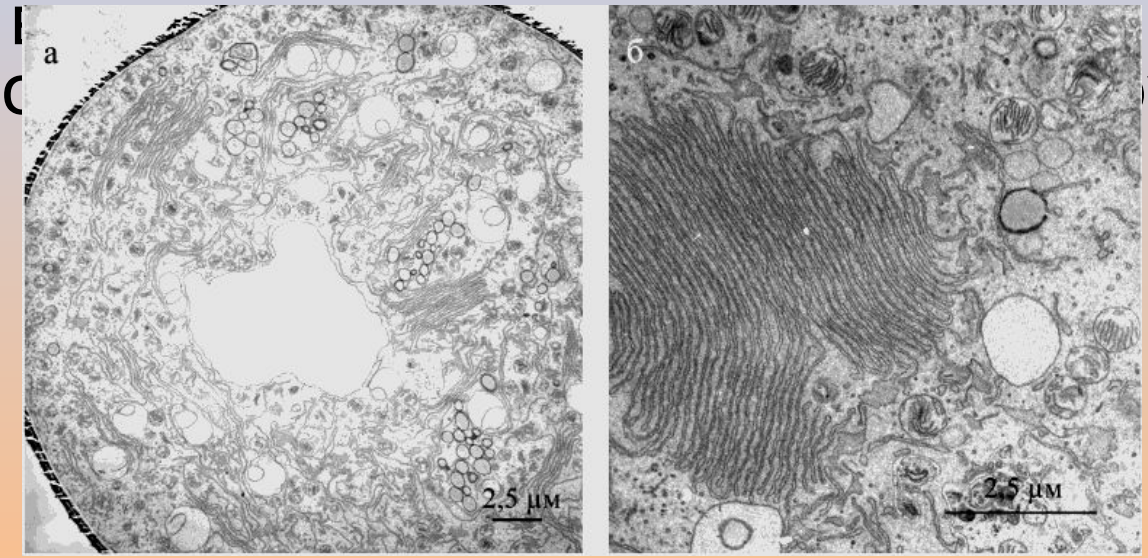
Лекция 3

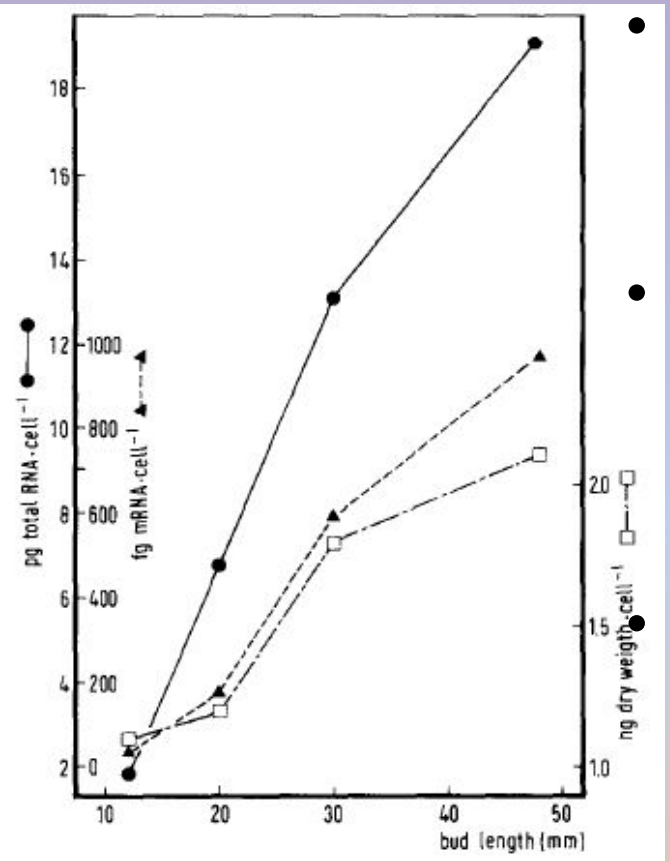
Микрогаметофит. Созревание, покой и прорастание

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 п ближается к физио уется.



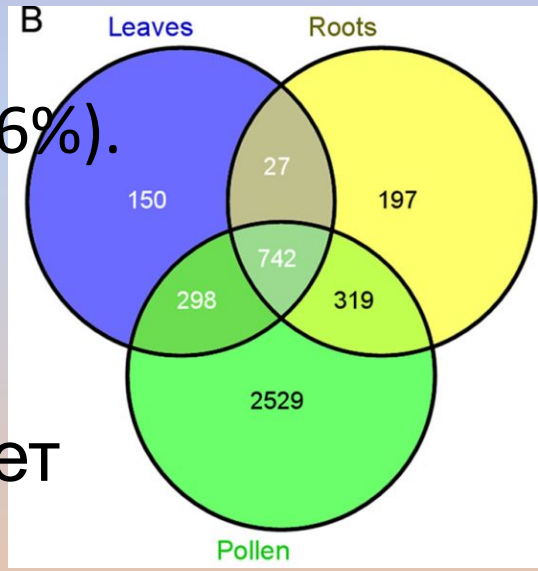
Биосинтетическая активность



- 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 pH сдвигается в кислую сторону.

Специфичные и обычные

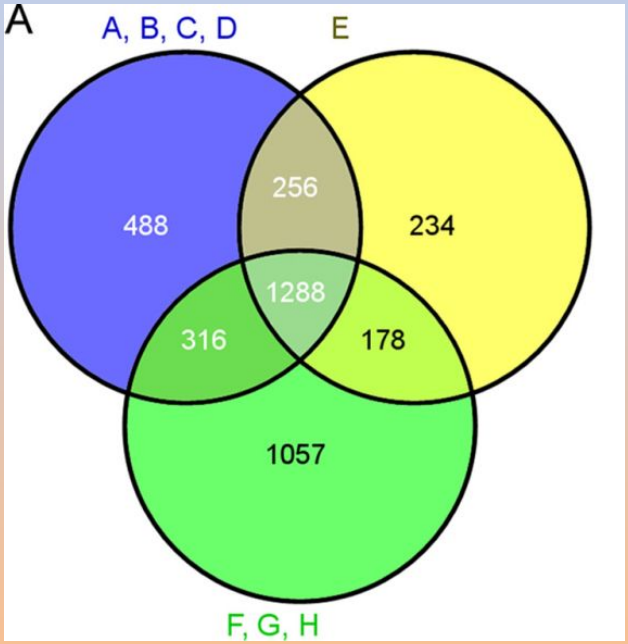
1. Гены «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), которые экспрессируются также в соматических клетках растений.
2. Гены, которые встречаются в других клетках, но в ♂гаметофите экспрессируются более активно (10-26%).
3. Гены специфичные для микроспор/пыльцы (4 -11%). Для сравнения, в соматических тканях 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



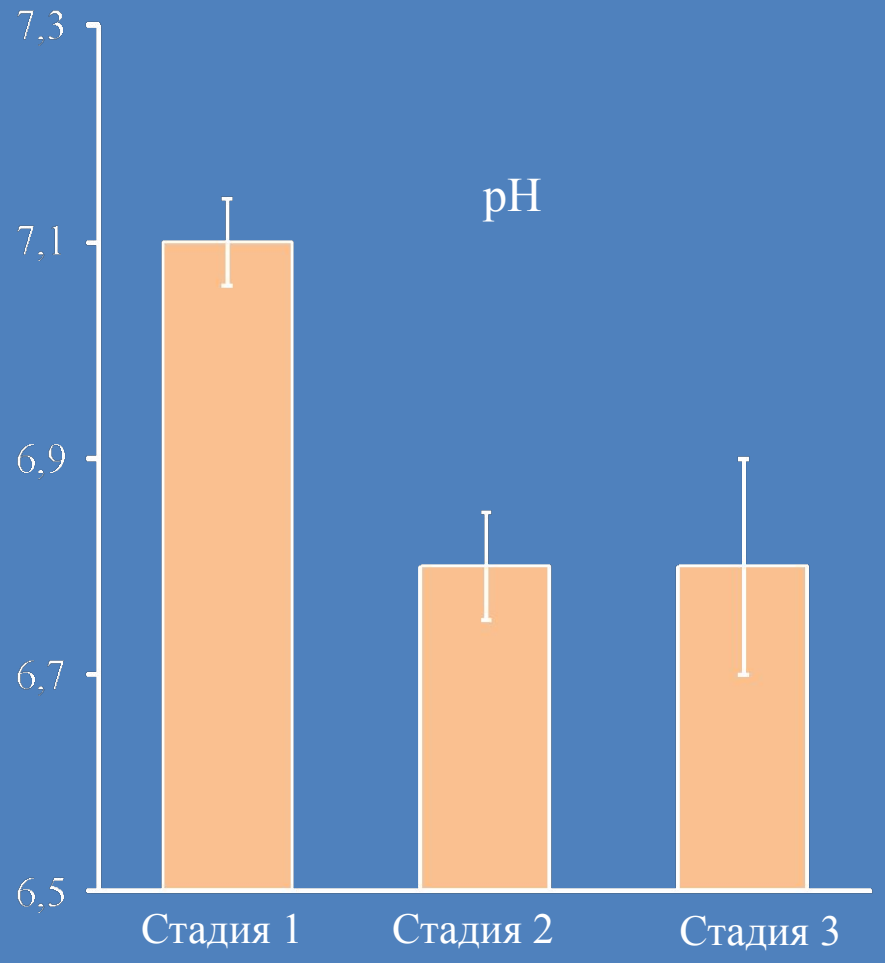
Stage	Label	*n* proteins
Microsporocyte	A	1775 (1741)
Meiosis	B	1596 (1573)
Tetrad	C	1748 (1719)
Microspore	D	1288 (1264)
Polarized microspore	E	2004 (1956)
Binuclear pollen	F	1770 (1740)
Dessicated pollen	G	1604 (1580)
Pollen tubes	H	2526 (2485)
Pollen total		3888 (3817)
Leaves		1217
Roots		1285

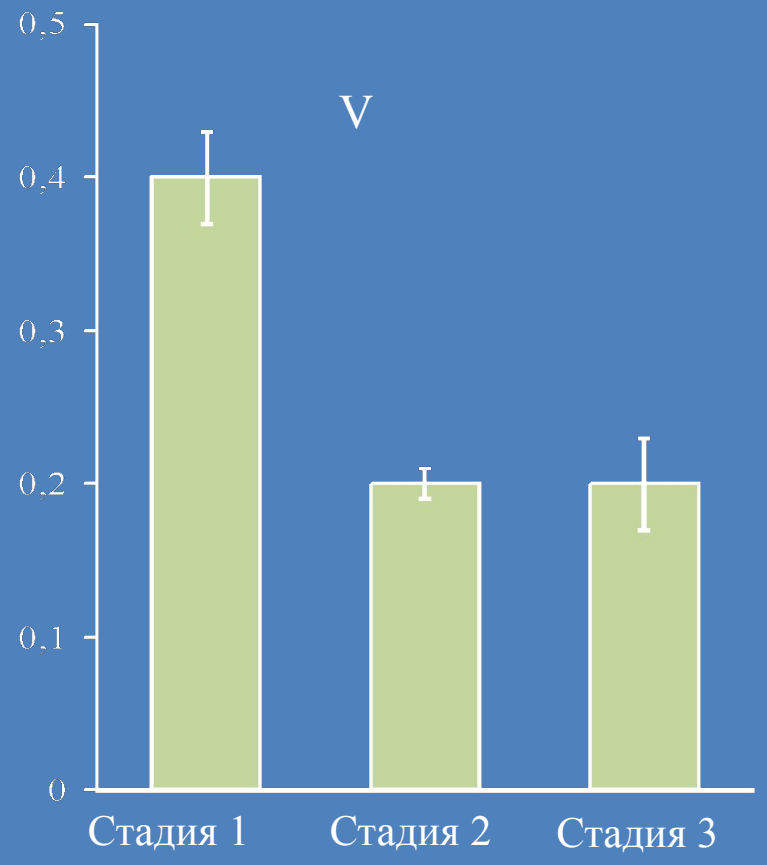
Относительное содержание элементов на разных стадиях гаметофитогенеза

Элементы	Стадии развития		
	Ранние микроспоры	Вакуолизированные микроспоры	Молодые пыльцевые зерна
C	4,9 ± 1,3	2,9 ± 0,4	4,3 ± 0,6
N	2,0 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,3
O	7,2 ± 1,9	7,5 ± 1,3	9,2 ± 1,6
K	**4,0 ± 1,1**	4,1 ± 1,4	**9,3 ± 0,8**
Cl	**0,4 ± 0,2**	0,3 ± 0,1	**1,2 ± 0,1**

Андреюк ДС, Богданов АГ, Матвеева НП, Тукеева МИ, Ермаков ИП. Динамика элементного состава локулы пыльника в процессе гаметофитогенеза у табака. Онтогенез. 1998. Т.29, № 5, с.335-341.

pH и поглощение кислорода в процессе гаметофитогенеза





Матвеева Н.П., Войцех О.О., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Роль H^+-АТФазы и альтернативной оксидазы в регуляции величины внутриклеточного pH на разных стадиях развития мужского гаметофита табака // Онтогенез 2002.т.33 " 6. С. 436-443.

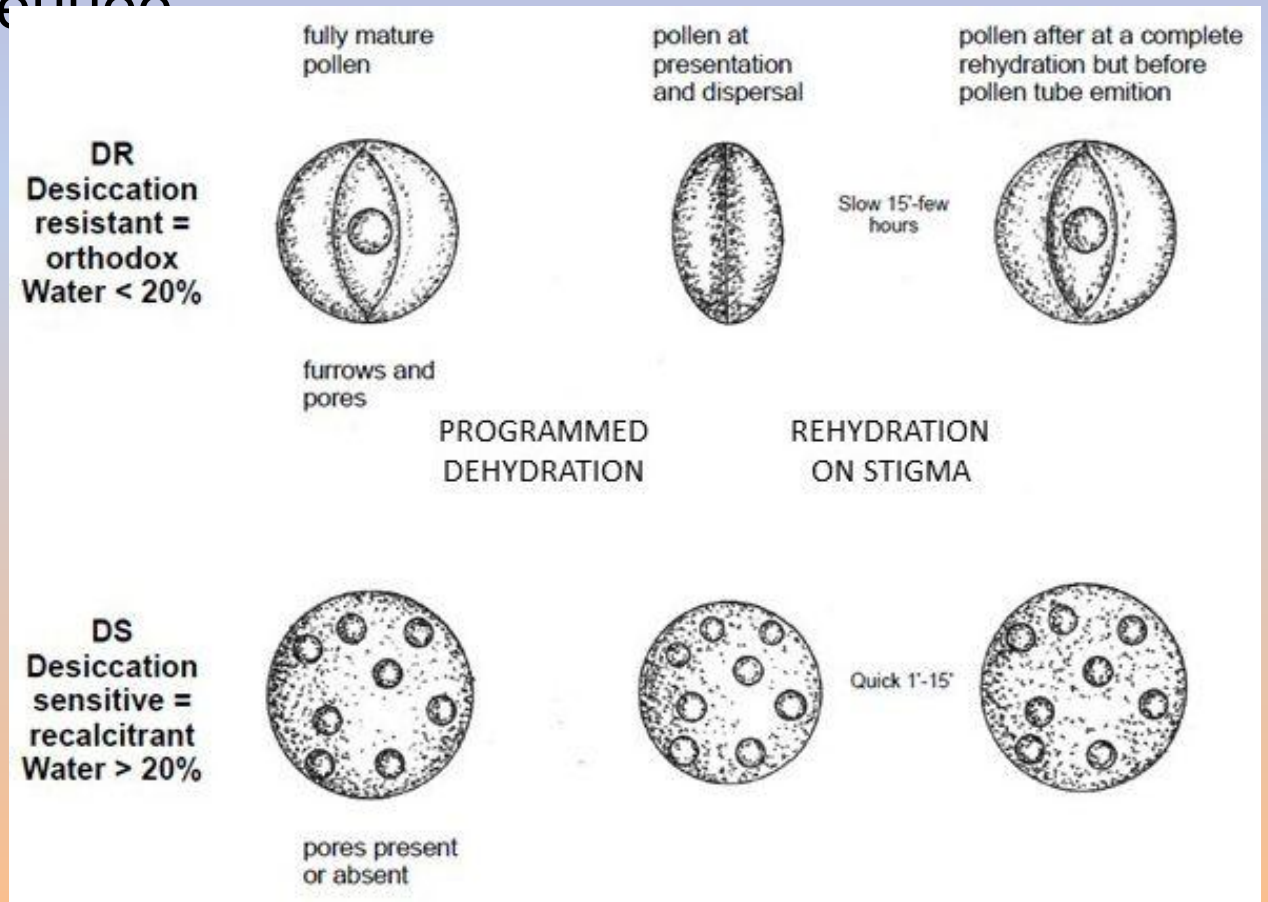
- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
- Дегидратация пыльцевых зерен
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна 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.

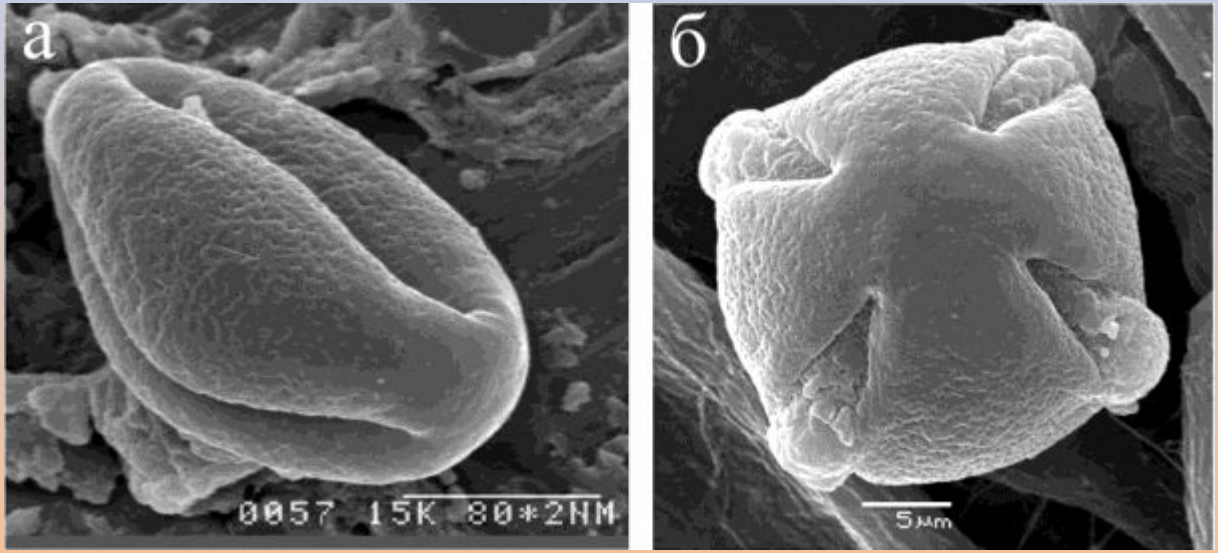
Дегидратация

- 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



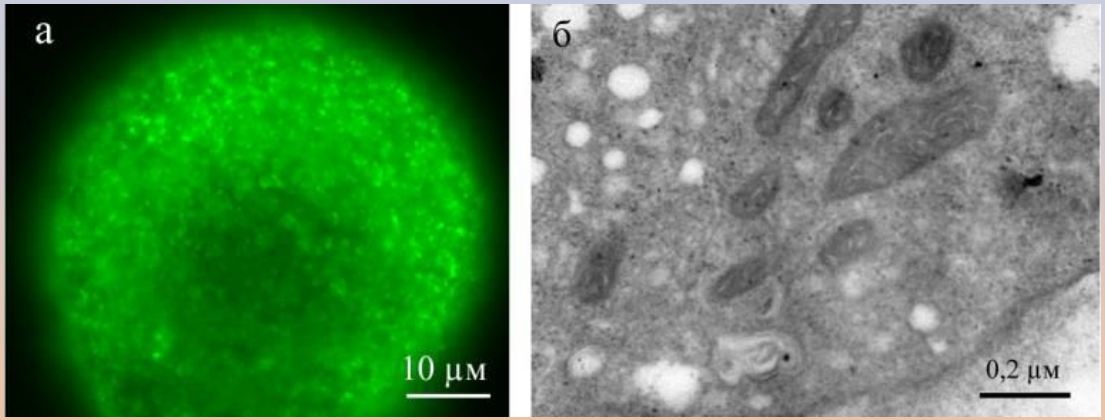
Гены, входящие в дессиком

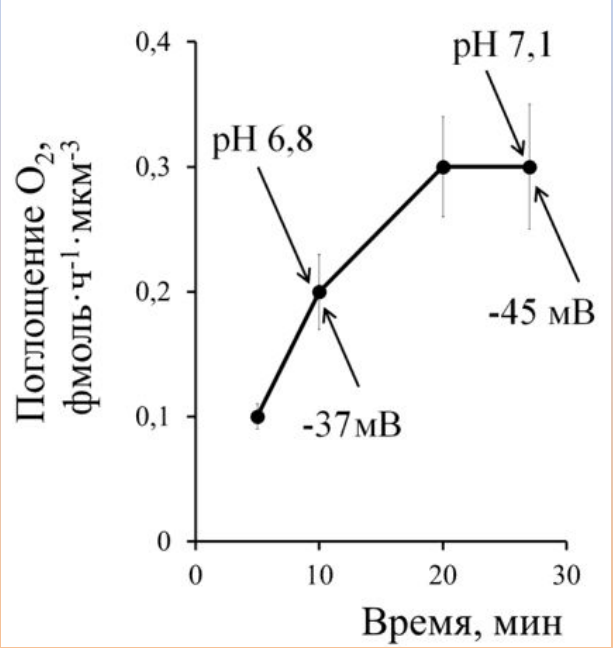
- Стабилизация мембран и белков с помощью невосстанавливающих сахаров, белков теплового шока и LEA-белков, которые могут действовать как шапероны или «молекулярные щиты», препятствуя агрегации клеточных белков.
- Защита от окислительного стресса с помощью антиоксидантов.
- Защита клеточных структур: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

