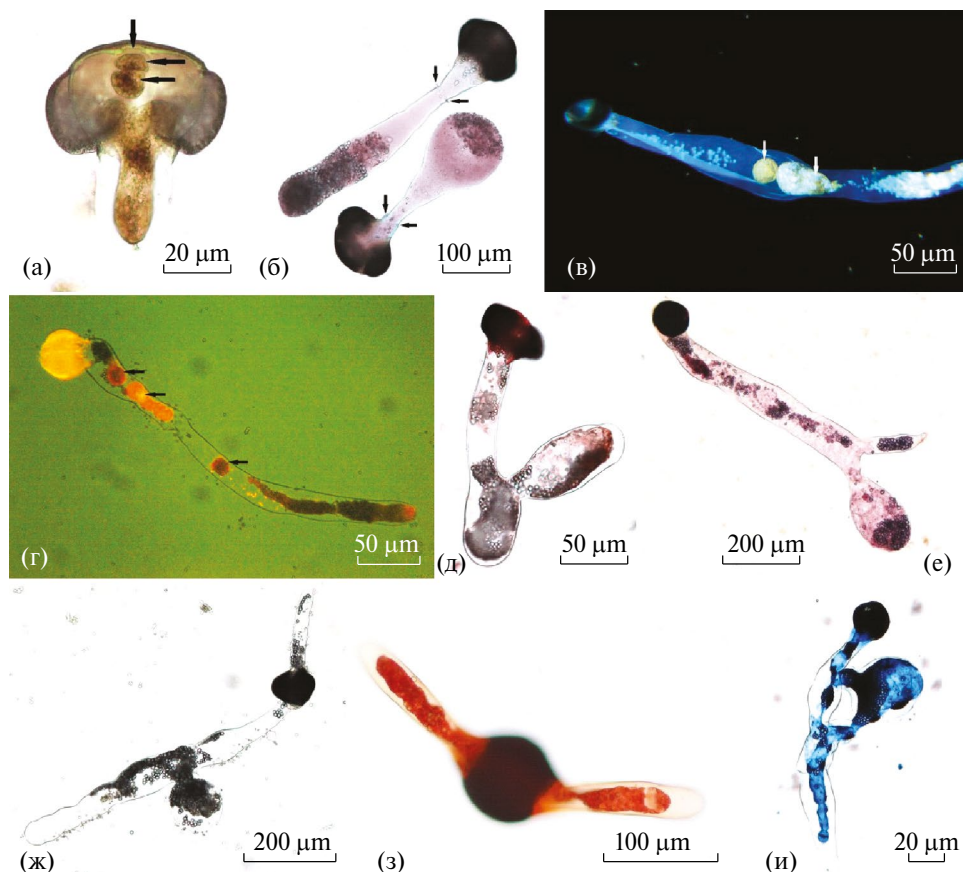


Рис. 4. Пыльцевые трубки ели: а – прорастивание в течение 24 ч; б, д, е, ж, з, и – прорастивание в течение 72 ч; в, г – прорастивание в течение 96 ч. Окрашивание: а – бромкрезоловым пурпуром; б – эриохромом черным (стрелками показаны границы внешнего кольца целлюлозы); в – DAPI; г – SYPRO Rubi Protein Gel Stain; д, е – метиловым зеленым – пиронином G; ж – не окрашенные; з – окрашивание сафранином; и – Кумасси R-250); д-ж – ветвление; ж, з – биполярный рост; ж, и – тератология. 2-nd PC – вторая проталлиальная клетка, GCN – ядро генеративной клетки, VCN – ядро вегетативной клетки, TCN – ядро клетки трубки, SpCN – ядро спермиогенной клетки, StCN – стебельковая клетка с ядром и цитоплазмой.