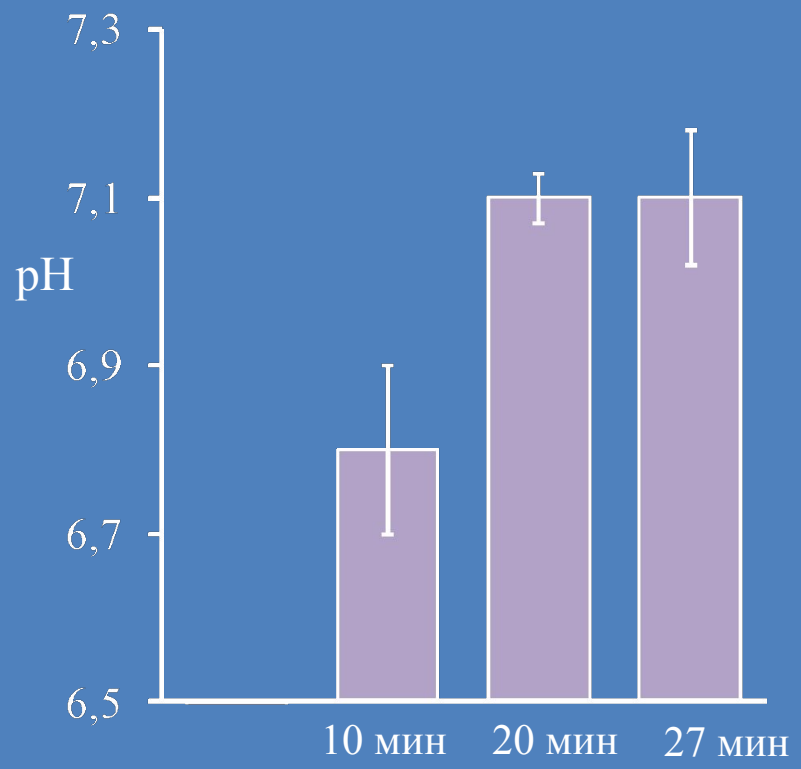
Активация пыльцевого зерна

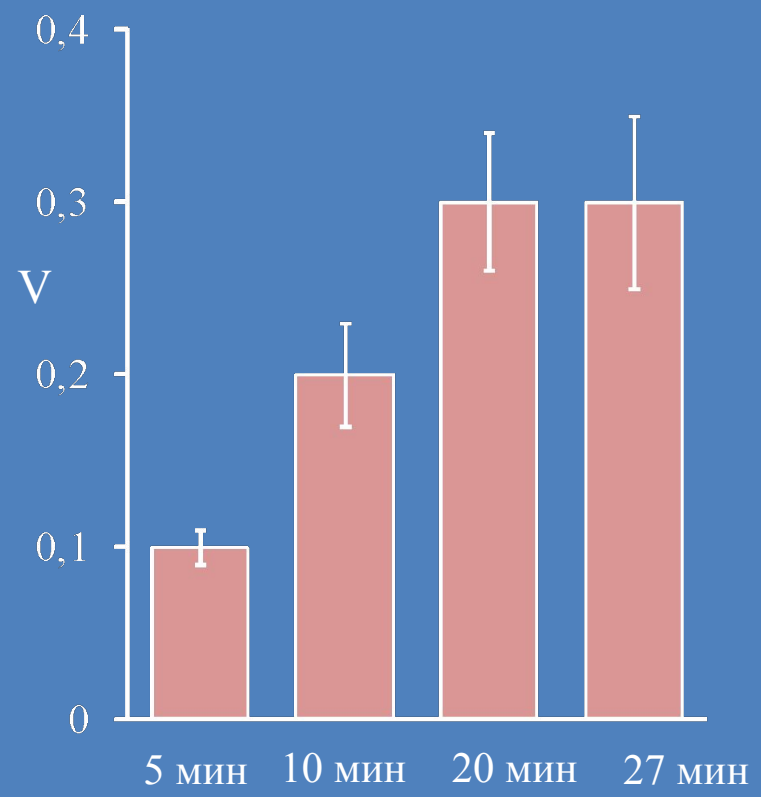
- Активация дыхания (скорость процесса зависит от состояния митохондрий)
- Сдвиг pH в щелочную сторону
- Гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки





Динамика pH и скорости поглощения кислорода в процессе активации зрелого ПЗ *in vitro*





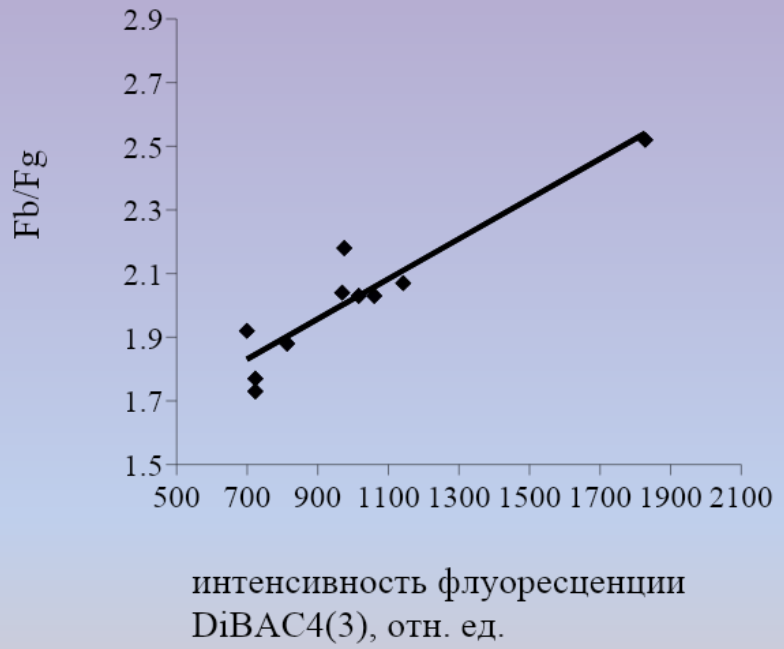
Матвеева Н.П., Войцех О.О., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Роль H^+-АТФазы и альтернативной оксидазы в регуляции величины внутриклеточного pH на разных стадиях развития мужского гаметофита табака // Онтогенез 2002.т.33 " 6. С. 436-443.

Два оптических метода оценки E_m

<u>Ратиометрический быстрый краситель Di-4-ANEPPS:</u>

✔Съемка в двух каналах при возбуждении синим (Fb) и зелёным (Fg) светом – нет зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя;

✔Не выцветает и быстро реагирует на изменения – позволяет регистрировать динамику.



<u>Медленный краситель $DiBAC_4(3)$:</u>

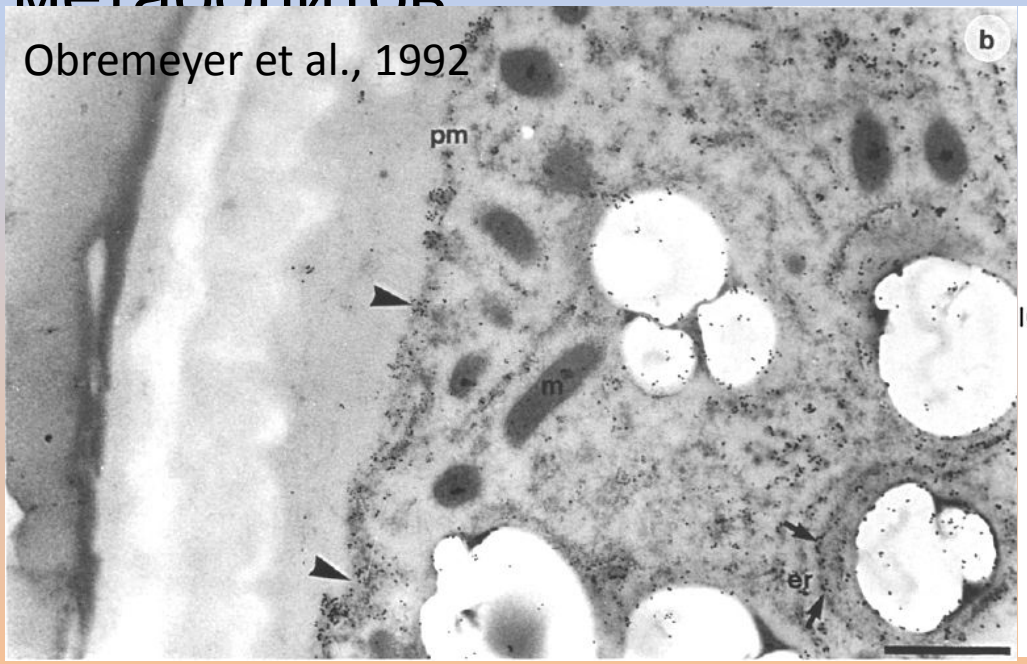
✔ позволяет определить абсолютные значения E_m (расчет ведется относительно полностью деполяризованных клеток)

✔Прост в использовании: позволяет работать с большими популяциями клеток, набирая статистические данные.

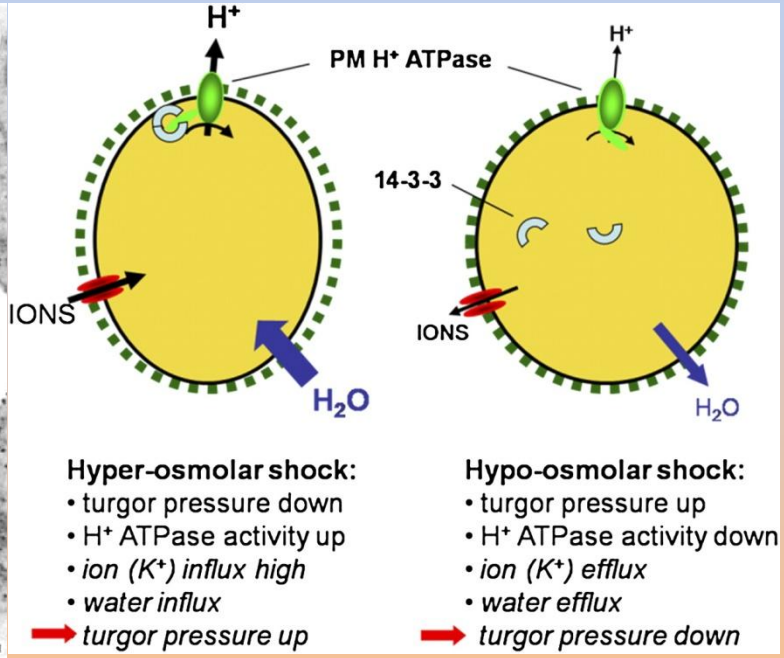
H^+-АТФаза плазмалеммы

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

Heidi Pertl et al. 2010

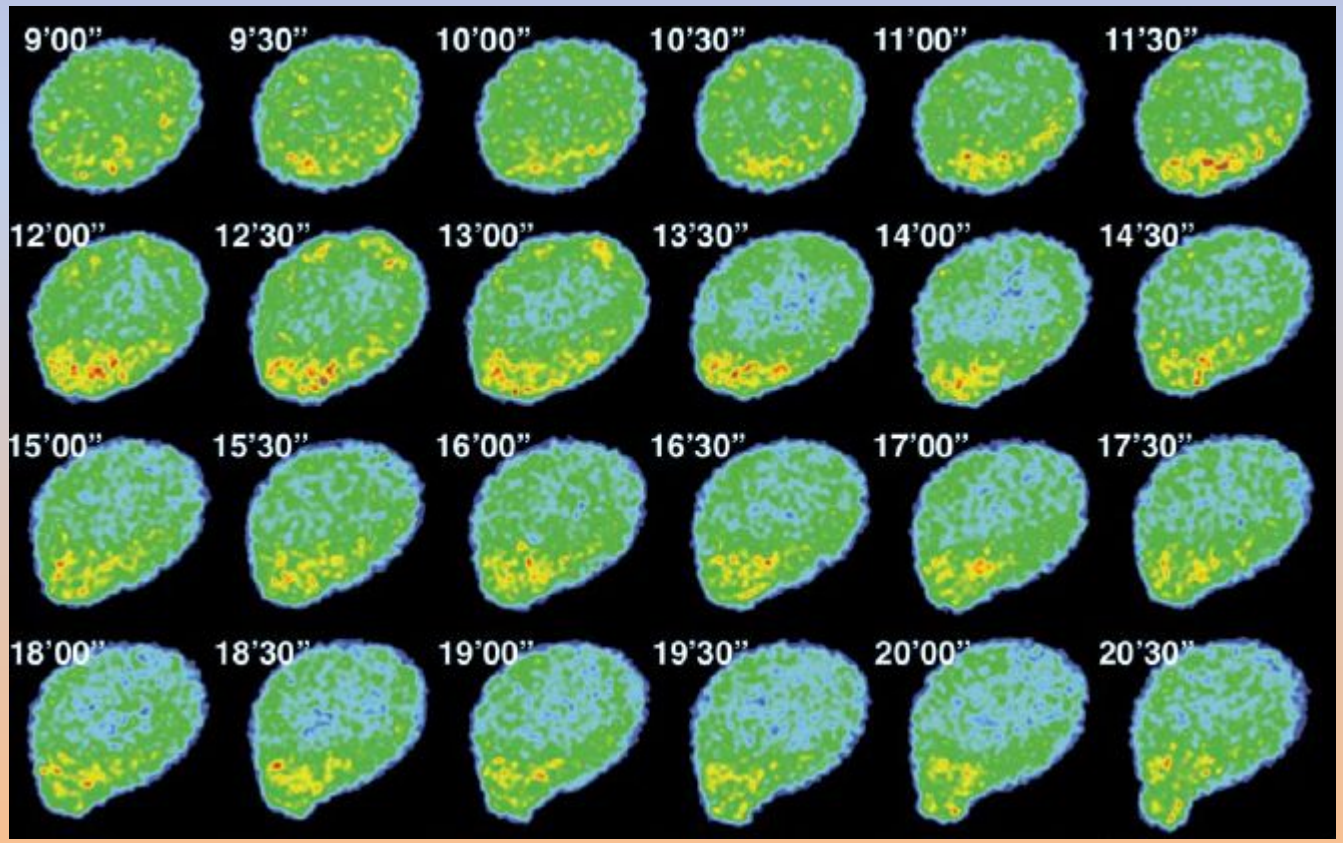


Obremeyer et al., 1992



Всему голова – Ca^{2+}

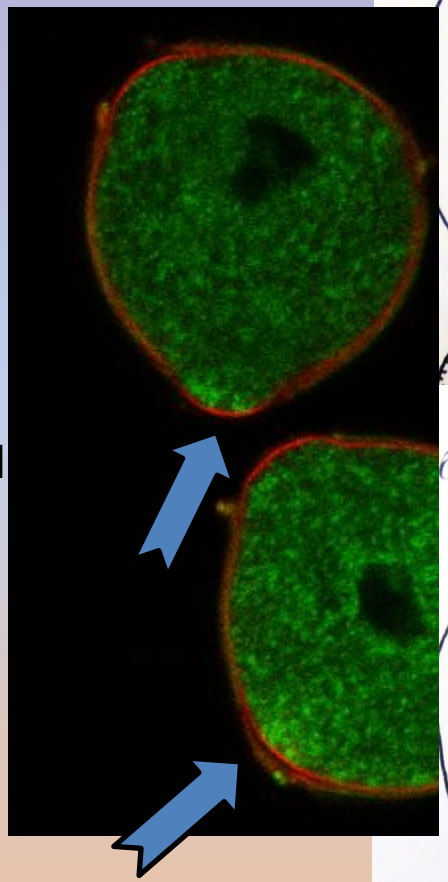
- Концентрация кальция возрастает в месте выхода пыльцевой трубки
- Ингибиторы подавляют прорастание.

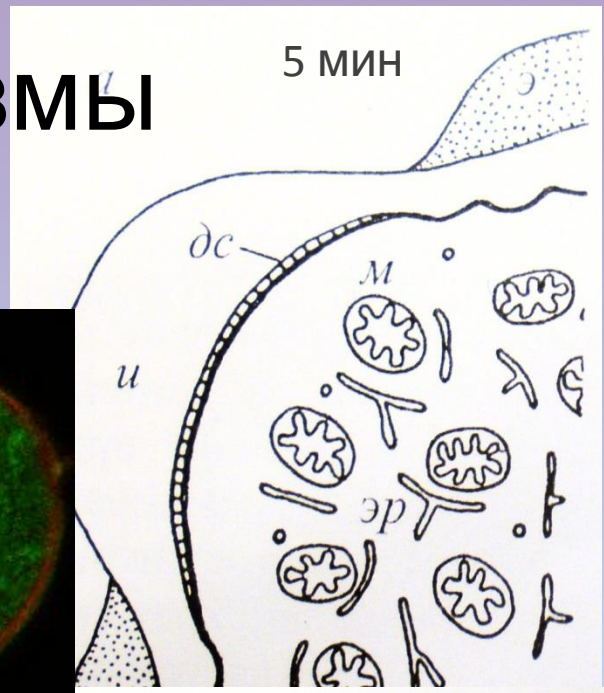


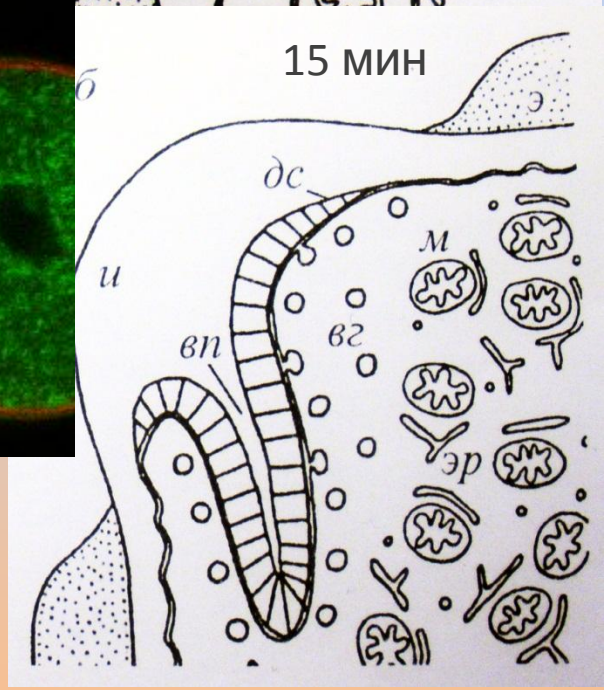
Iwano et al., 2004

Реорганизация цитоплазмы

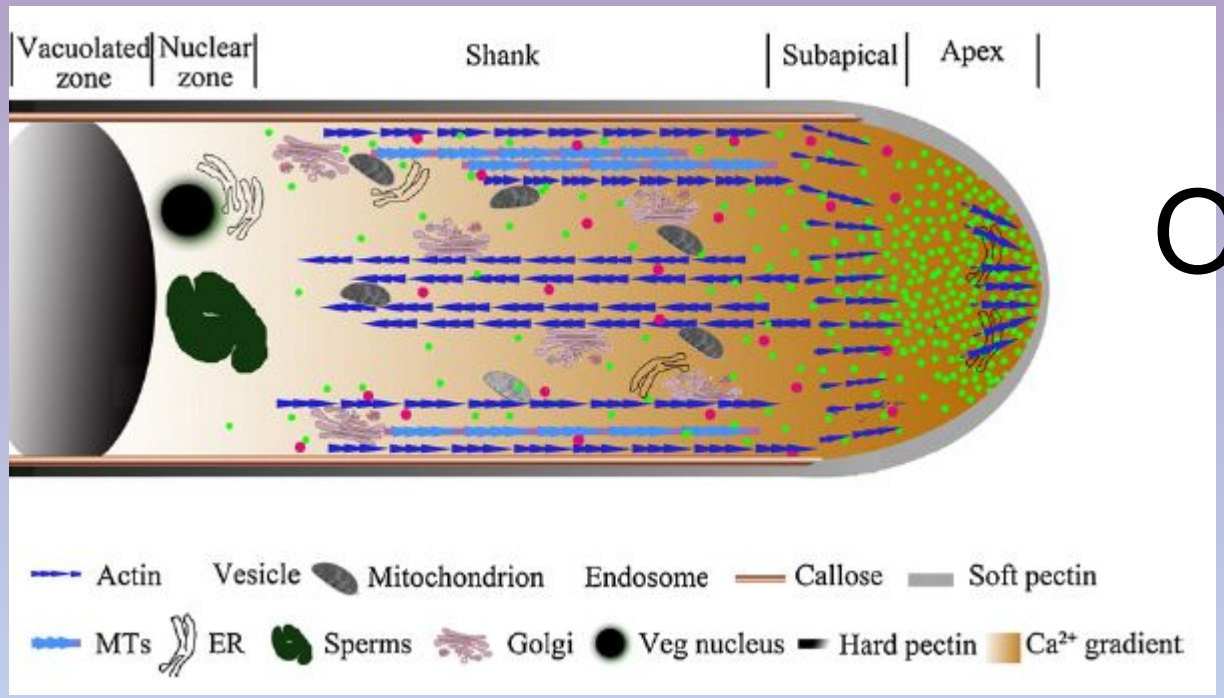
- Вблизи апертуры, через которую выйдет пыльцевая трубка, собираются везикулы Гольджи, митохондрии и короткие цистерны ЭПР, подготавливая строительство новой стенки
- Рибосомы собираются в полисомы, стопки ЭПР распадаются на отдельные цистерны, увеличивается активность аппарата Гольджи.
- К моменту прорастания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

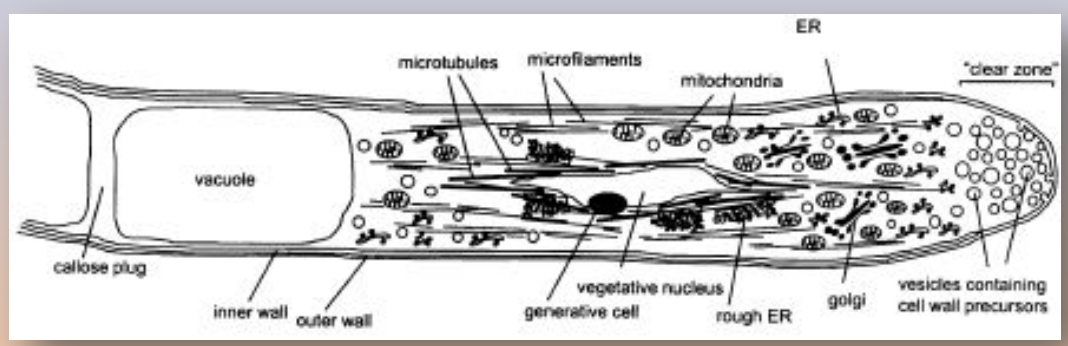


Основные игроки

- 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
- АФК

Полярность структуры

Апикальный рост пыльцевой трубки поддерживается за счет полярной организации цитоплазмы и циклоза. Пыльцевая трубка разделена на функциональные

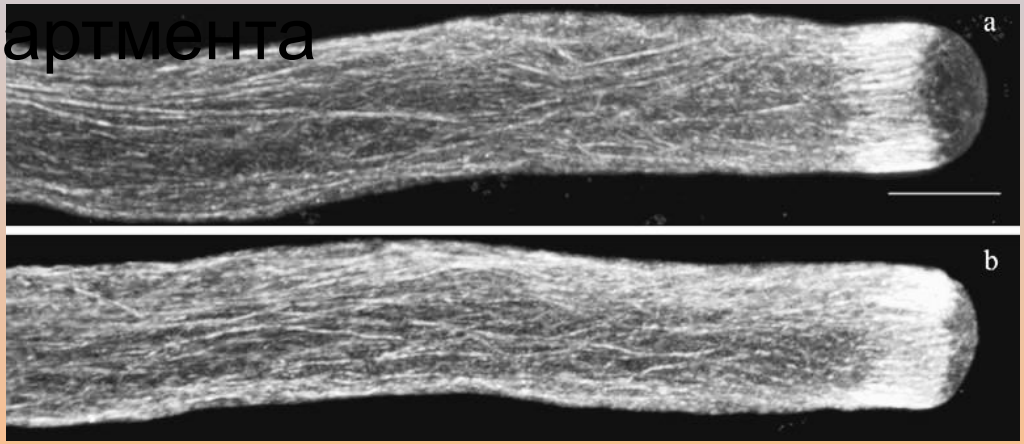


Функции циклоза

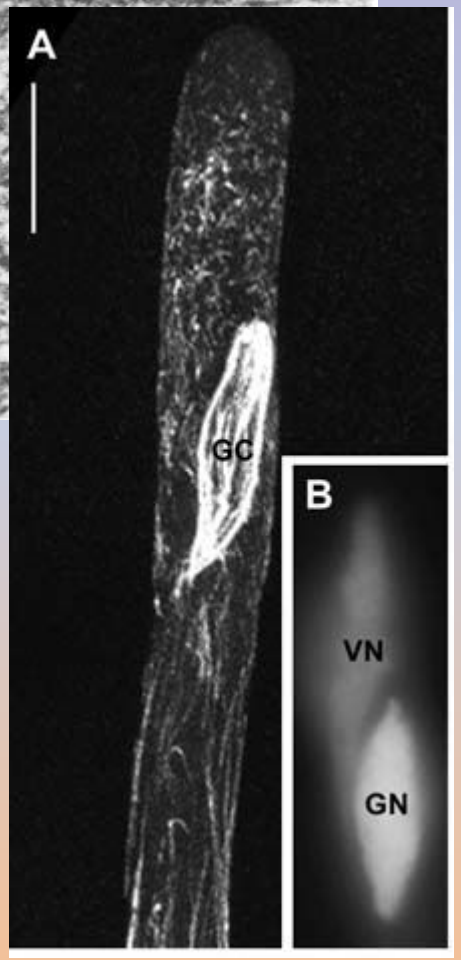
1. Транспорт мужского гаметного модуля (MGU).
2. Транспорт в апекс сигнальных молекул и ферментов для взаимодействия с пестиком.
3. Строительные материалы, включая фосфолипиды, полисахариды, стеночные ферменты.
4. В апексе везикулы доставляются в определенные зоны поверхности, где происходит их экзоцитоз.
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

- Актиновые 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



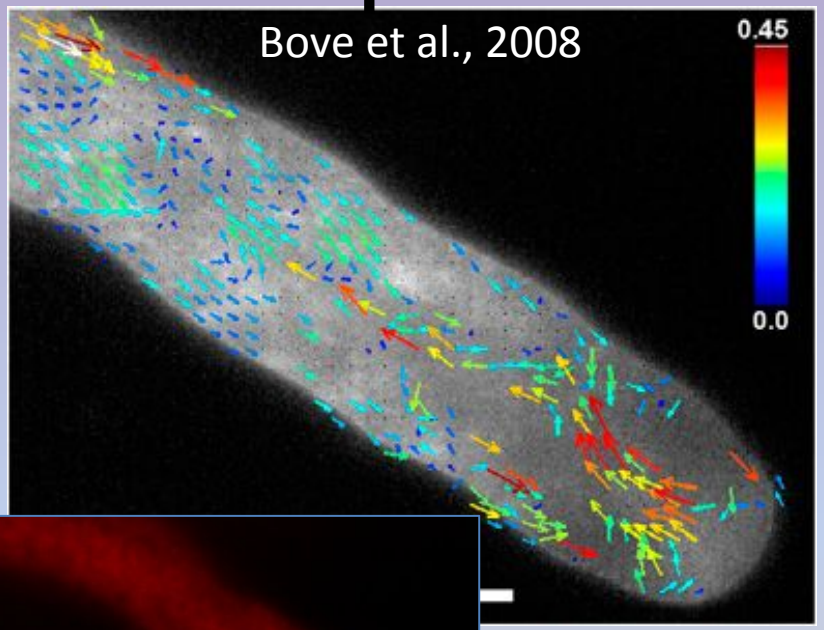
Микротрубочки

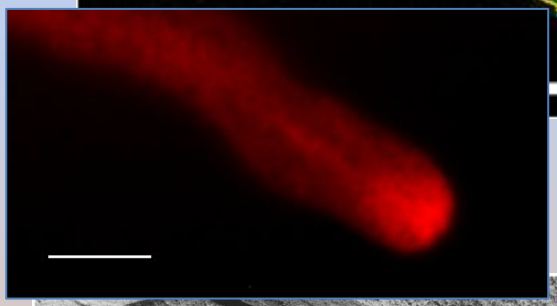


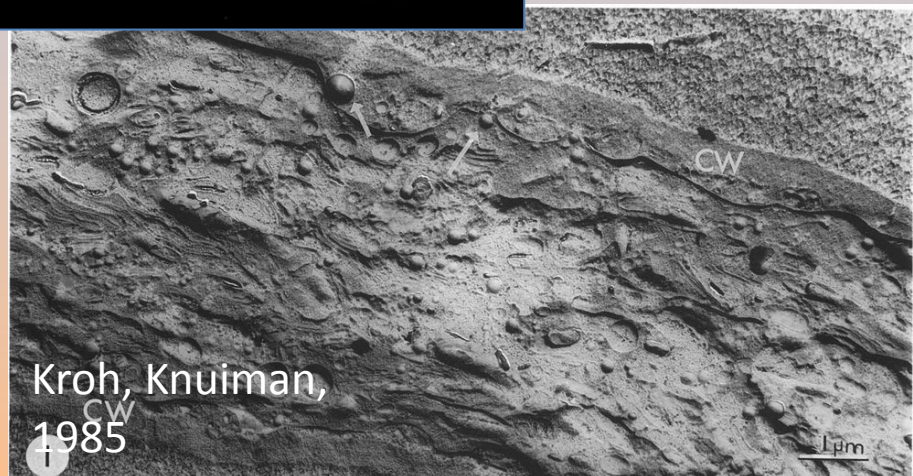
- Играют ключевую роль в доставке мужского гаметного модуля
- У цветковых не участвуют в циклозе
- У голосеменных участвуют в циклозе
- Часто располагается вместе с микрофиламентами, а также образует комплексы с ПМ и ЭПР

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

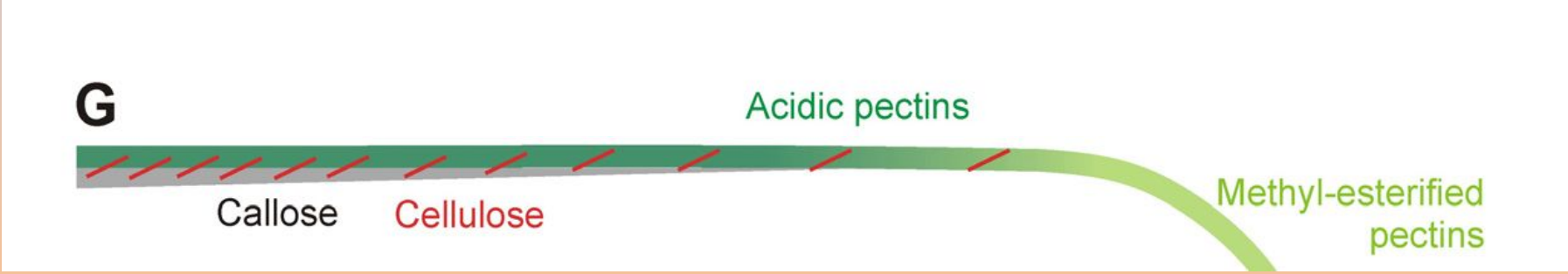






Клеточная стенка: градиент жёсткости

- 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.

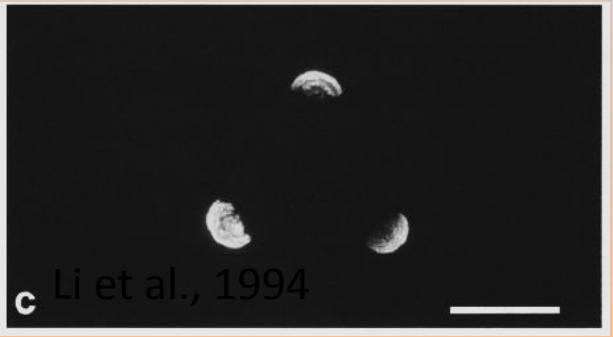


Chebli, Geitmann, 2007

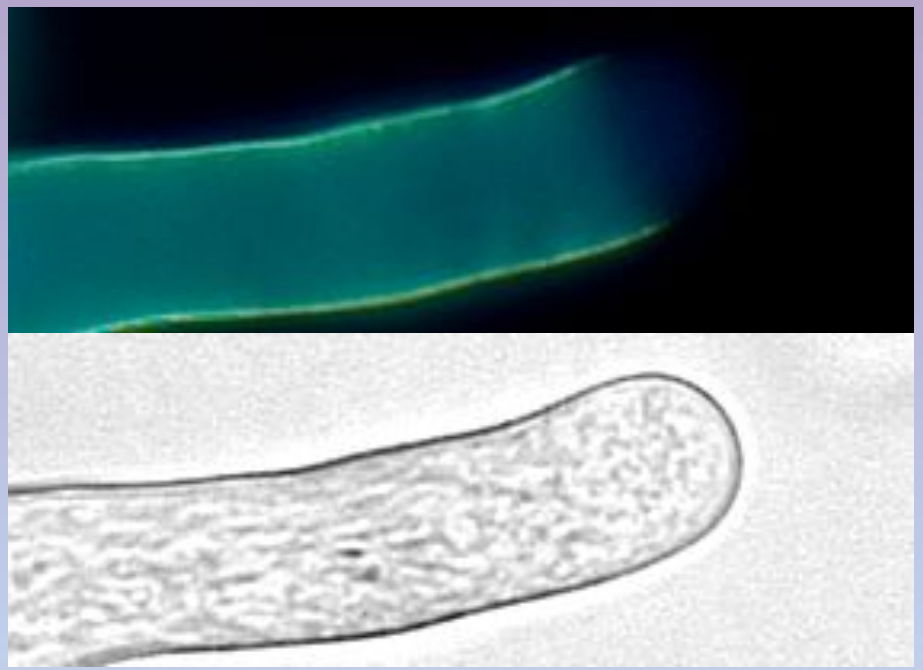
Parre, Geitmann, 2005

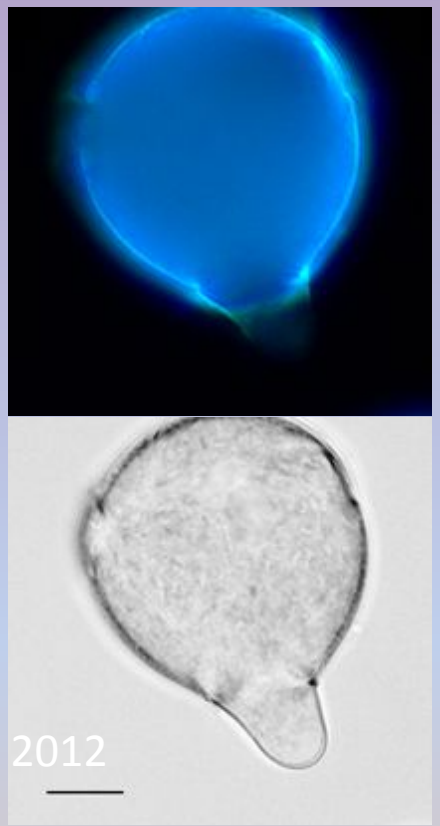
- Этерифицированные пектины откладываются в кончике трубки в процессе экзоцитоза
- По мере удаления от кончика они деэтерифицируются при участии фермента пектинметилэстеразы (ПМЕ)
- Кальций участвует в образовании сшивок между молекулами пектинов, увеличивая прочность полимерной сети
- Это обеспечивает градиент жесткости от кончика к ПЗ

Пектины



Li et al., 1994



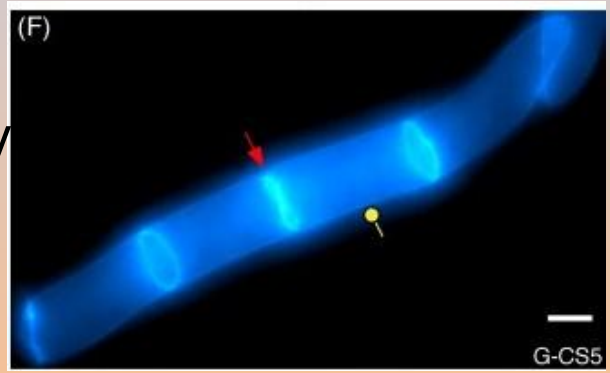


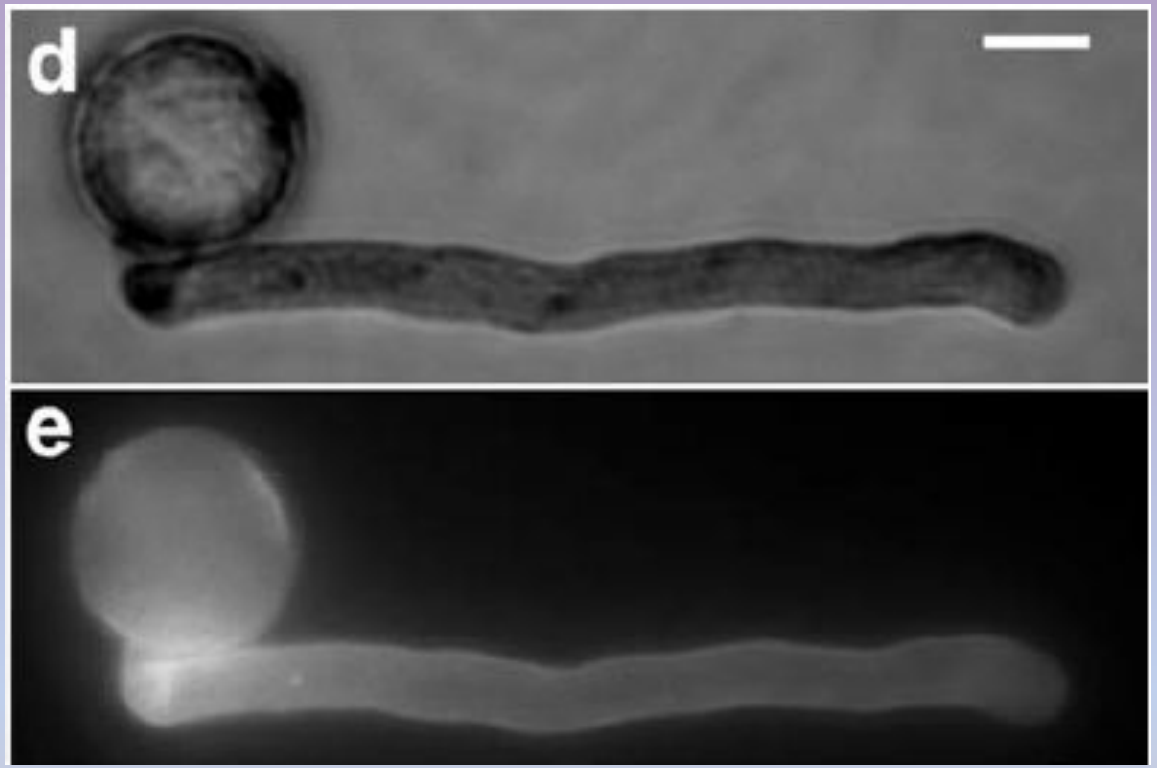
Каллоза

Breygina et al., 2012

Xie et al., 2012

- Отсутствует в кончике
- Появляется на расстоянии 10-30 мкм
- Образует каллозные пробки в длинных тру
- Откладывается в кончике в ответ на стрессовое воздействие



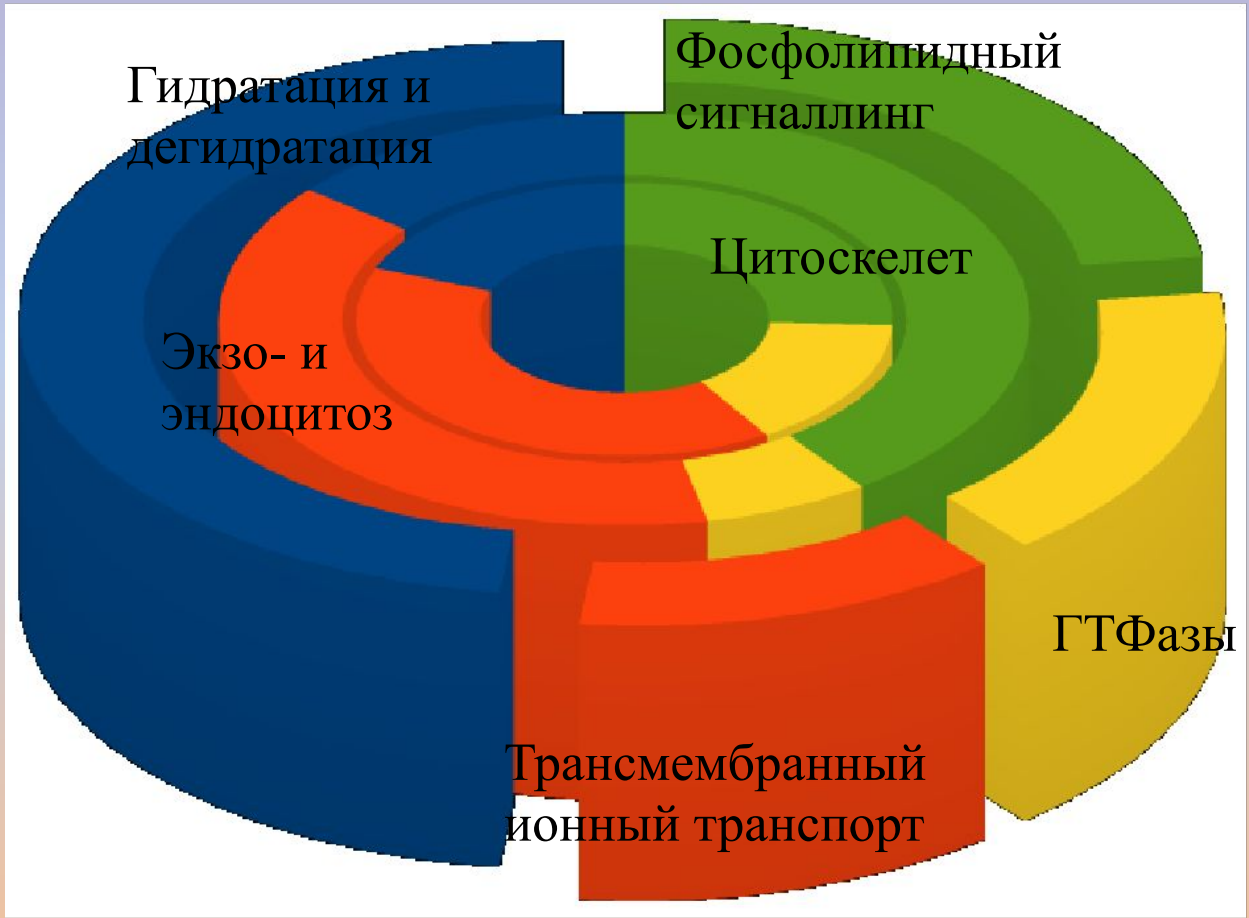


Parre,
Geitmann, 2005

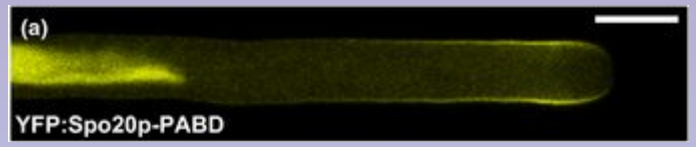
Целлюлоза

- Жесткий компонент, но его не очень много
- Отложение также неравномерное: в кончике отсутствует, далее постепенно накапливается по направлению к ПЗ.