с не пророщенной пылью, содержалось полисахаридов, ароматических углеводов, танинов, а также несколько увеличивалось содержание нуклеиновых кислот и белков. В проросшей пыльце ели значительно меньше, по сравнению с не проросшей, содержалось алифатических углеводов, лигнина, фенолов, жиров и восков. Все перечисленные во втором случае компоненты входят в состав экины пыльцевых зерен, которые сохраняются в образцах с проросшей пылью. Следует отметить значительное уменьшение содержания стероидов (кампестерина и ситостерина) в пыльцевых трубках по сравнению с не проросшей пылью (табл. 2).

Содержание белков, аминокислот, РНК, ДНК, липидов и полисахаридов по градиенту длины пыльцевых трубок у ели довольно лабильно, постепенно возрастало по направлению к растущему кончику, и стабилизировалось по достижении примерно половины их максимальной длины. Общее содержание углеводов в пыльцевых трубках у ели по градиенту длины почти не менялось (рис. 5).

У ели уже на начальной стадии роста пыльцевой трубки вновь синтезированная каллоза начинала скапливаться сначала в дистальной части, а затем и в самом кончике трубки (рис. 6а, б, в).

Во время роста трубки часть каллозы перемещалась на внешнюю поверхность стенки трубки, вероятнее всего, через ее кончик, но, возможно,

также из проксимальной зоны трубки или из наружного слоя интины пыльцевого зерна. Не исключено, что донором каллозы в последнем случае могли служить тельца Убиша, которые содержат значительное количество полисахаридов и, вероятно, контактируют с поверхностью интины пыльцевых зерен, и активно участвуют в их быстрой гидратации [40]. Скорее всего, барьером, вокруг которого скапливалась каллоза, служили сформировавшиеся ранее на поверхности пыльцевых трубок кольца целлюлозы (рис. 3). Не исключено, что микрофибриллы целлюлозы в этих локациях дезориентированы (рис. 4б). В результате на внешней поверхности трубки формировалось узкое замкнутое кольцо, состоящее, по-видимому, в основном из каллозы. Этот процесс мог повторяться несколько раз, и на поверхности трубки могло образовываться до 2–3, редко более, таких колец. По мере роста трубки эти кольца сохраняли свое исходное положение, а ее растущий кончик все более отдалялся от них (рис. 6б, в, г, е). Следует отметить, что кольца каллозы формировались на поверхности пыльцевых трубок, выращенных как на средах, содержащих сахарозу, так и без нее.

Когда к суспензионной культуре пророщенной пыльцы добавляли водный раствор ламинариназы, которая катализирует гидролитическое расщепление каллозы, эти кольца довольно быстро элиминировали (рис. 7).

Таблица 2. Компонентный состав пыльцевых зерен и проросшей пыльцы ели (% от общего количества идентифицированных веществ)

Компоненты	Пыльцевые зерна	Проросшая пыльца
Углеводы	15.7	68.1
Алифатические углеводороды	15.5	6.3
Ароматические углеводороды	0	2.0
Лигнин	8.0	1.0
Танины	1.6	7.5
Фенолы	26.5	5.2
Жиры и жирные кислоты	5.0	1.2
Воска	16.0	4.7
ДНК и белки	1.5	2.2
Стероиды	10.2	1.8

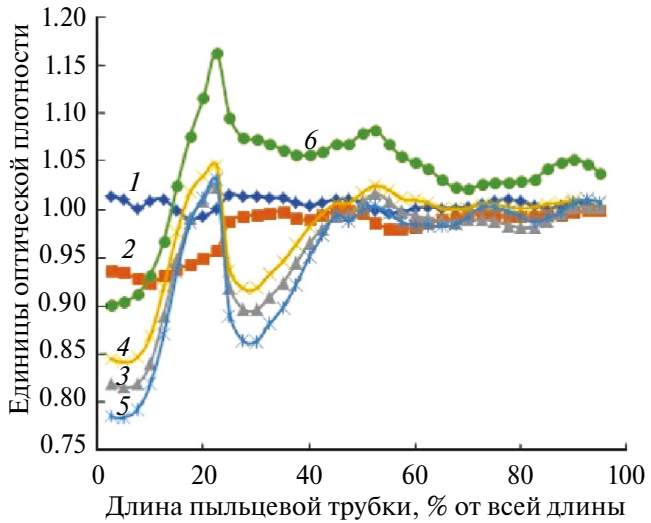


Рис. 5. Компонентный состав пыльцевой трубки ели по градиенту длины по результатам FT-IR спектроскопии (пример). 1 — длина волны 3358 — О-Н группы: углеводы; 2 — 3030 — С-Н связи: ароматические кольца; 3 — 1700 — С=О связи: карбонильные и карбоксильные группы (белки, РНК, ДНК, липиды); 4 — 1632 — пик связанной воды; 5 — 1512 — аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан) и соответствующие белки и, возможно, ароматические углеводороды (фенол); 6 — 1020 — С-О-С связи: полисахариды.