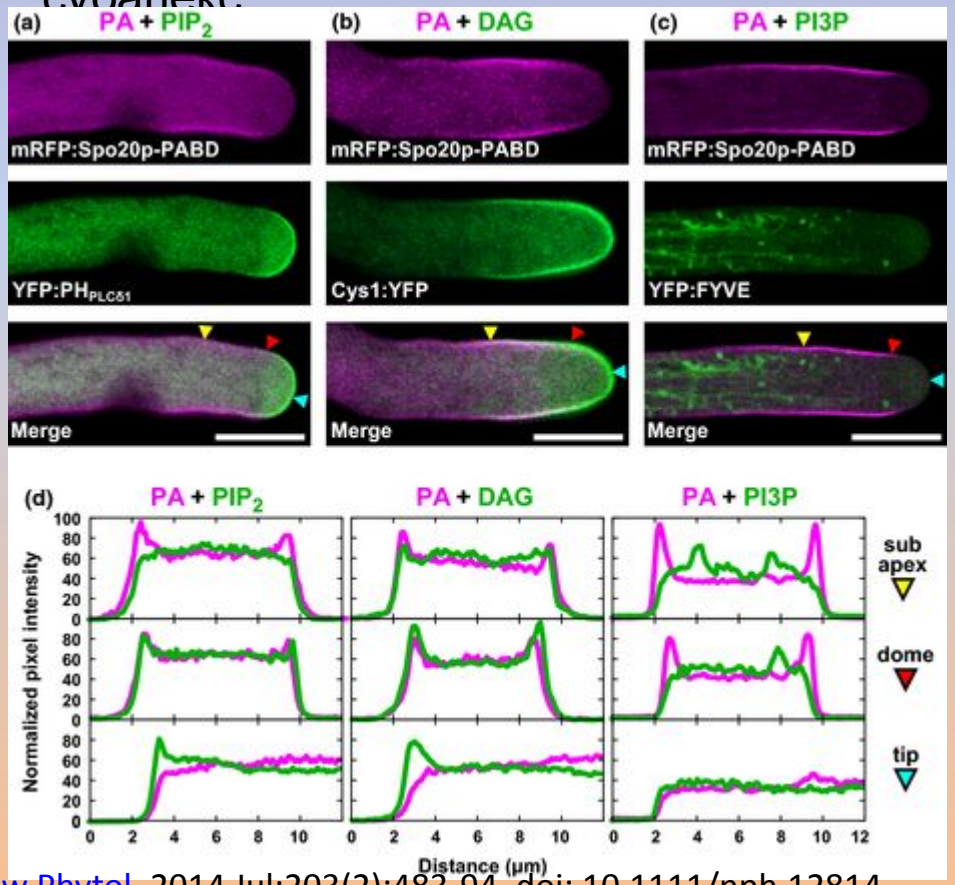
Универсальные регуляторные механизмы



Регуляторные механизмы: фосфолипиды

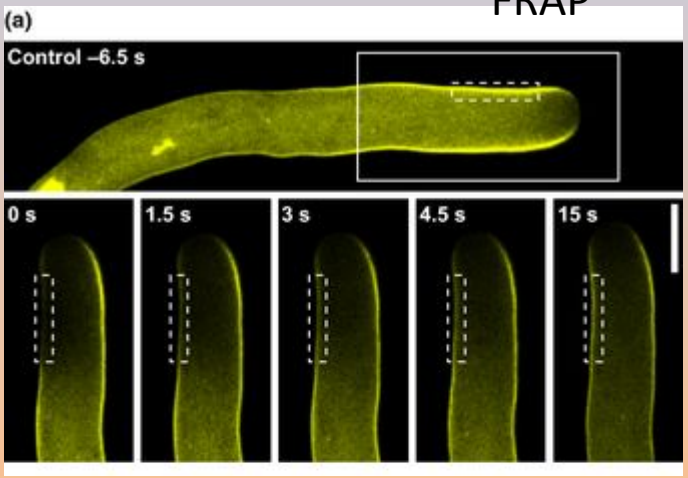


Фосфатидная к-та - субапекс



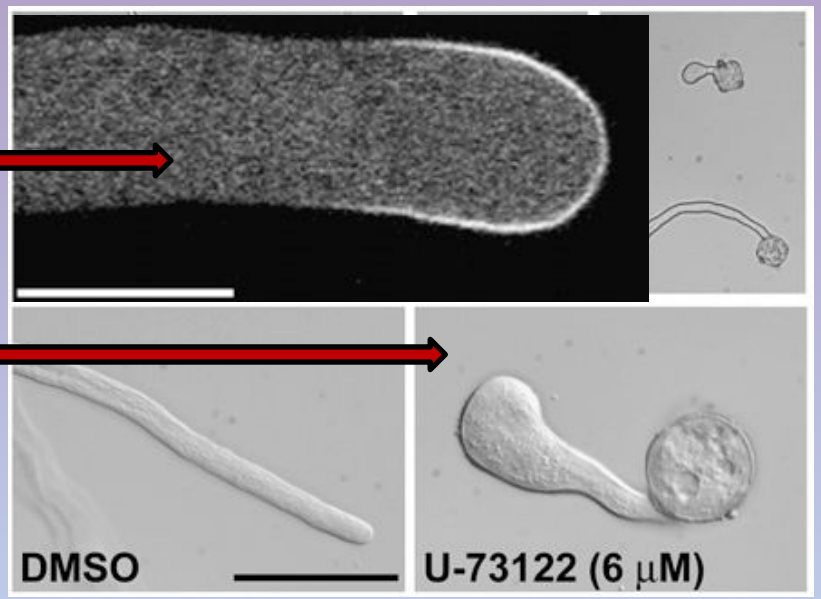
- Фосфатидная кислота сосредоточена в субапикальной плазмалемме, т.е. в зоне расположения актинового кольца.
- Фосфатидилинозитолди фосфат (PIP_2) локализован в плазмалемме апекса трубки.

FRAP

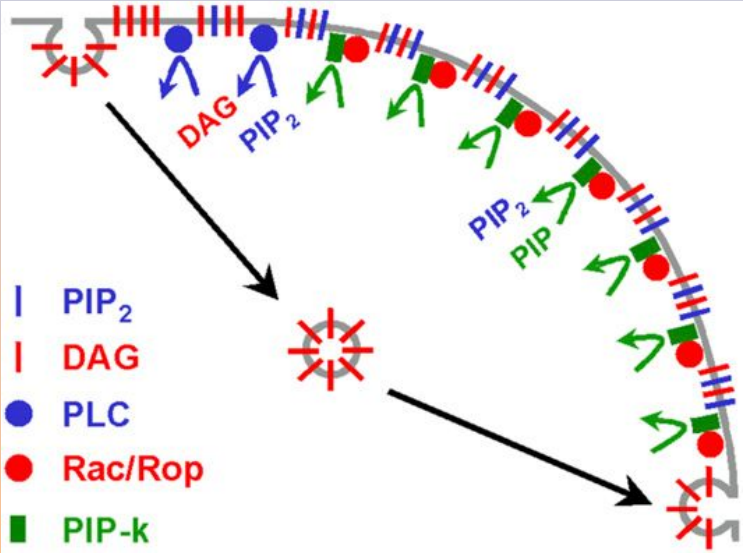


New Phytol. 2014 Jul;203(2):483-94. doi: 10.1111/nph.12814

- Его узкая локализация обеспечивается белком phosphotidylinositol 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

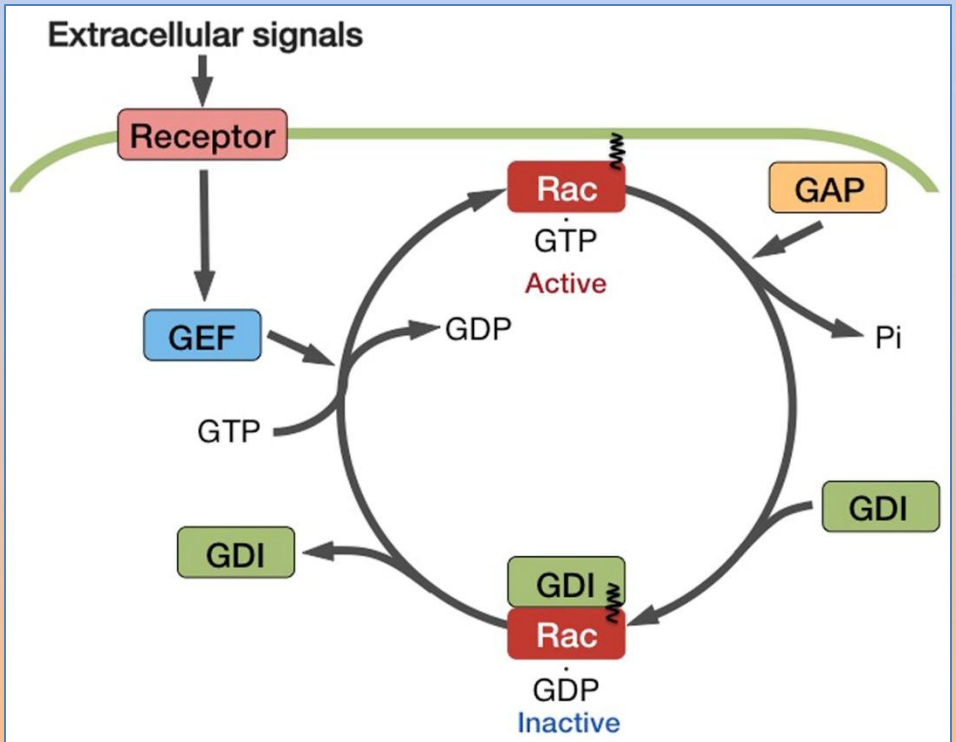


Регуляторные механизмы: фосфолипиды

ROP ГТФазы и рецепторные киназы

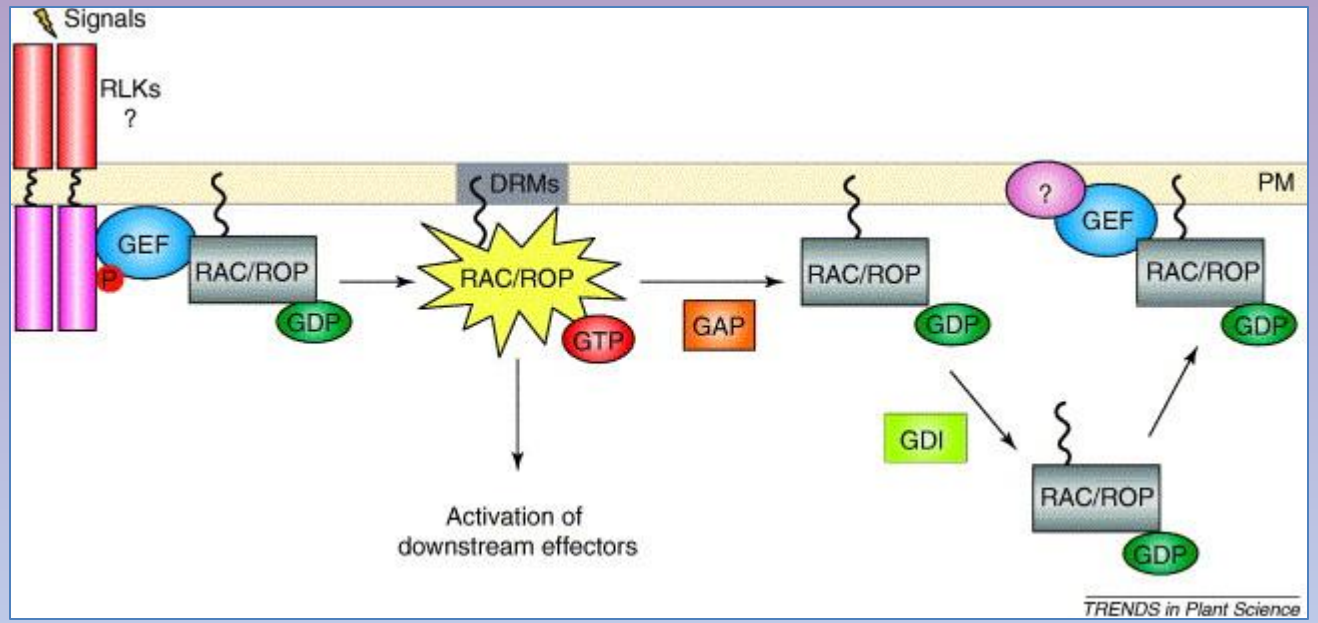
- В клетках растений основную роль играют мономерные (малые) G белки (20-30 кДа).
- Эти ГТФазы цилически переходят из неактивной цитозольной формы (G-ГДФ) в активную форму (G-ГТФ), связанную с мембраной

Guanine nucleotide exchange factor



GTPase-activating protein

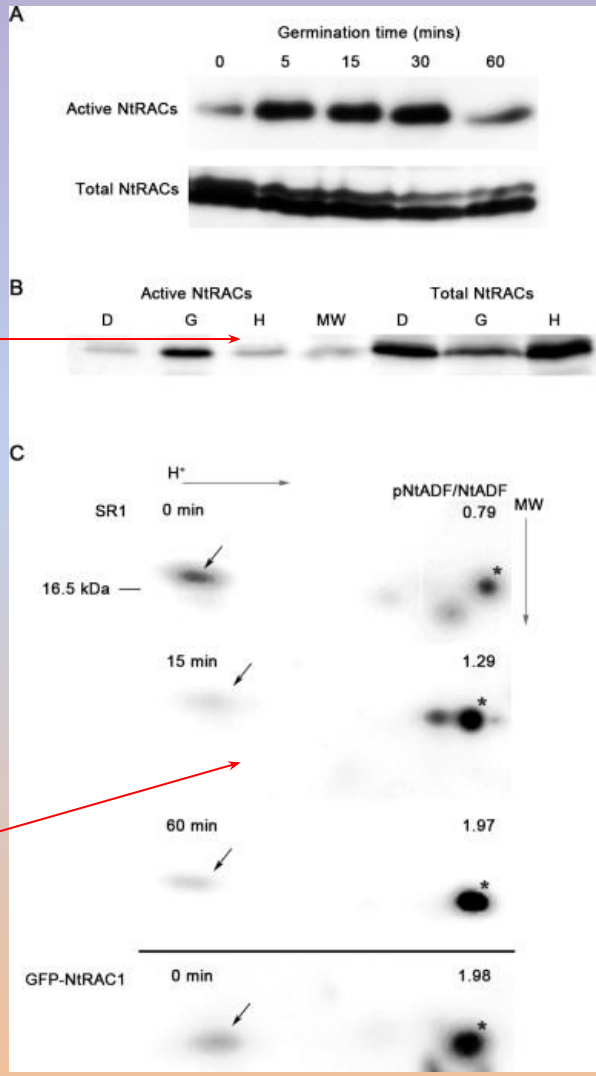
Guanine nucleotide dissociation inhibitor



- Малые ГТФазы, обозначаемые как **Rac/Rop** или **ROP** (Rho of plants) выполняют функции клеточных хабов – центральных переключателей и интеграторов сигналов.
- В качестве мишеней для активированных ГТФаз могут, в частности, служить белки, связанные с функционированием **цитоскелета** и **везикулярным транспортом.**

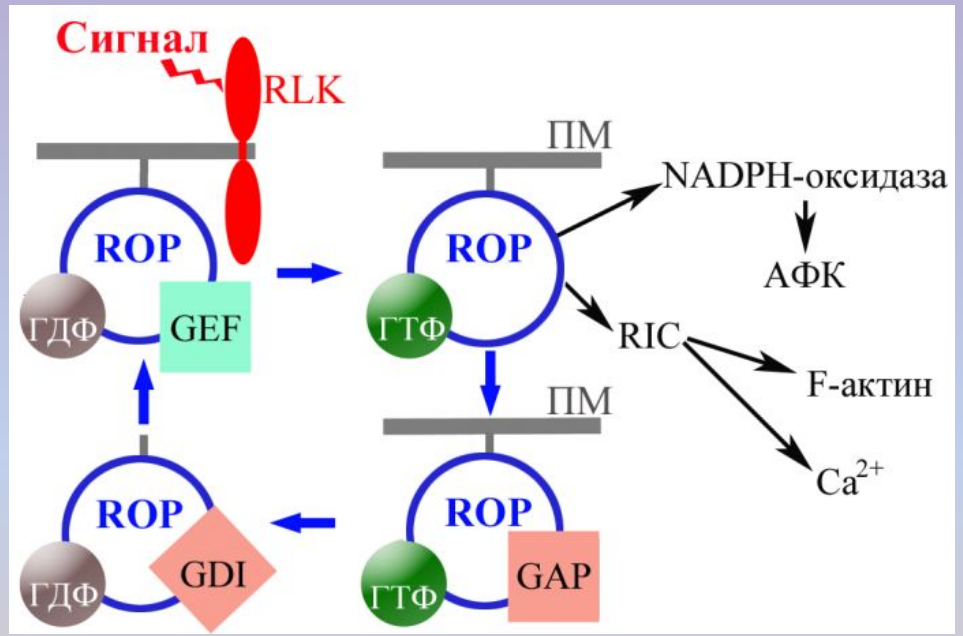
RAC/ROPs и начальные стадии прорастания

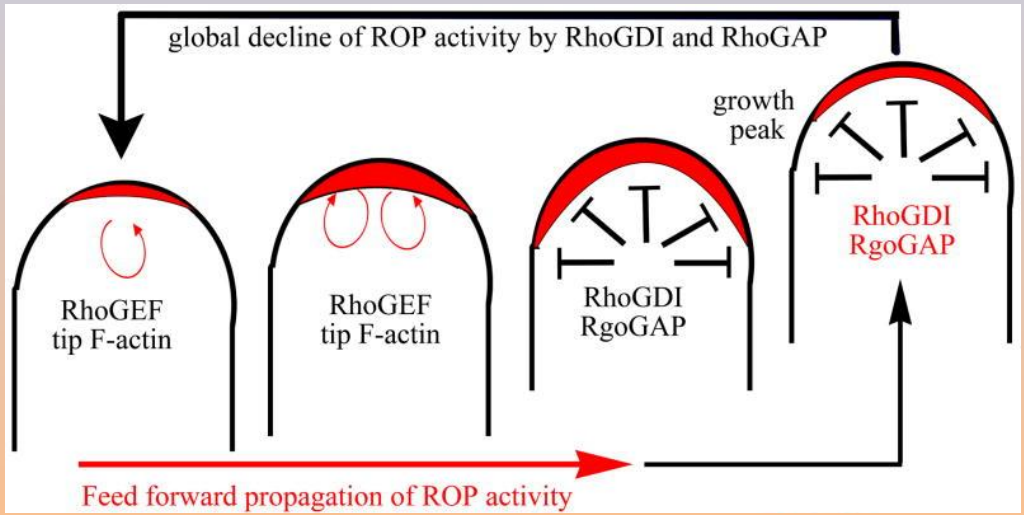
- Активация пыльцы как *in vitro,* так и *in vivo* сопровождается активацией ROP ГТФаз (NtRAC).
- В чистой воде этого не происходит!
- В условиях *in vitro* высокий уровень активированных ГТФаз поддерживается на протяжении 30 мин, после чего снижается примерно к 60 мин.
- Одной из мишеней этих белков в данном случае является актиндеполимеризующий фактор ADF.



Molecular Plant 2013 6, 1358-1361DOI: (10.1093/mp/sst074)

Регуляция по принципу обратной связи

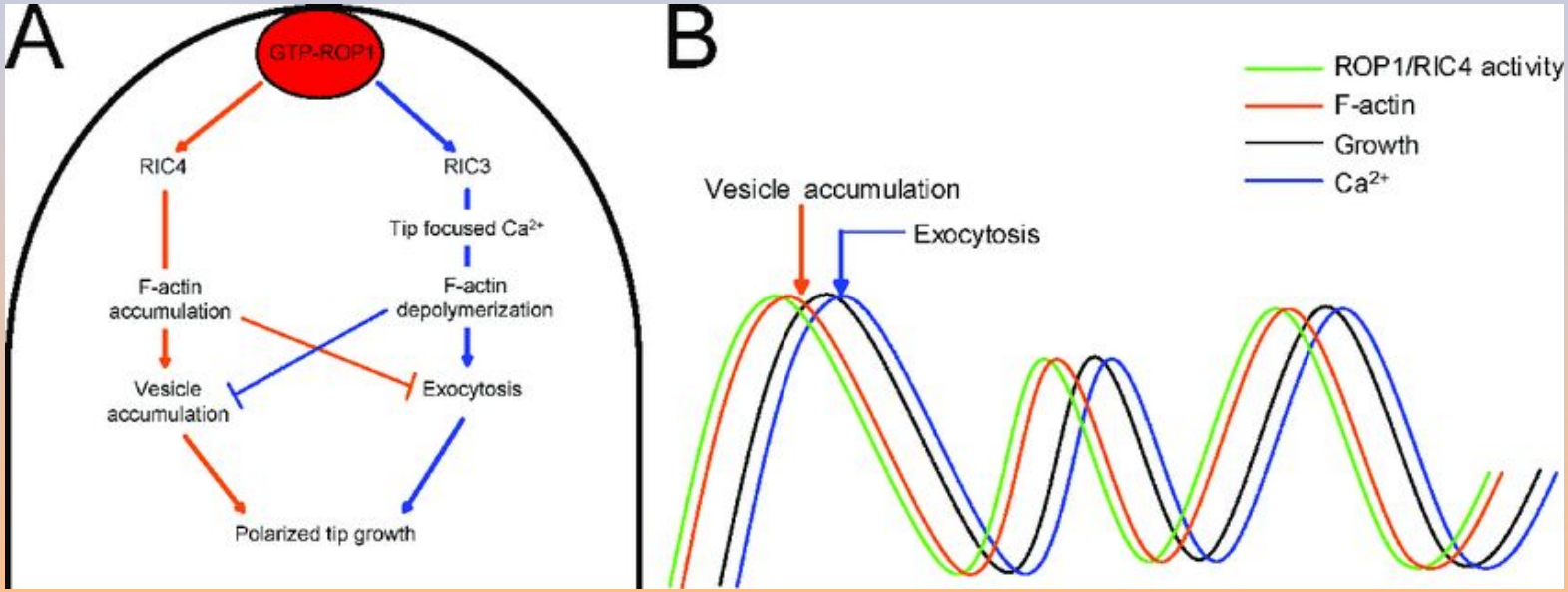




- Рецепторная киназа RLK активирует фактор обмена нуклеотидов GEF, ROP переводится в активное состояние.
- Отрицательную обратную связь осуществляют две группы белков:
- GAP (GTPase-Activating Protein) – белки, стимулирующие ГТФазную активность, – переводят ROP в неактивное состояние.
- GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) удерживают неактивный белок ROP1 в цитозоле

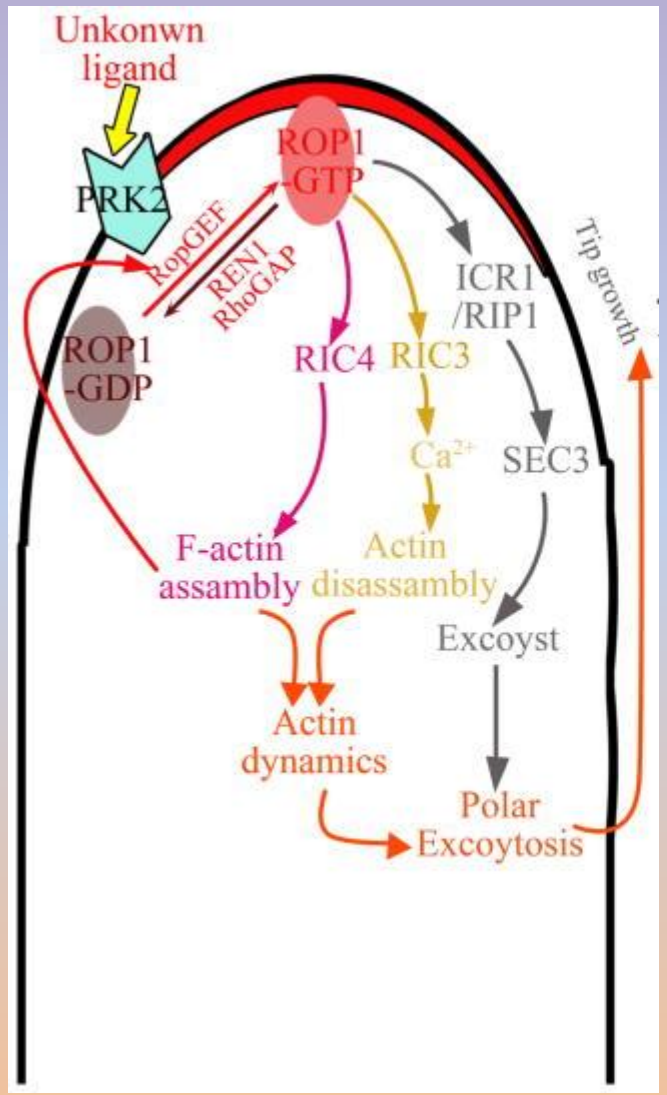
ROP1 в трубке

- В растущей пыльцевой трубке специфичная для пыльцы ГТФаза ROP1 локализована преимущественно в апикальной плазмалемме.
- Экспериментальный сдвиг баланса активации ROP1 в ту или другую сторону приводит к полной остановке роста (снижение) или вызывает расширение кончика (повышение)



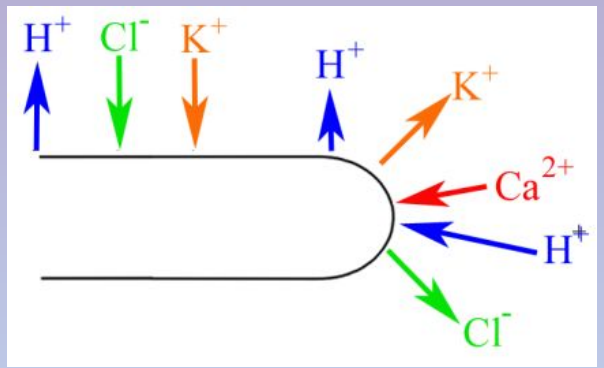
Эффекторные белки

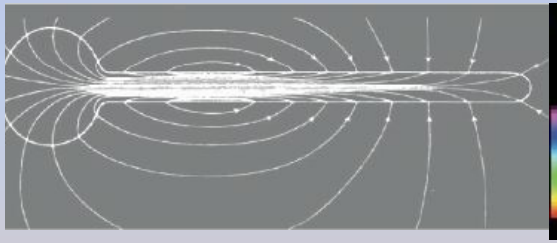
- Путь, идущий через RIC4, приводит к сборке актиновых микрофибрилл и контролирует накопление везикул, несущих материалы для апикального роста.
- Путь RIC3 активирует накопление кальция в кончике пыльцевой трубки, стимулирует деполимеризацию актина и слияние везикул с плазмалеммой.
- Эти два пути согласованно работают, регулируя динамику F-актина и экзоцитоз.

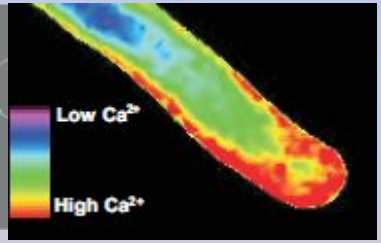


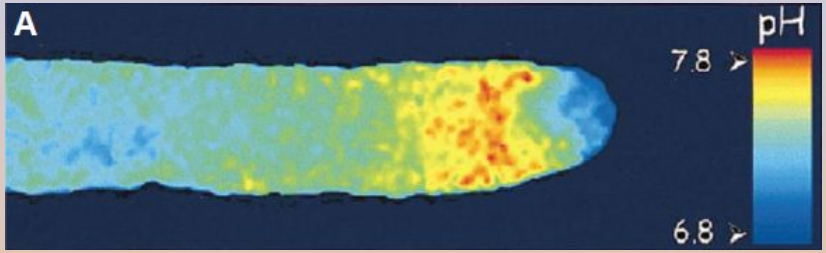
Ионная регуляция

- 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



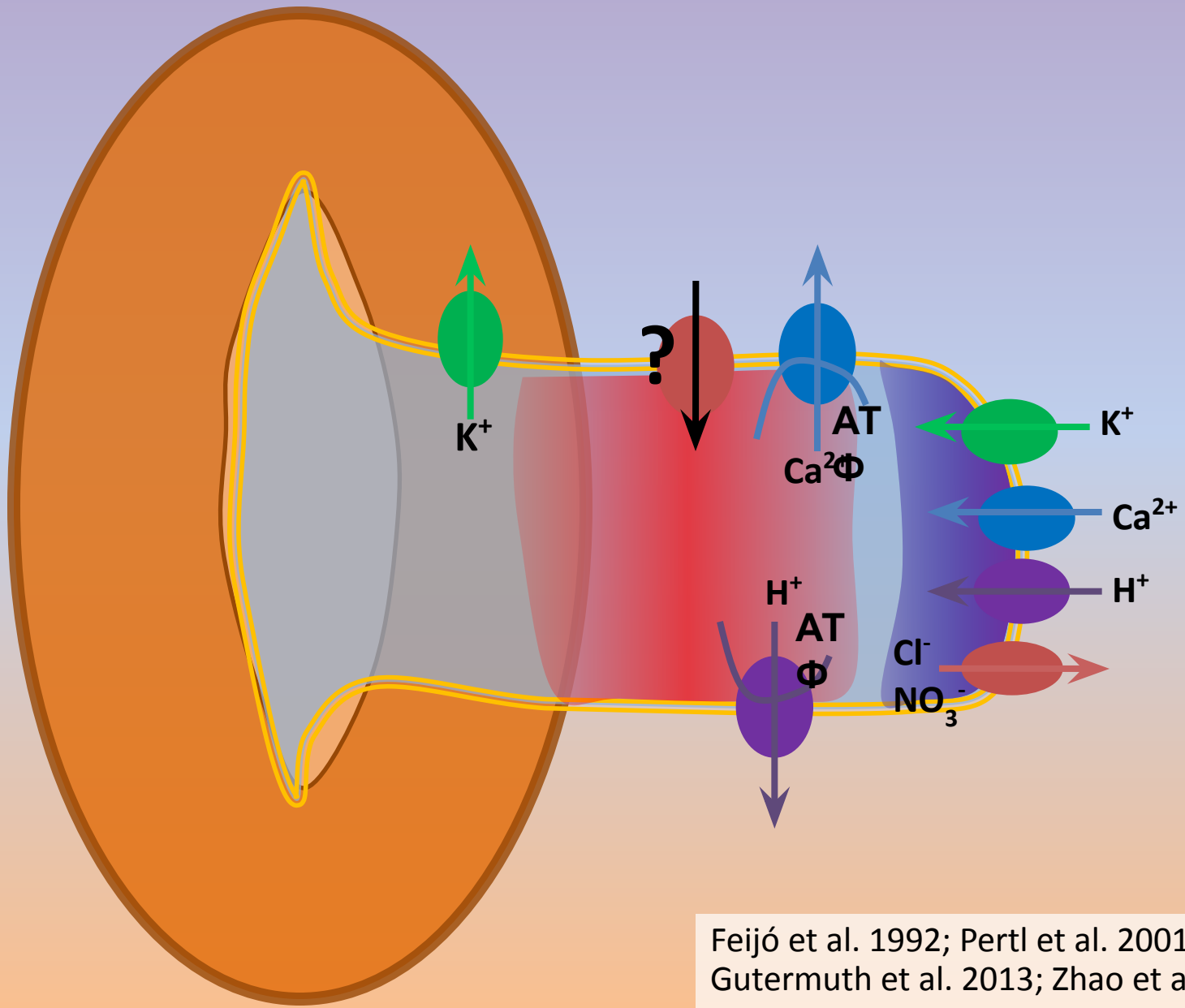






Michard E. et al. 2009. Int. J. Dev. Biol. 53: 1609-1622; Gutermuth T. et al., 2013. Plant Cell. 25: 4525.

Основные закономерности прорастания и роста пыльцевого зерна: ионный статус



Ряд известных белков, обеспчивающих транспорт ионов:

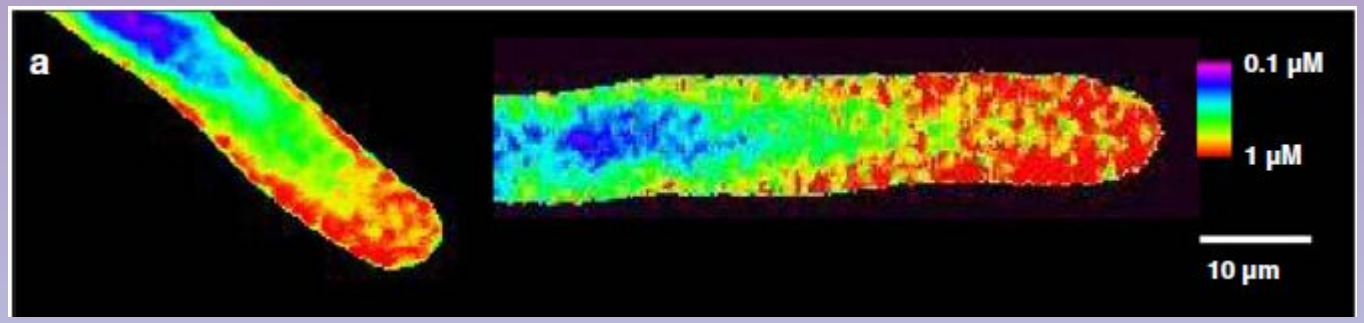
ACA9

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



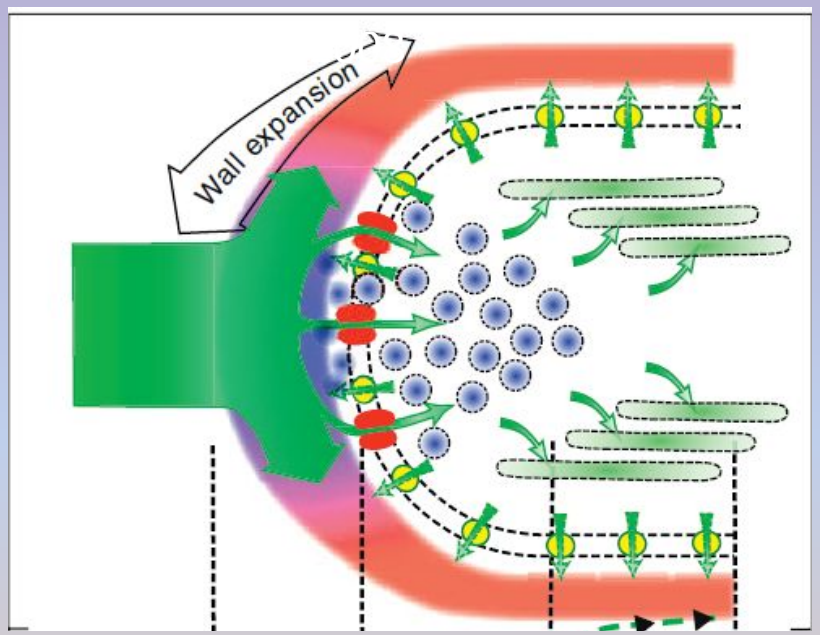
Hepler, 2012

Регуляторные механизмы: кальций

- Кальций входит в кончике трубки через каналы , а в субапикальной области входит в органеллы и выкачивается через ПМ с помощью помпы.
- Таким образом, поддерживается крутой градиент его концентрации в апикальной зоне
- Кальций – центральный регулятор роста, с нарушением градиента рост прекращается

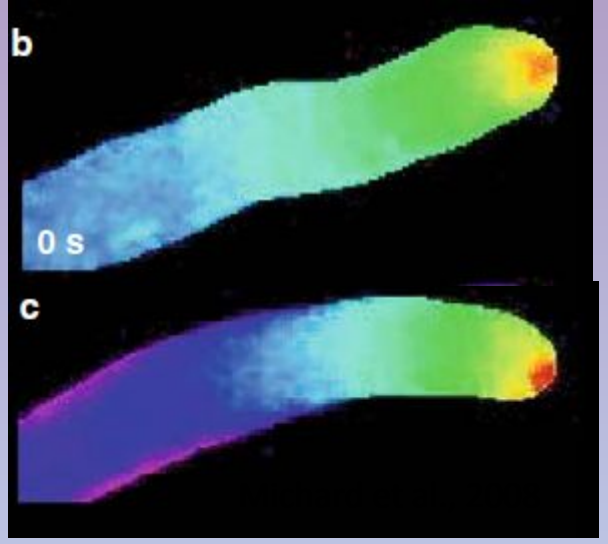
Регуляторные механизмы: кальций

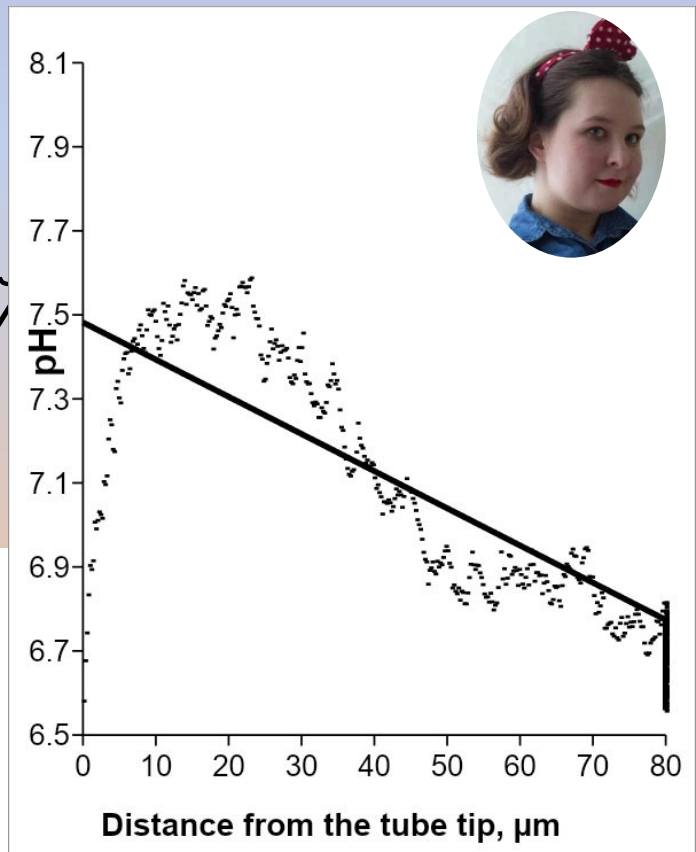
- Кальциевый градиент определяет место слияния везикул с ПМ и, таким образом, задает направление роста
- Кальций регулирует динамику актиновых филаментов через Са-чувствительные актин-связывающие белки (ABPs),
- Кальций модулирует активность Са-зависимых протеин-киназ (CDPKs)



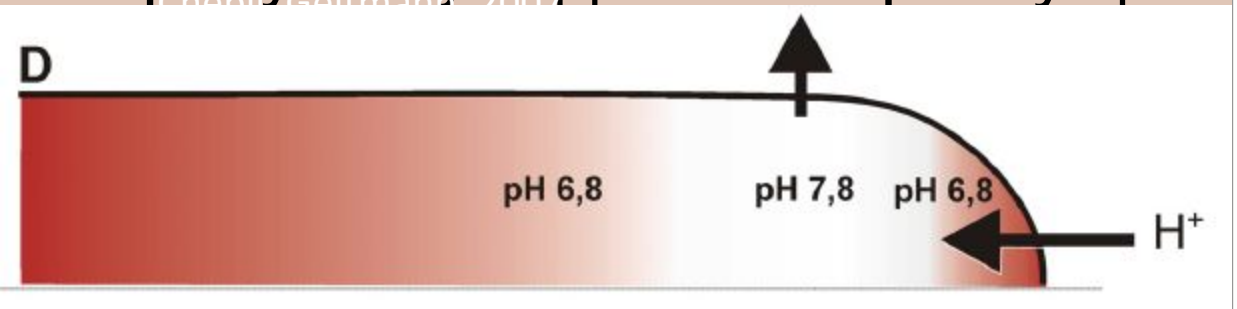
Протонный градиент

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

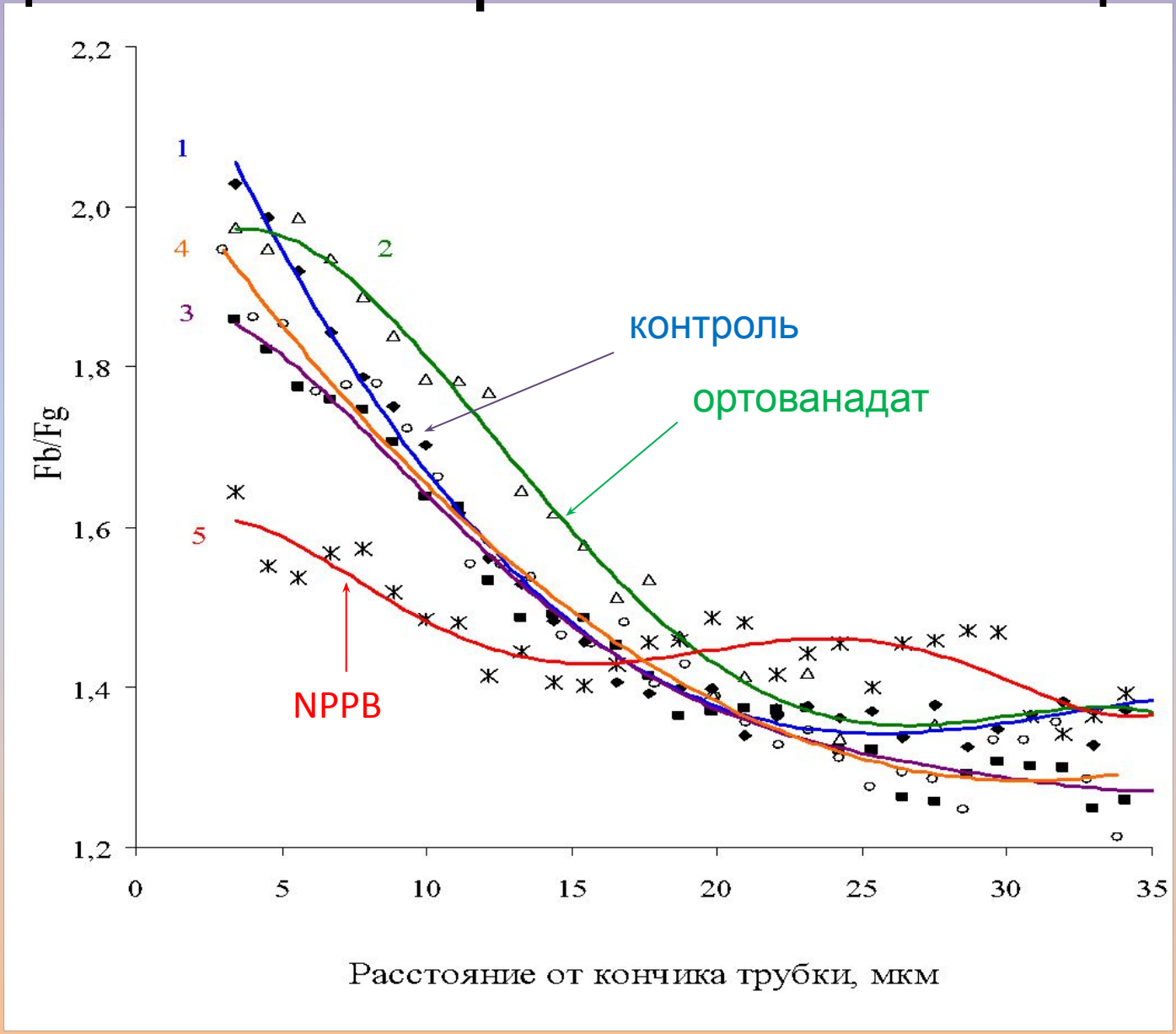




Chehri, Geitmann, 2007



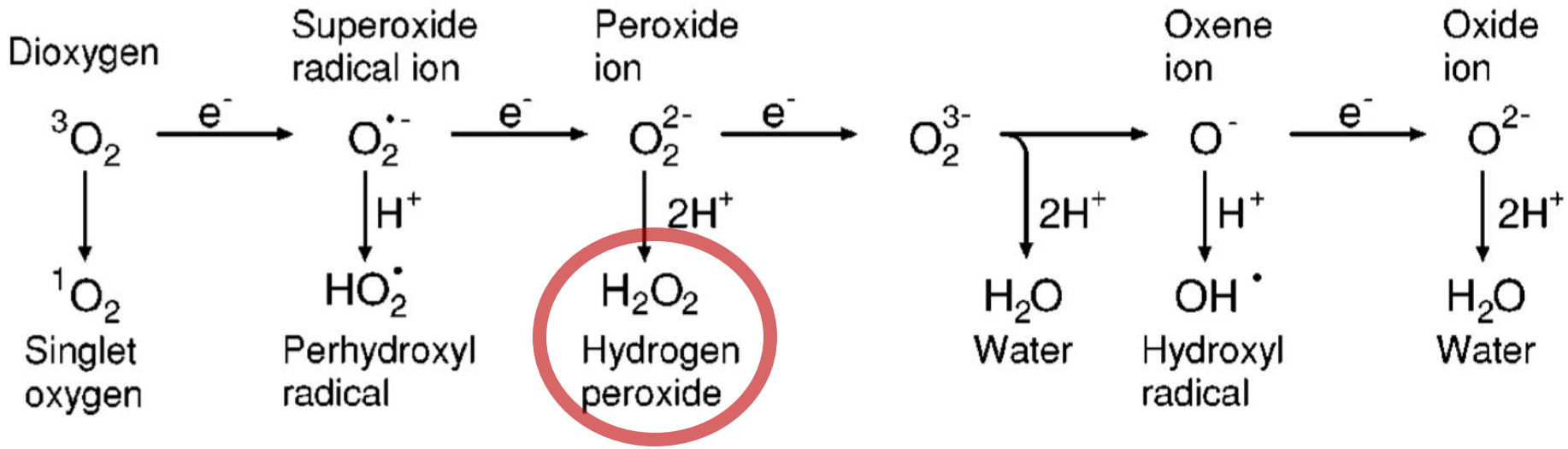
Градиент мембранного потенциала



АФК → ионный транспорт ?