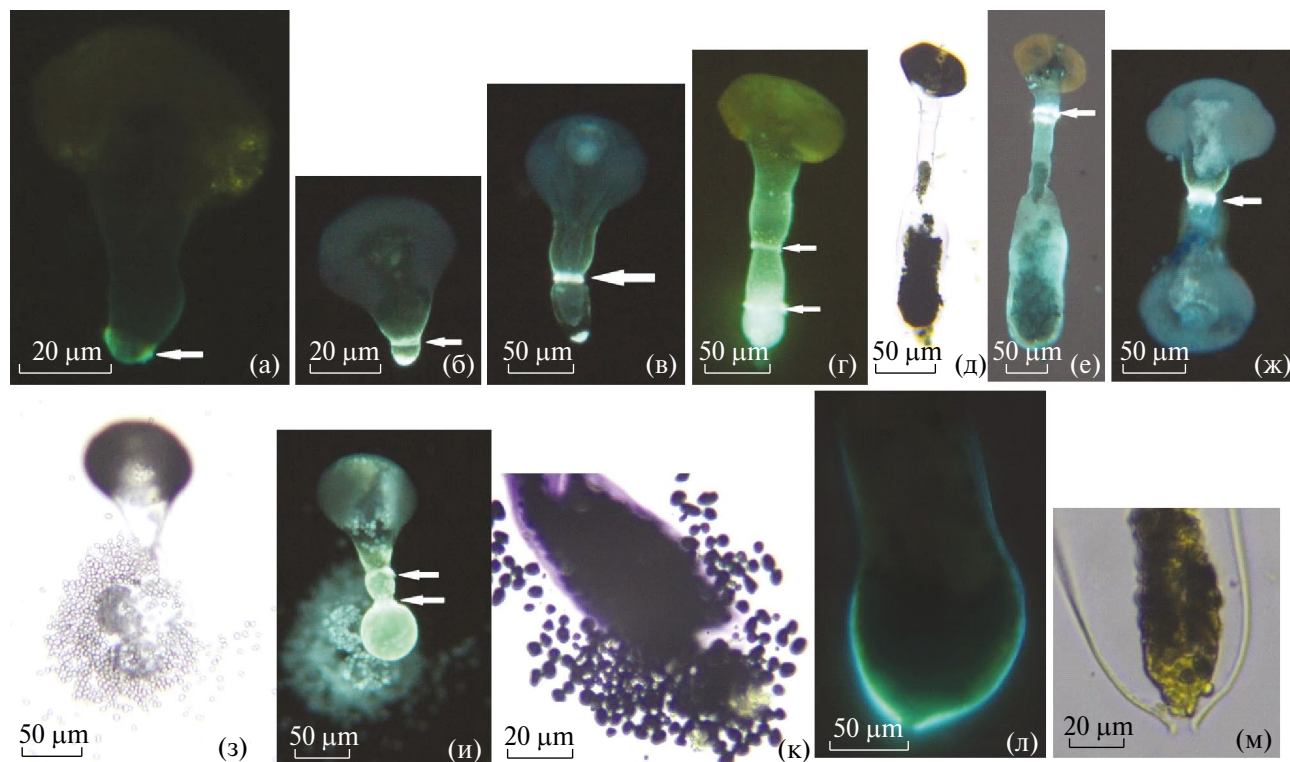


Рис. 6. Локализация каллозы в растущих пыльцевых трубках ели (а, б, в, г, д, е), характер разрушения наружных мембран, стенок и кончиков трубок при избыточном тургорном давлении (ж, з, и, к), расхождение боковых стенок на кончиках трубок (л, м). Окрашивание: а, б, в, г, ж, з, и, л – анилиновым синим; д, е, к – анилиновым синим – J_2KJ ; м – J_2KJ . Флуоресценция в ультрафиолетовом (а, б, в, г, е, ж, и, л) и проходящем белом свете (д, з, к, м), д-е, з-и – парные рисунки (левые – проходящий белый свет, правые – флуоресценция). Стрелками показана локализация колец каллозы.

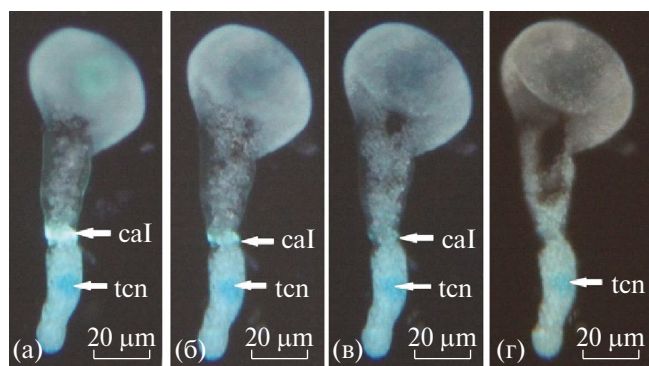


Рис. 7. Разрушение наружного кольца каллозы под воздействием ламинариназы в течение: а – 0 мин; б – 10 мин; в – 20 мин; г – 30 мин. cal – каллоза, tcn – ядро клетки трубки.

Показанные на рис. 6 кольца на внешней поверхности пыльцевых трубок ели, по-видимому, обладают довольно высокой механической прочностью и, плотно сдавливая тело трубки, создают избыточное тургорное давление. Сама по себе каллоза, имея гелеобразную консистенцию, не обладает этими свойствами. По-видимому, такая жесткость обеспечивается за счет целлюлозных микрофибрилл, встроенных в эти кольца.

Кольца на поверхности пыльцевых трубок у ели можно рассматривать как своеобразные клапаны, которые повышают тургор, снижая скорость всасывания воды через растущий кончик. Кроме того, они, в определенной степени, способствуют компартментализации цитоплазмы, затрудняя связь дистальной части протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки, с его проксимальной частью (рис. бд, е). Повышенный тургор в дистальной зоне трубки способствовал разрывам плазмалеммы в этой зоне (рис. бж), кончиков и стенок трубок у ели (рис. бз, и), сопровождающихся взрывным высвобождением избыточного количества накопленных амилопластов (рис. бз, и, к). Такие разрывы являются распространенным явлением, но они редко приводят к фатальному исходу и, в большинстве случаев, легко устраняются как с помощью уже накопленной, так и вновь синтезируемой каллозы. Следует отметить, что тургор в пыльцевых трубках у ели может, по-видимому, регулироваться и иными путями (рис. бл, м). Кольца каллозы на поверхности пыльцевых трубок ели недолговечны, и к концу прорастивания они обычно исчезали.

Локализация каллозы в пыльцевых трубках у ели сильно варьировала. Следовательно, кал-

лозу в пыльцевых трубках у этого вида следует рассматривать как ситуативный антистрессовый полисахарид, который не является постоянным компонентом стенки трубки.

Исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федеральному исследовательскому центру комплексного изучения Арктики Уральского отделения Российской академии наук (шифр: FUUW-2022-0057, № гос. регистрации: 122011400384-2).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernando D.D., Quinn Ch.R., Brenner E.D., Owens J.N. Male gametophyte development and evolution in extant Gymnosperms // Int. J. Plant Dev. Biol. 2010. V. 4. P. 47.
2. Breygina M., Klimenko E., Schekaleva O. Pollen germination and pollen tube growth in Gymnosperms // Plants. 2021. V. 10. P. 1301.
<https://doi.org/10.3390/plants10071301>
3. Derksen J., Li Y.-Q., Knuiman B., Geurts H. The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes // Protoplasma. 1999. V. 208. P. 26.
<https://doi.org/10.1007/BF01279072>
4. Mollet J.-C., Leroux C., Dardelle F., Lehner A. Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth // Plants. 2013. V. 2. P. 107.
<https://doi.org/10.3390/plants2010107>
5. Justus C.D., Anderhag P., Goins J.L., Lazzaro M.D. Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips // Planta. 2004. V. 219. P. 103.
<https://doi.org/10.1007/s00425-003-1193-2>
6. Chebli Y., Kroeger J., Geitmann A. Transport logistics in pollen tubes // Mol. Plant. 2013. V. 6. P. 1037.
<https://doi.org/10.1093/mp/sst073>
7. Li G.-P., Huang Q.-C., Yang L.-S., Qin G.-Y. In vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pinus thunbergii* // Forest Research. 2007. V. 20. P. 224.
8. Krichevsky A., Kozlovsky S.V., Tian G.W., Chen M.H., Zaltsman A., Citovsky V. How pollen tubes grow // Dev. Biol. 2007. V. 303. P. 405.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.003>
9. Williams J.H., Edwards J.A., Ramsey A.J. Economy, efficiency, and the evolution of pollen tube growth rates // Am. J. Bot. 2016. V. 103. P. 471.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1500264>
10. Schlüpmann H., Bacic A., Read S.M. Uridine-diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 659.
<https://doi.org/10.1104/pp.105.2.659>
11. Ferguson C., Teeri T.T., Siika-aho M., Read S.M., Bacic A. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum* // Planta. 1998. V. 206. P. 452.
<https://doi.org/10.1007/s004250050421>
12. Chebli Y., Kaneda M., Zerkour R., Geitmann A. The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube — spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides // Plant Physiol. 2012. V. 160. P. 1940.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.199729>
13. Mogami N., Miyamoto M., Onozuka M., Nakamura N. Comparison of callose plug structure between dicotyledon and monocotyledon pollen germinated *in vitro* // Grana. 2006. V. 45. P. 249.
<https://doi.org/10.1080/00173130600726687>
14. Nishikawa S., Zinkl G.M., Swanson R.J., Maruyama D., Preuss D. Callose (β -1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // BMC Plant Biol. 2005. V. 5. P. 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-22>
15. Li Y.-Q., Moscatelli A., Cai G., Cresti M. Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants // Int. Rev. Cyt. 1997. P. 133.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61610-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61610-1)
16. Parre E., Geitmann A. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 274.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.050773>
17. Williams J.H. Novelty of the flowering plant pollen tube underlie diversification of a key life history stage // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. V. 105. P. 11259.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0800036105>
18. Yatomi R., Nakamura S., Nakamura N. Immunohistochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of Gymnosperms // Grana. 2002. V. 41. P. 21.
<https://doi.org/10.1080/00173130260045468>
19. Chen T., Wu X., Chen Y., Li X., Huang M., Zheng M., Baluška F., Šamaj J., Lin J. Combined proteomic and cytological analysis of Ca^{2+} -calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 1111.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.127514>
20. Chichiricò G., Spanò L., Torracca G., Tartarini A. Hydration, sporoderm breaking and germination of *Cupressus arizonica* pollen // Plant Biol. 2009. V. 11. P. 359.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00134.x>
21. Pacini E., Franchi G.G., Ripaccioli M. Ripe pollen structure and histochemistry of some Gymnosperms // Plant Syst. Evol. 1999. V. 217. P. 81.
<https://doi.org/10.1007/BF00984923>