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

Активные формы кислорода (АФК)

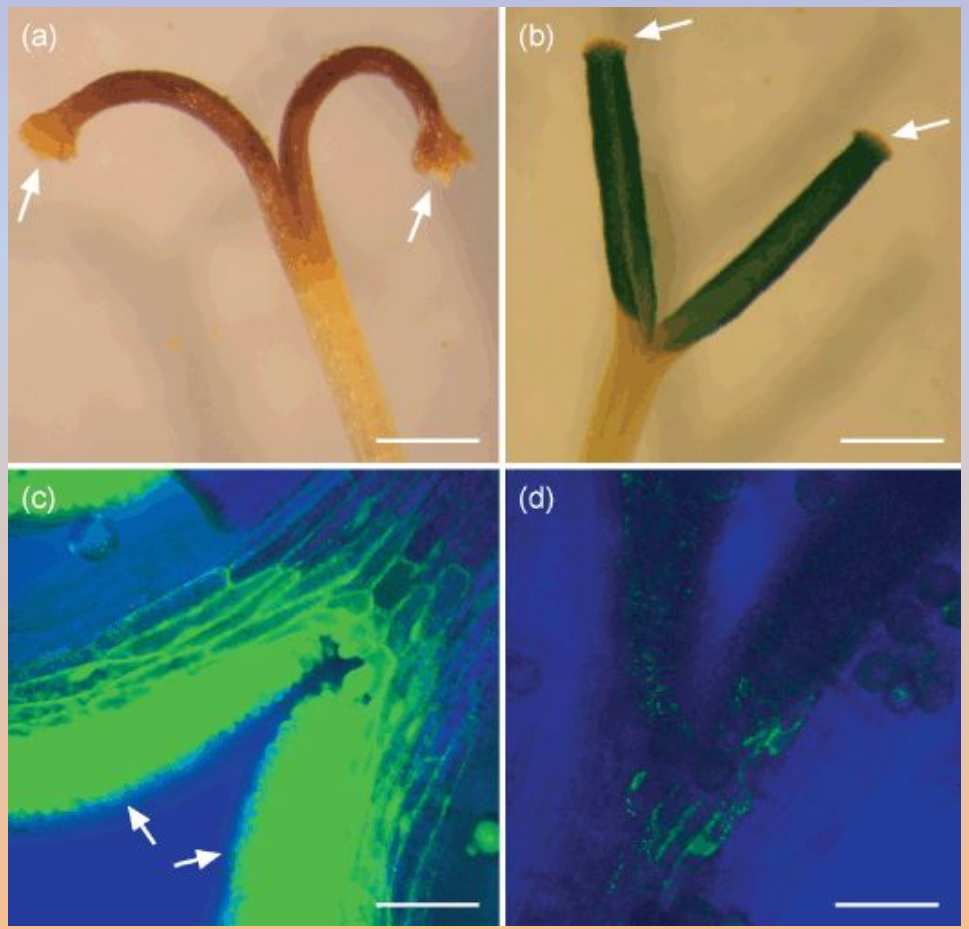


Активные формы кислорода (АФК) - высокореакционные, метастабильными агенты (молекулы, ионы, радикалы), обладающие избыточной энергией по отношению к молекулярному триплетному кислороду ($^3O_2$).

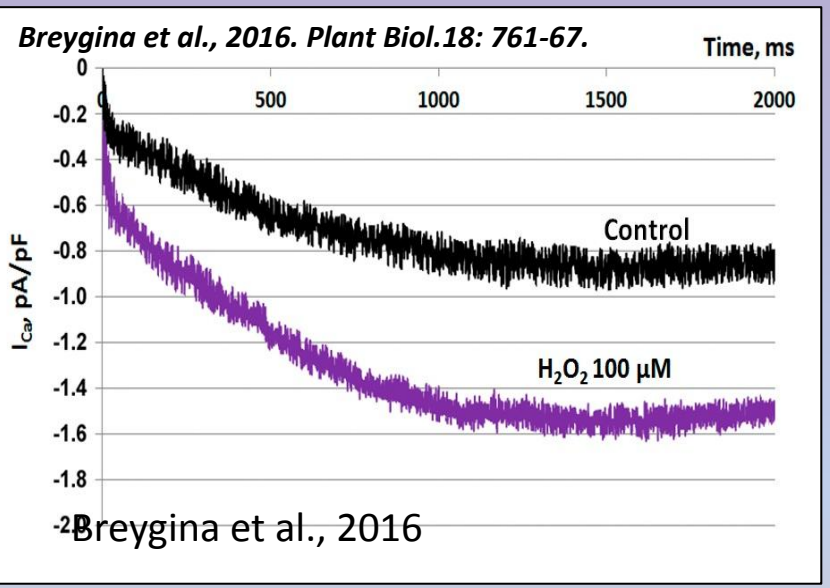
K. Apel, H. Hirt, Annu. Rev. Plant Biol. 2004 55:373-399

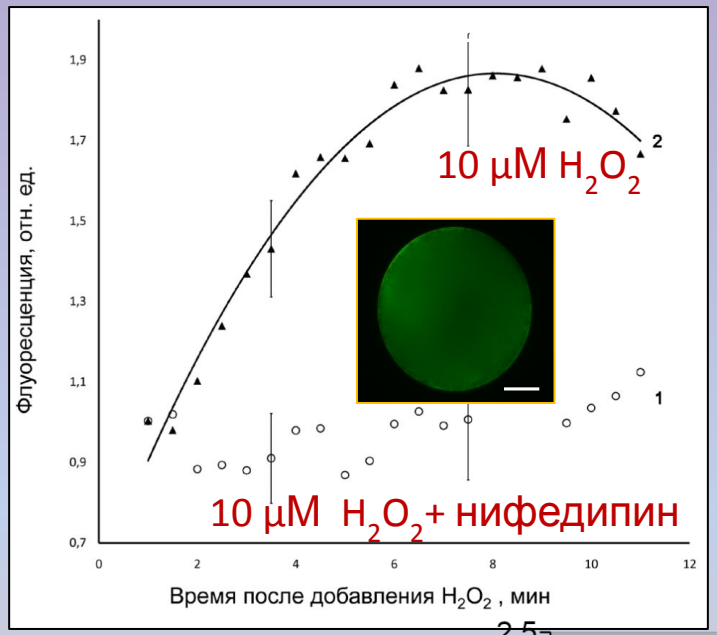
АФК и пероксидазы на рыльце

Пероксидазы и АФК накапливаются при подготовке к опылению.

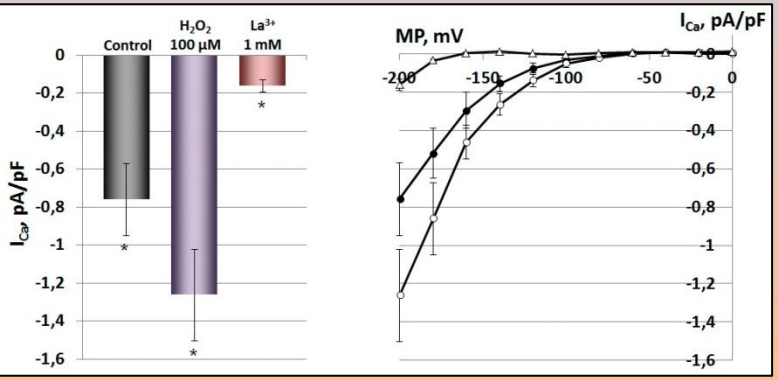


АФК как сигнал: H_2O_2 активирует Ca^{2+} ток и вход Ca^{2+} в цитоплазму

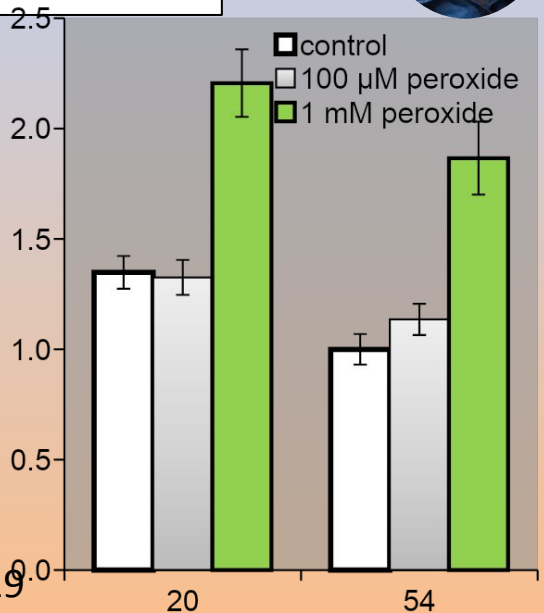




H_2O_2-активируемый входящий Ca^{2+} ток в протопластах лилии

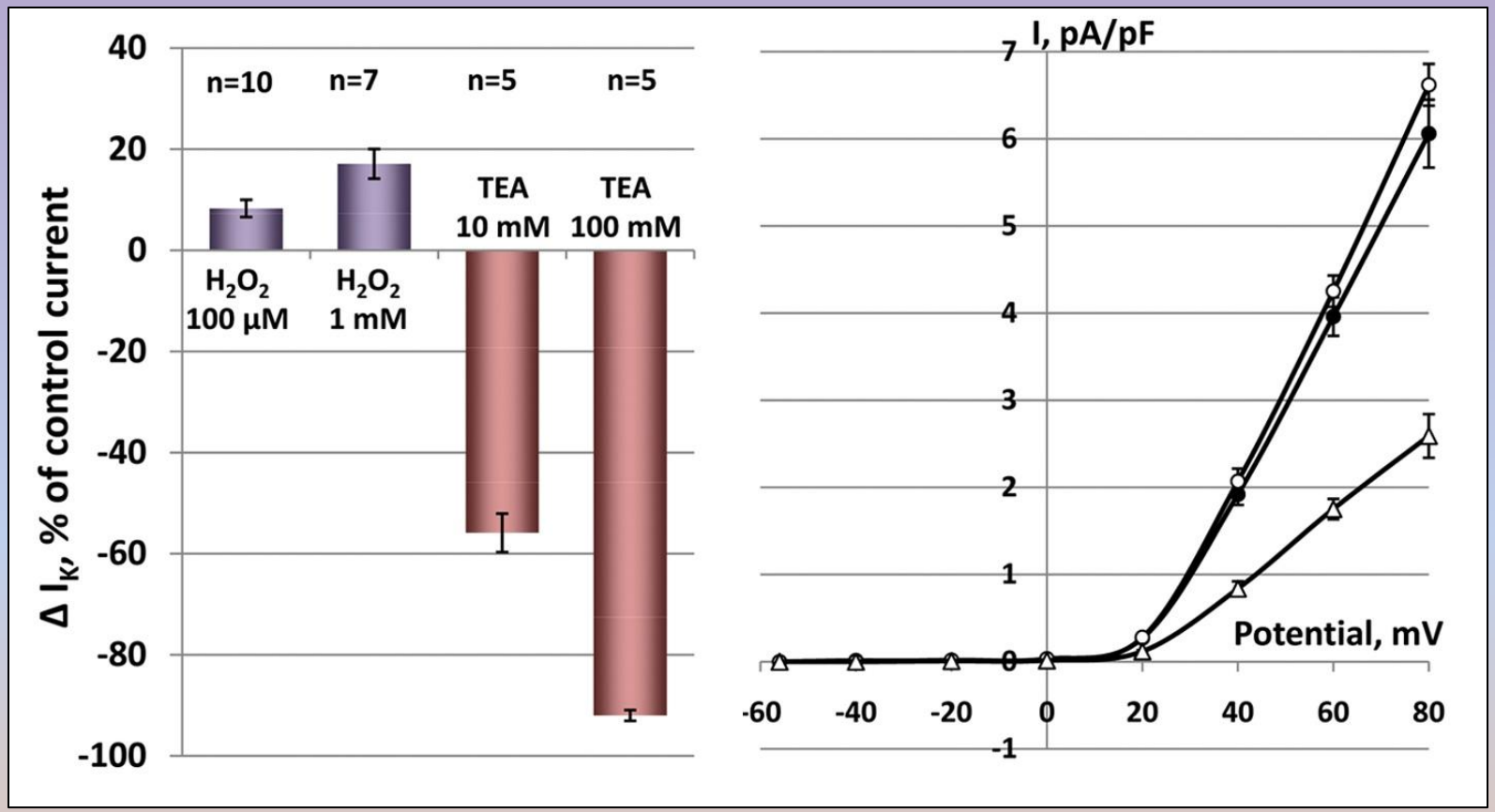


H_2O_2-индуцированный вход Ca^{2+} в цитоплазму (краситель Fluo-3) в протопластах табака и трубках лилии



Podolyan et al., 2019

АФК как сигнал: H_2O_2 активирует ток K^+

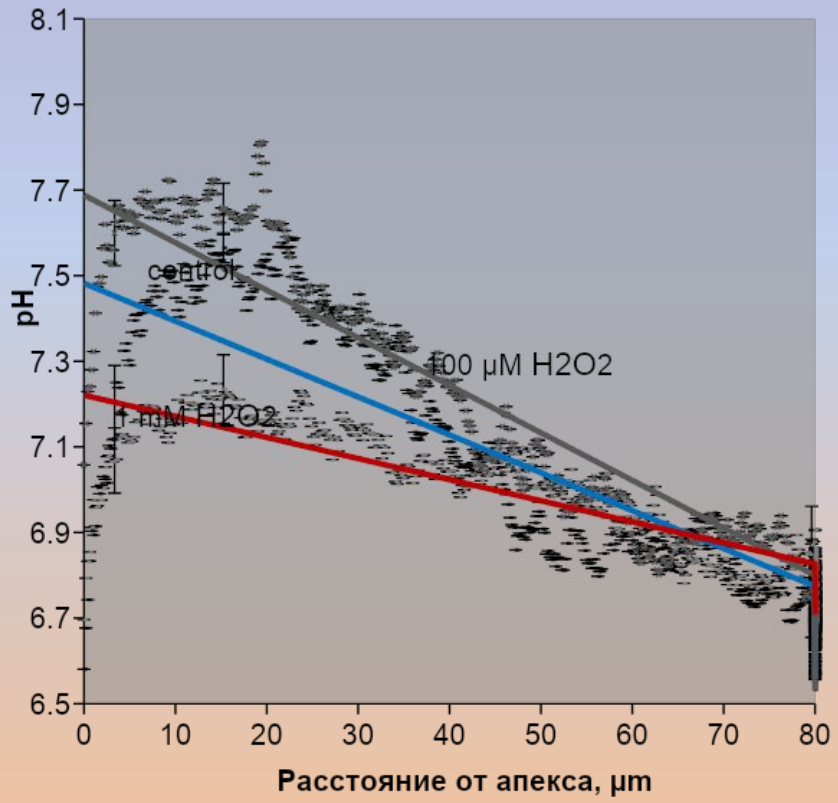


Сравнение средней плотности тока при (в % от контроля).

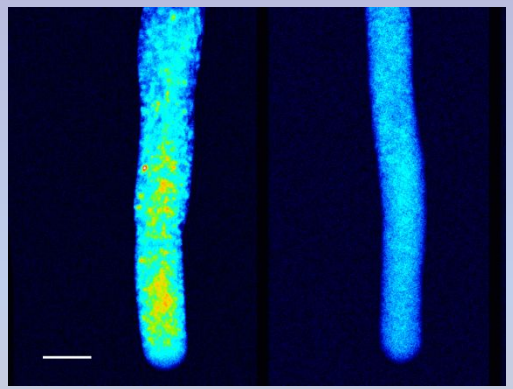
H_2O_2 – активирует K^+ ток; TEA – ингибитор K^+ каналов, блокирует ток. Все отличия достоверны ($p < 0.05$ критерий Уилкоксона).

Средние вольт-амперные характеристики выходного K^+ тока.

АФК как сигнал: H_2O_2 убирает в трубках «щелочной поясок»



Podolyan et al., 2019



контроль H_2O_2

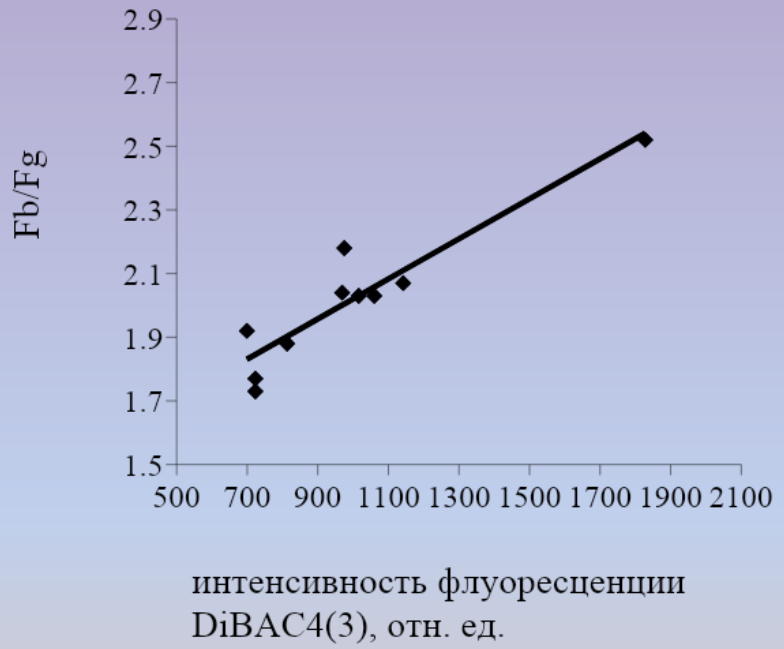
- В растущих трубках лилии вслед за массированным входом кальция происходит сглаживание градиента pH, что указывает на ингибирование H^+-АТФазы

Два оптических метода оценки E_m

<u>Ратиометрический быстрый краситель Di-4-ANEPPS:</u>

✔Съемка в двух каналах при возбуждении синим (Fb) и зелёным (Fg) светом – нет зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя;

✔Не выцветает и быстро реагирует на изменения – позволяет регистрировать динамику.



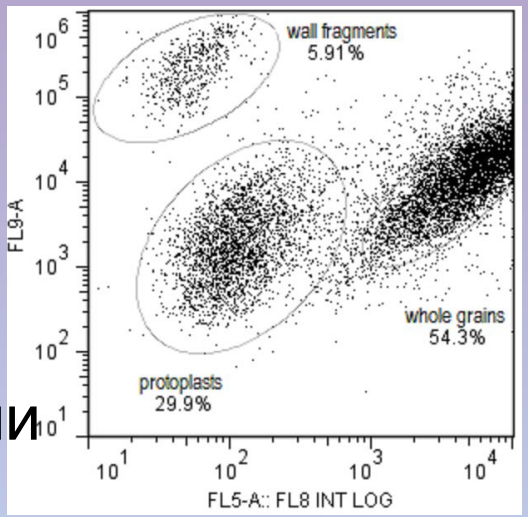
<u>Медленный краситель $DiBAC_4(3)$:</u>

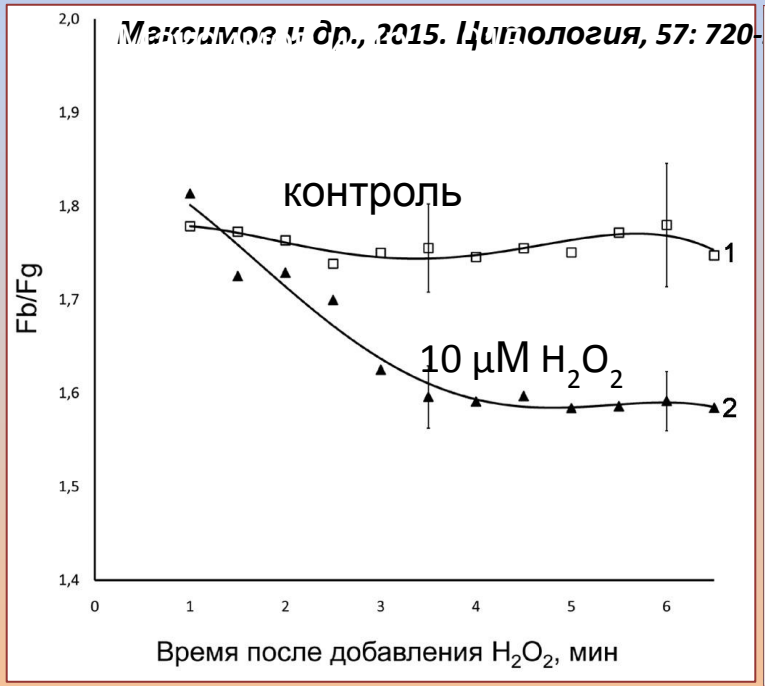
✔ позволяет определить абсолютные значения E_m (расчет ведется относительно полностью деполяризованных клеток)

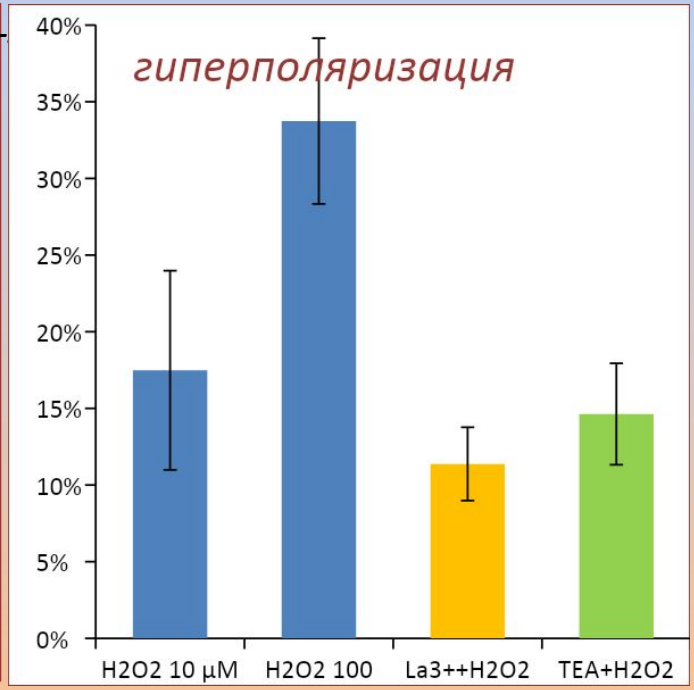
✔Прост в использовании: позволяет работать с большими популяциями клеток, набирая статистические данные.

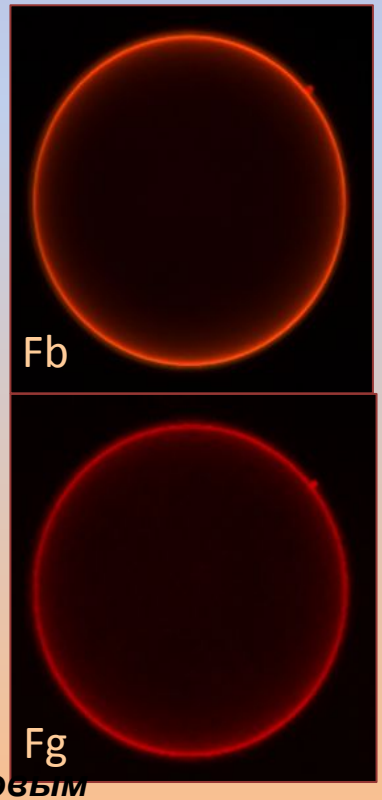
АФК как сигнал: H_2O_2 вызывает гиперполяризацию

- Количественная флуоресцентная микроскопия: динамика эффекта
- Проточная цитометрия с красителем $DiBAC_4(3)$: исследование большой популяции протопластов



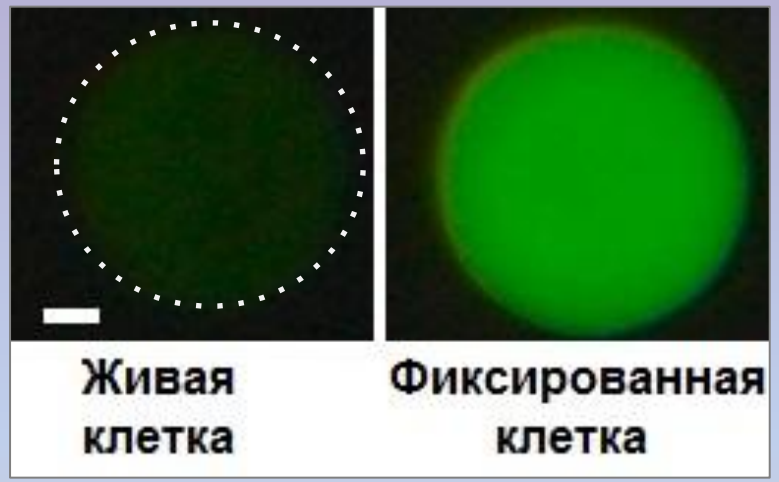


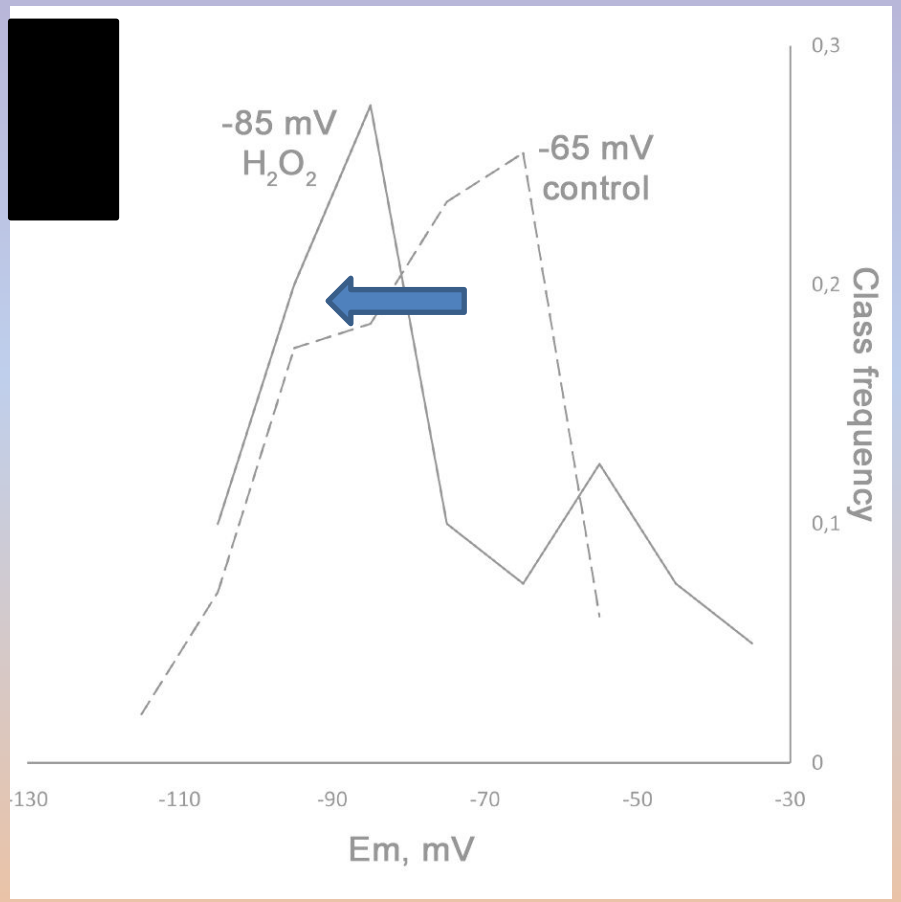




Данные получены в сотрудничестве с Е.Шиловым

АФК как сигнал: H_2O_2 вызывает гиперполяризацию

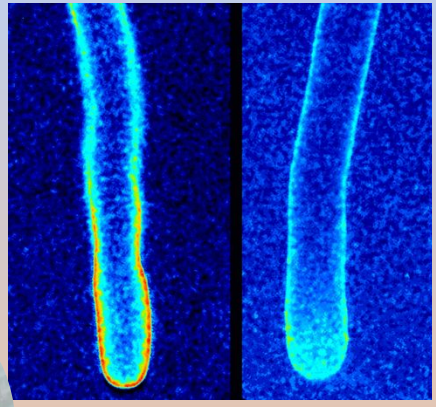




После 10 минут инкубации происходит достоверное смещение популяции в область более отрицательного потенциала.

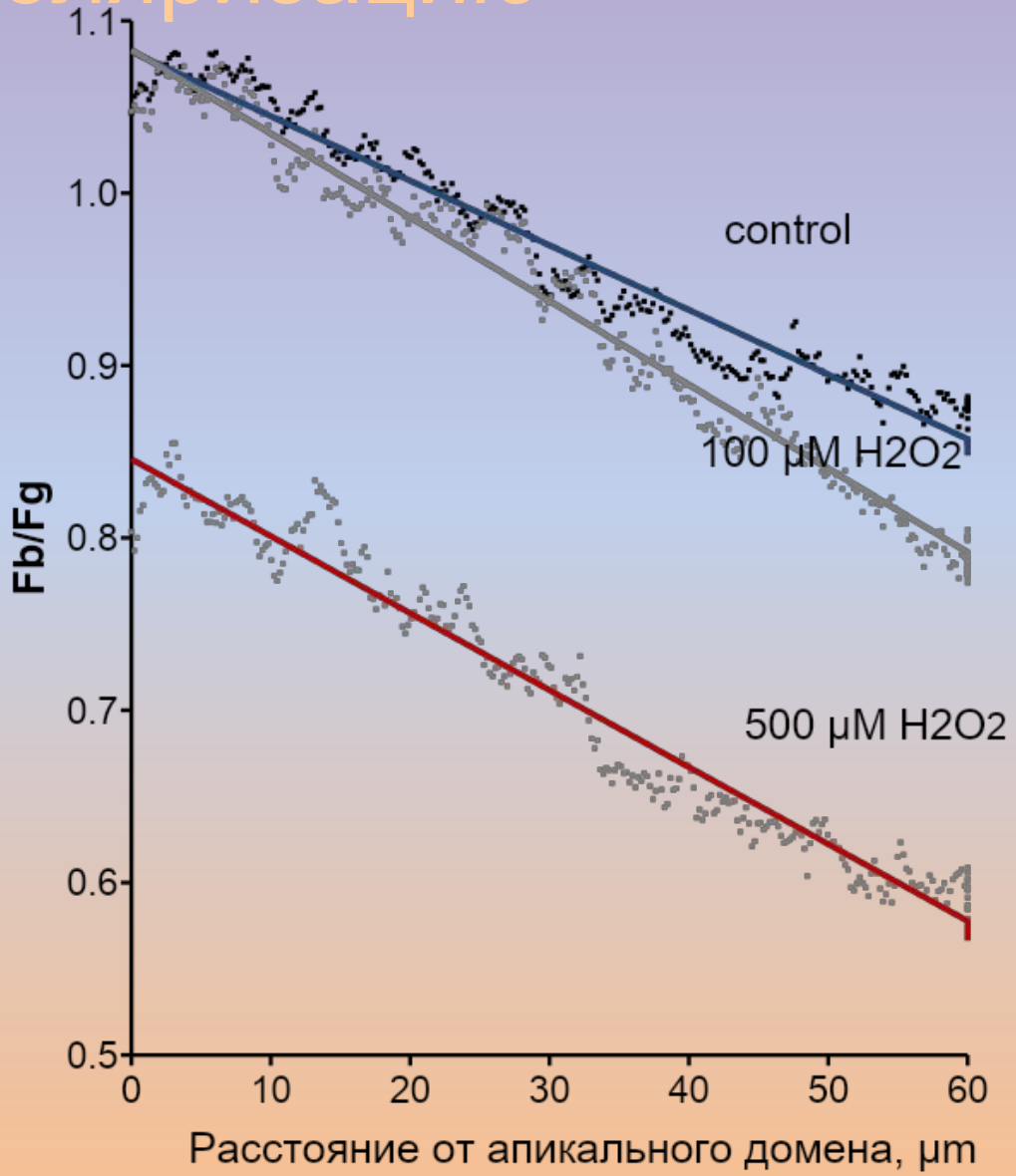
АФК как сигнал: H_2O_2 вызывает гиперполяризацию

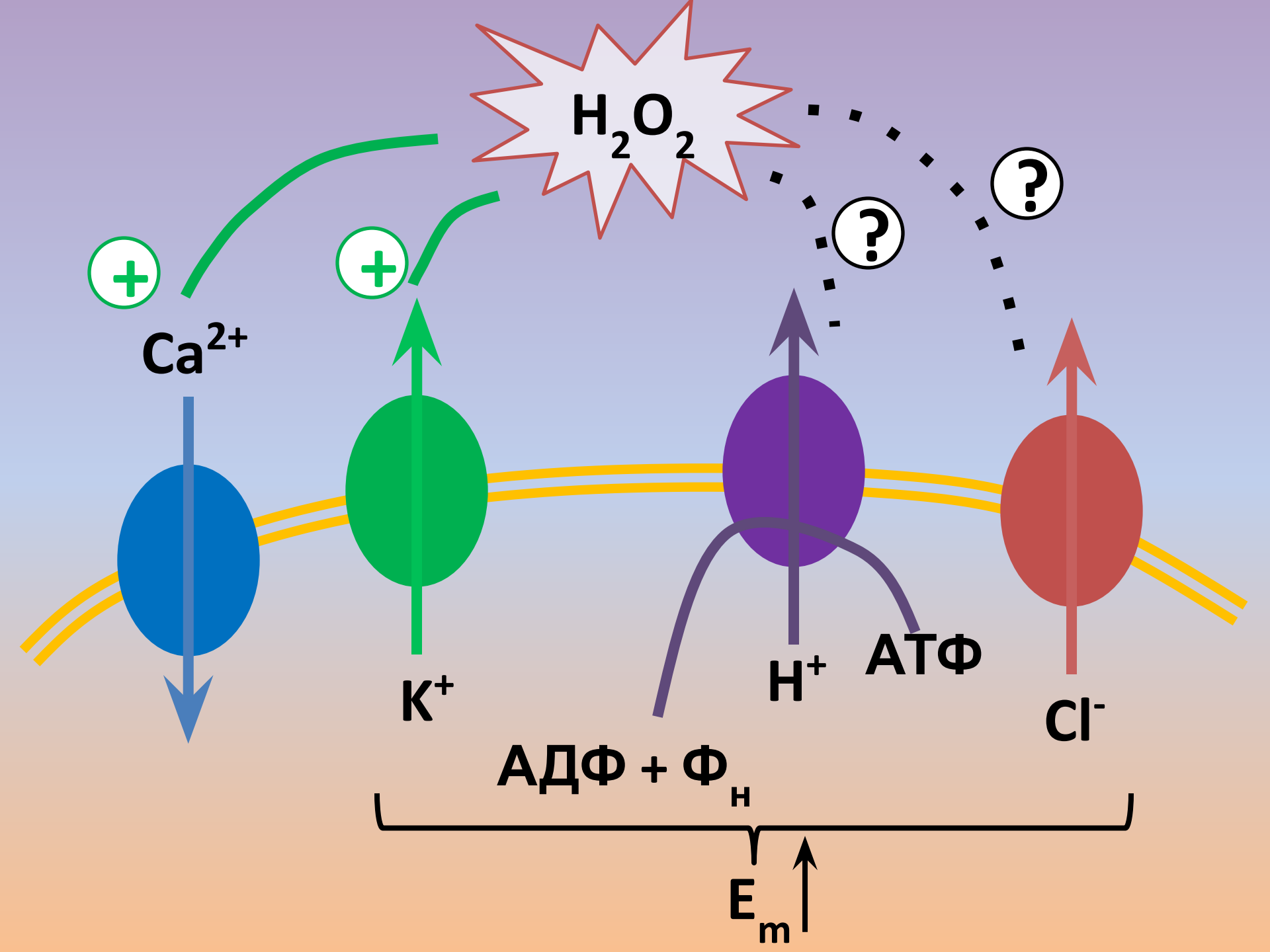
- Количественная флуоресцентная микроскопия с красителем di-4-ANEPPS: интактные растущие трубки лилии



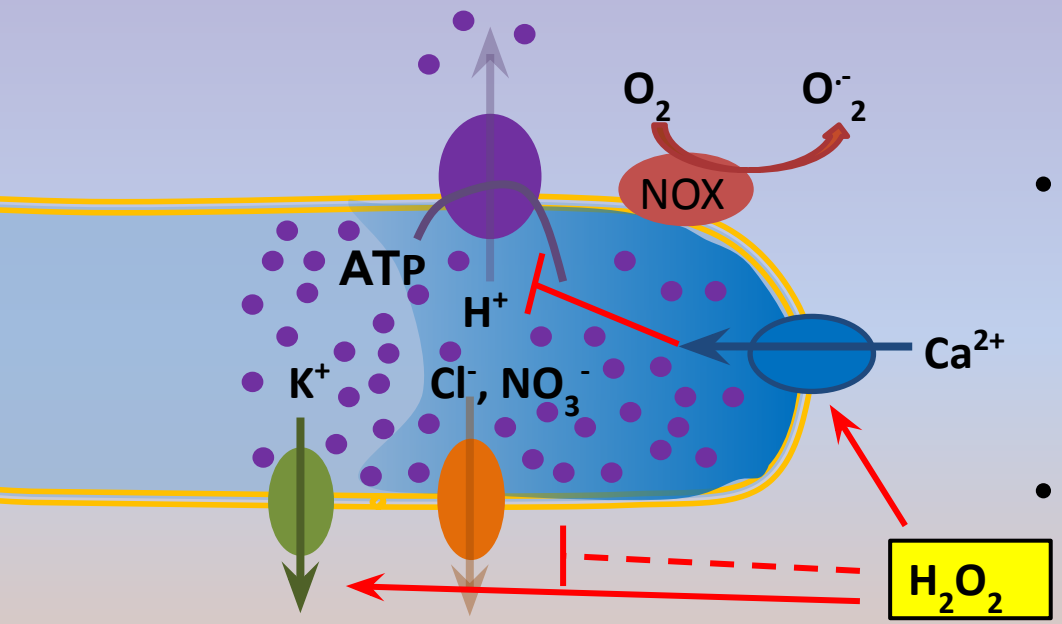
контроль 500 μM H_2O_2

Podolyan et al., 2019

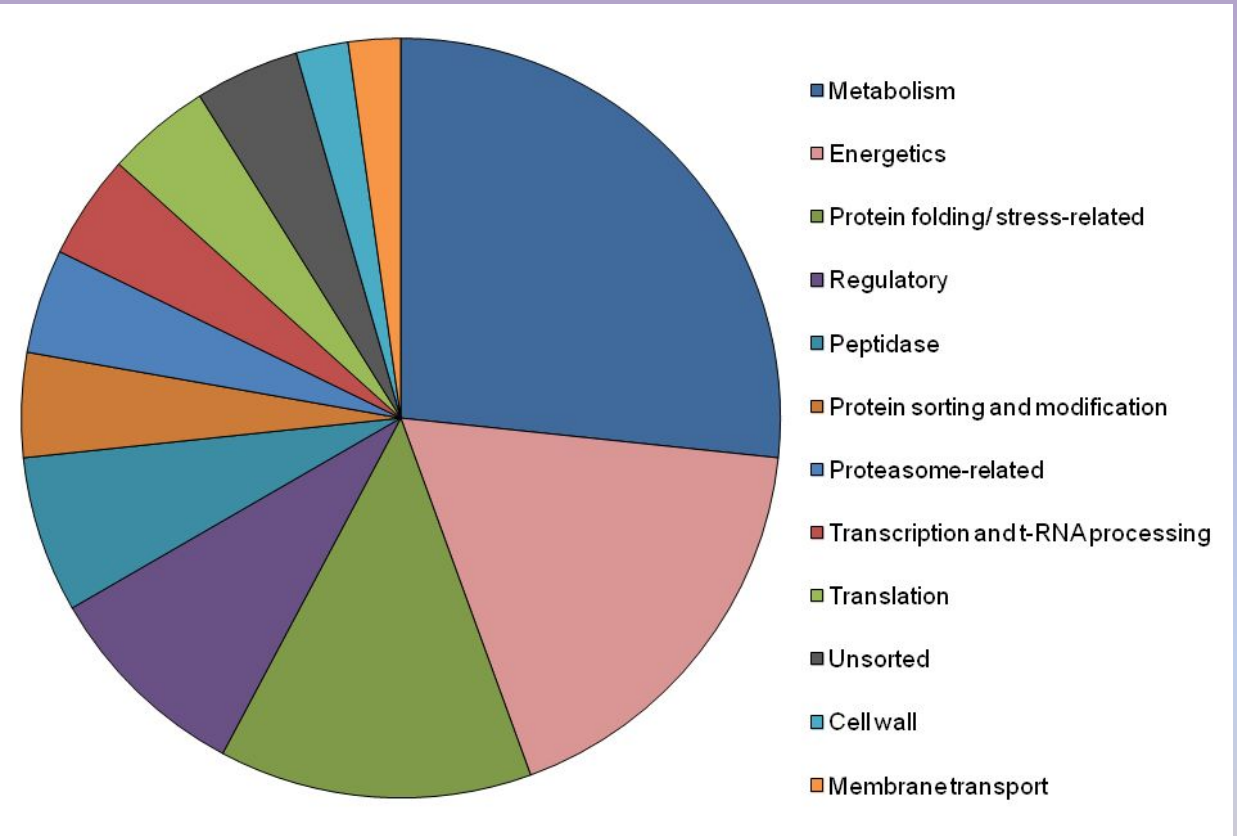



H_2O_2
?
?
+
+
Ca^{2+}
K^+
H^+
АТФ
Cl^-
АДФ + $Ф_н$
E_m

АФК как сигнал: H_2O_2 вызывают перестройку всех градиентов



- В трубке ион-транспортные системы расположены полярно
- Они формируют в цитоплазме динамичные градиенты концентраций, а на мембране – градиент МП
- АФК-сигнал, приходя в трубку, меняет прямо или косвенно работу практически всех ион-транспортных систем
- Тем самым АФК вызывают перестройку внутренних градиентов



- Пероксид водорода вызывает изменения протеома пыльцы. Появляются более 50 белков, которых не было в контроле.
- Основные направления: энергетика, метаболизм, синтез белка
- Всё для активного роста!
- Ни одного антиоксиданта!