22. Parrotta L., Faleri C., Del Casino C., Mareri L., Aloisi I., Guerriero G. Biochemical and cytological interactions between callose synthase and microtubules in the tobacco pollen tube // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. P. 1301. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02860-3>
23. Правдин Л.Ф. Ель европейская и ель сибирская в СССР. М.: Наука, 1975. 200 с.
24. Белик А.А., Зуева А.О. Выделение, свойства и аминокислотные последовательности двух 1,3-β-D-глюконаз брюхоногого моллюска *Lambis* sp. // Вестник ДВО РАН. 2018. № 2. С. 159.
25. Cao Y., Hao R.-Z., Liu M.-Q., An X.-M., Jing Y.-P. Distribution of nuclei and microfilaments during pollen germination in *Populus tomentosa* Carr. // *Afr. J. Agric. Res.* 2012. V. 7. P. 2679.
26. Singh H. Embryology of Gymnosperms. Berl.-Stuttg.: Gerb. Borntraeger, 1978. 304 p.
27. Козубов Г.М., Тренин В.В., Тихова М.А., Кондратьева В.П. Репродуктивные структуры голосеменных (сравнительное описание). Ленинград: Наука, 1982. 104 с.
28. Tushabe D., Rosbakh S. A compendium of *in vitro* germination media for pollen research // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12: 709945.
29. Sede A.R., Wengier D.L., Borassi C., Estevez J.M., Muschietti J.P. Imaging and analysis of the content of callose, pectin, and cellulose in the cell wall of *Arabidopsis* pollen tubes grown *in vitro* // *Pollen and pollen tube biology: methods and protocols* / Ed. A. Geitmann. Publisher: Humana. 2020. P. 242. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0672-8>
30. Schmucher T. Bor als physiologisch entscheidendes element // *Naturwiss.* 1932. № 20. S. 839. <https://doi.org/10.1007/BF01494925>
31. Stanley R.G., Linskens H.F. Pollen (biology, biochemistry, management). Berlin, Heidenberg, N.Y.: Springer-Verlag. 1974. 307 p.
32. Wang Q.L., Lu L.D., Wu X.Q., Li Y.Q., Lin J.X. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* // *Tree Physiol.* 2003. V. 23. P. 345. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.5.345>
33. Korkmaz N., Guneri M. Effect of different boron levels on pollen germination of hicaznar pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivar // *Int. J. Agric. Life Sci.* 2019. V. 3. P. 151.
34. Castillo S.E., Tovar J.C., Shamin A., Gutierrez J., Pearson P., Gehan M.A. A protocol for *Chenopodium quinoa* pollen germination // *Plant Methods.* 2022. V. 18: 65. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00900-3>
35. Zhou J., Fan C., Liu K., Jing Y. Extracellular ATP is involved in the initiation of pollen germination and tube growth in *Picea meyeri* // *Trees.* 2015. V. 29. P. 563. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1135-6>
36. Dutta R., Sahai P., Kenneth R., Robinson K.R. Mechanisms involved in pollen tube growth: a review // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 2021. V. 22. P. 191. <https://ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/7216>
37. Горячкина О.В., Седаева М.И. Морфология и качество пыльцы у видов рода *Picea* (Pinaceae) из коллекции дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН // *Растительный мир Азиатской России.* 2012. № 2(10). С. 27.
38. Breygina M., Maksimov N., Polevova S., Evmenyeva A. Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*) // *Protoplasma.* 2019. V. 256. P. 941. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01333-3>
39. Dawkins M.D., Owens J.N. *In vitro* and *in vivo* pollen hydration, germination, and pollen-tube growth in white spruce, *Picea glauca* (Moench) Voss. // *Int. J. Plant Sci.* 1993. V. 154. P. 506.
40. Surso M.V., Chuhchinb D.G., Khviyuzov S.S., Pokryishkin S.A. Mechanism of pollen germination and pollen tubes growth in common juniper (*Juniperus communis* L.) *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 294. <https://doi.org/10.1134/S1062360420050070>