АФК как сигнал: протеомика

Данные получены в лабораторией протеомики ИБХ РАН

Цветковые VS Хвойные

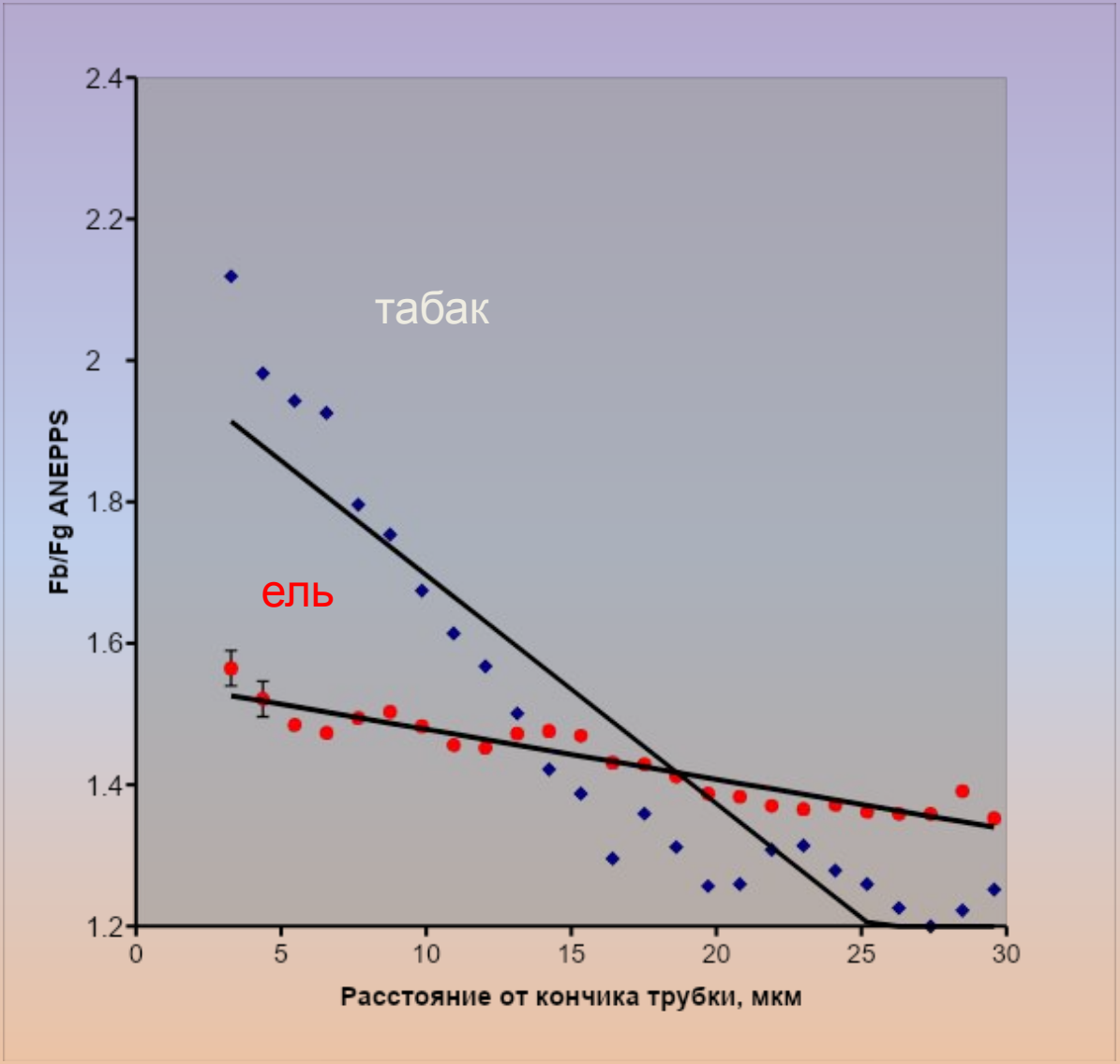
Цветковые

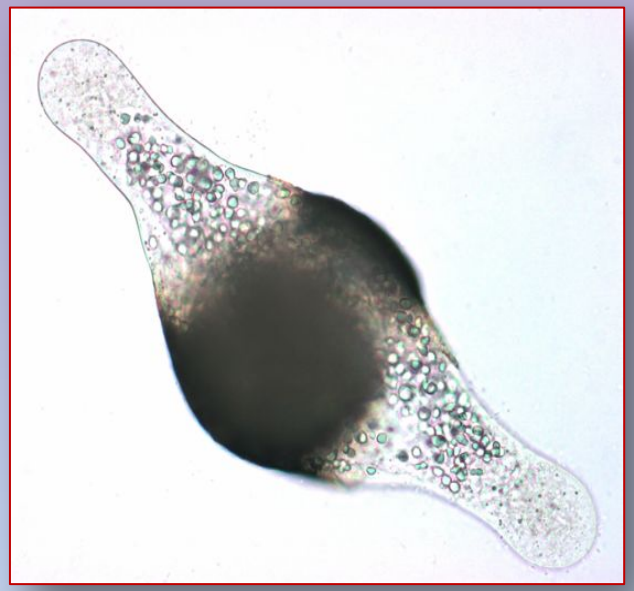
- Изученный модельный объект
- Быстрый рост
- Униполярный рост
- Обращенный фонтан
- Крутой градиент Ca^{2+}
- Крутой градиент МП
- *Зависимость от межклеточного взаимодействия*

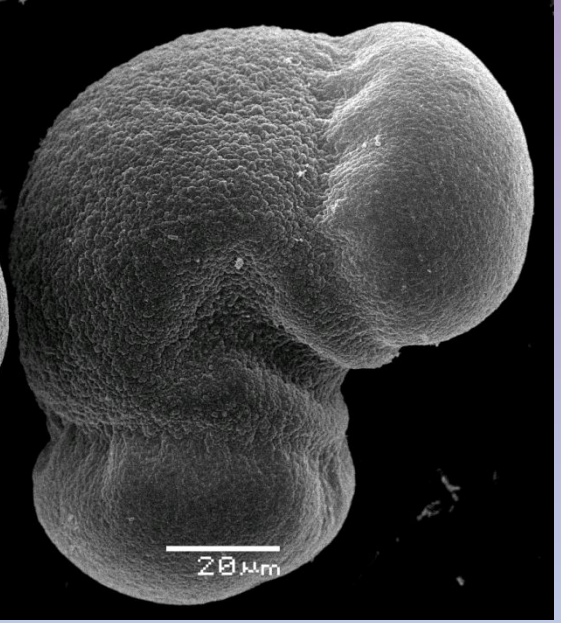
Хвойные

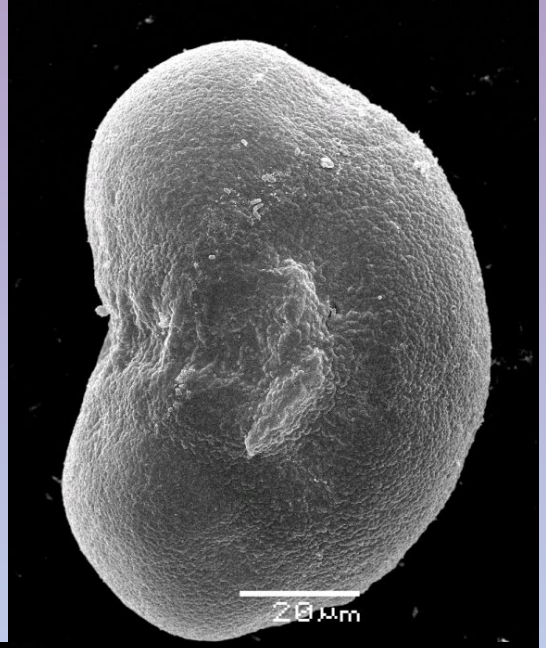
- Относительно новый объект
- Медленный рост
- Возможность биполярного роста
- Прямой фонтан
- Плавный градиент Ca^{2+}
- Плавный градиент МП
- *Больше «автономности»*

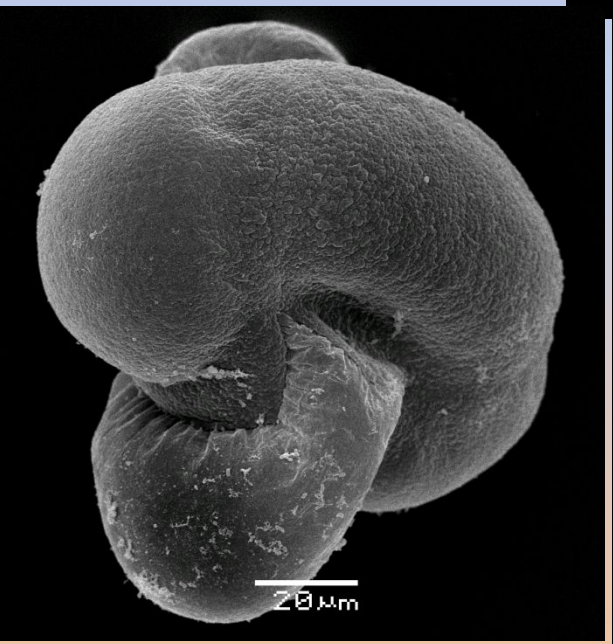
Градиент мембранного потенциала

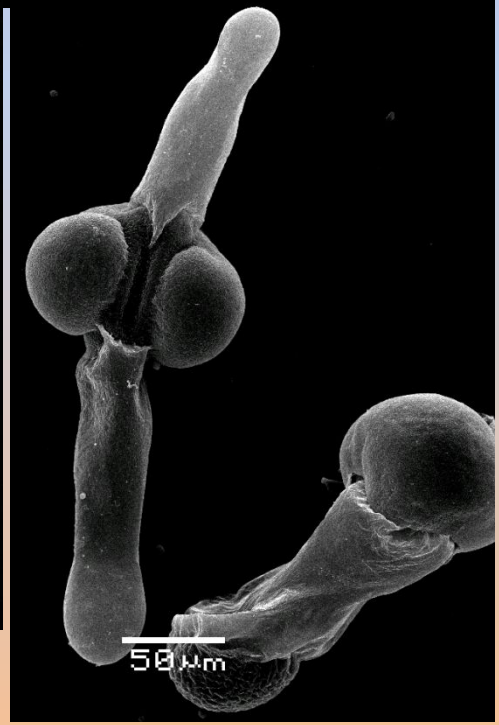








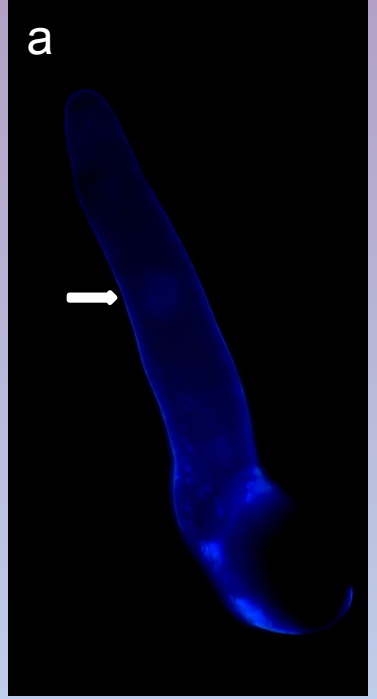


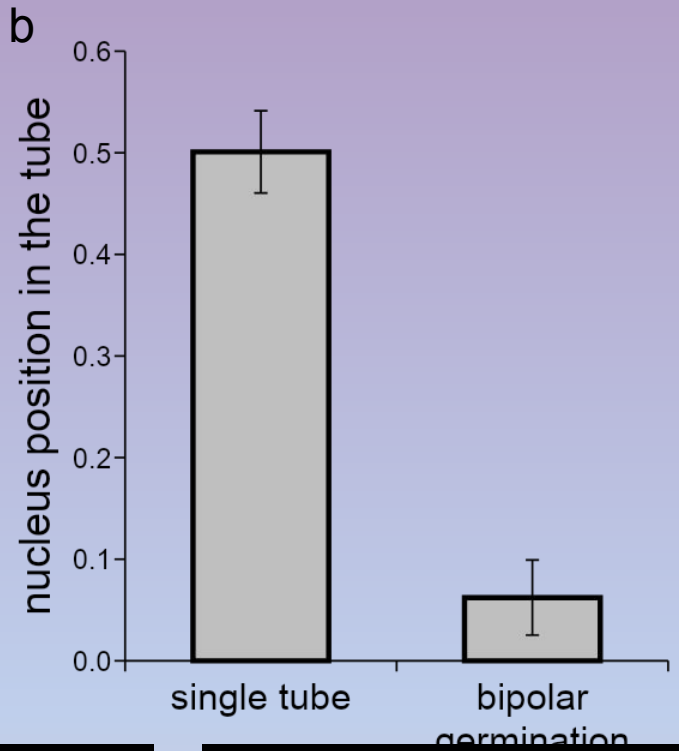


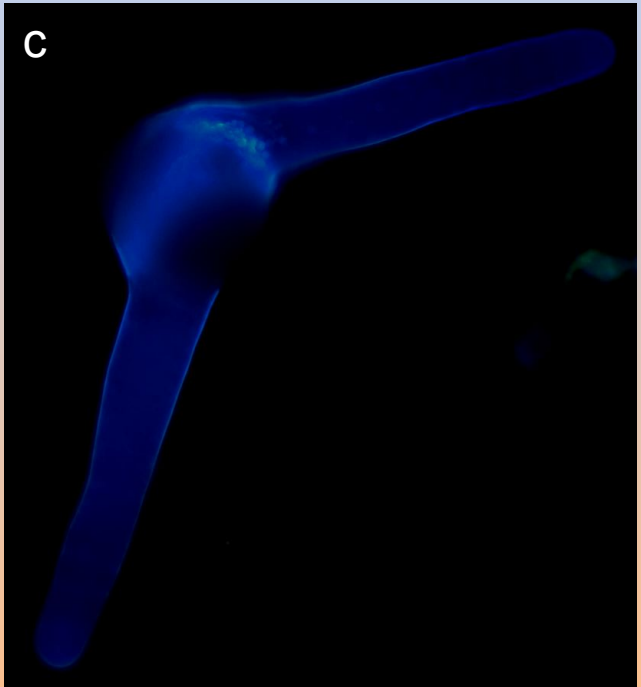
Breygina et al., 2019
(в соавторстве с Полевовой С.В.)

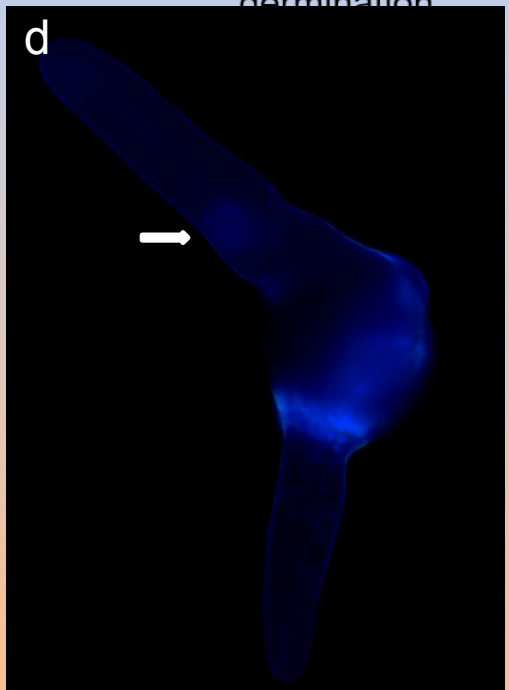
Биполярное прорастание у ели

Биполярное прорастание : ядро





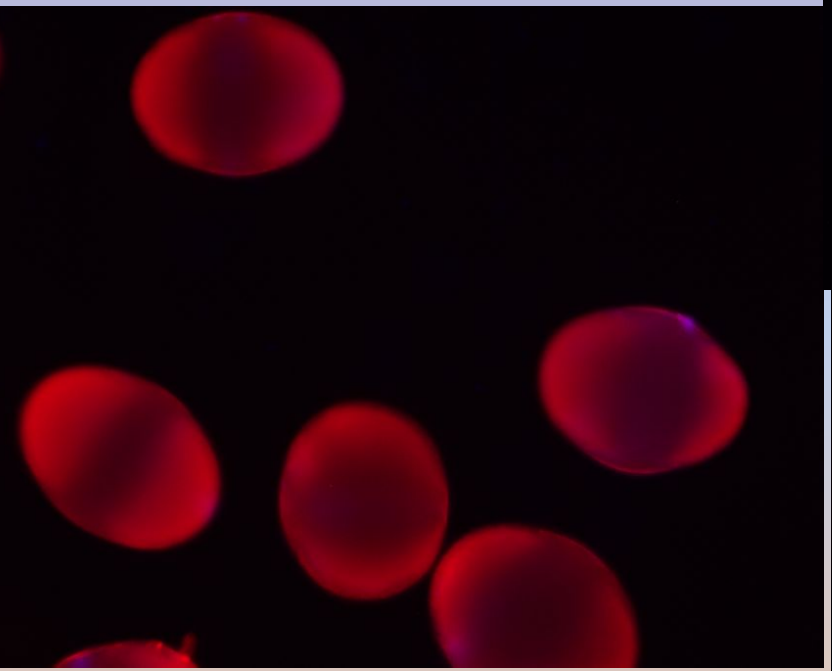


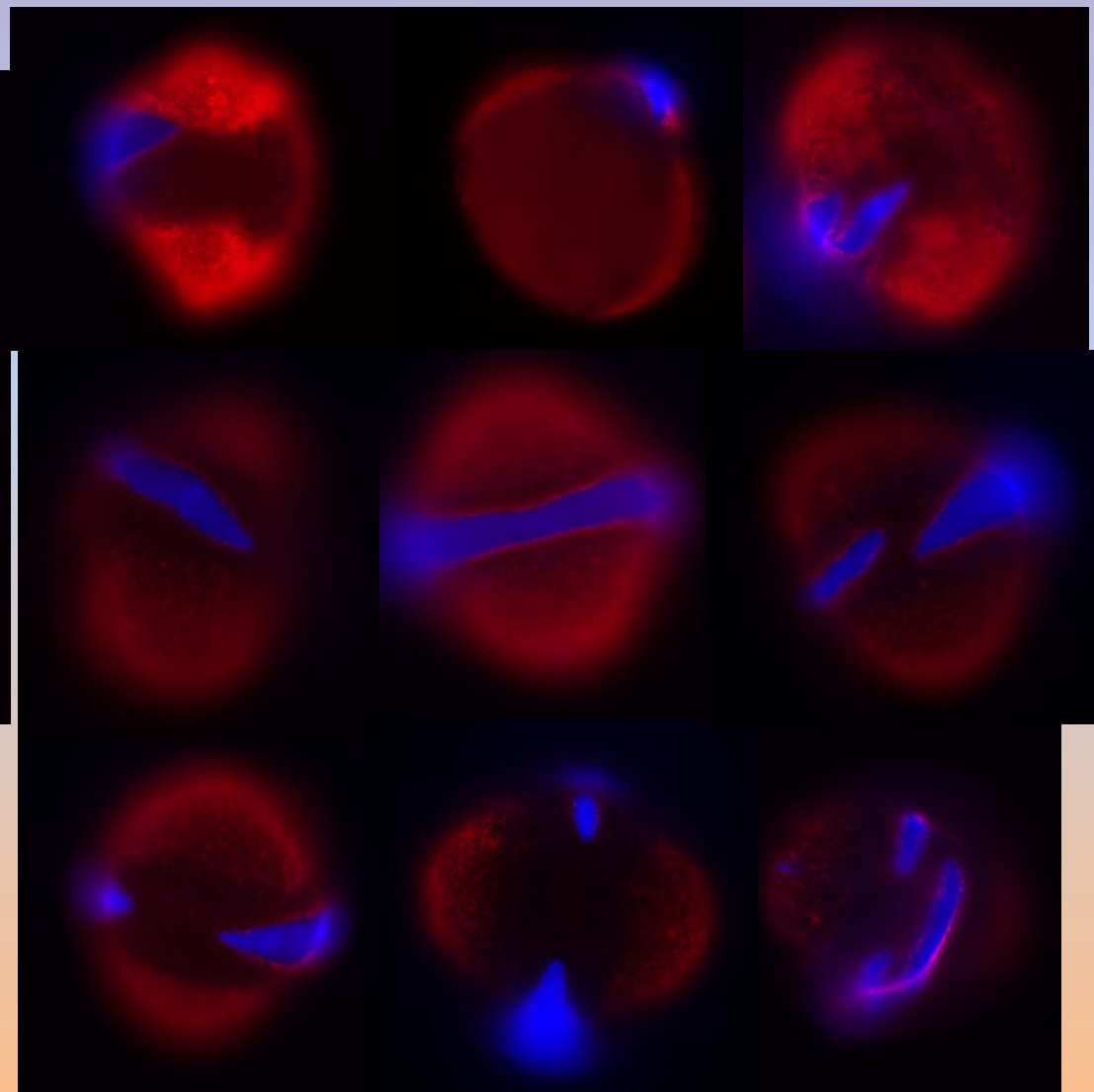


- Две трубки, а МГМ один. Куда же он пойдет?
- Он тоже сомневается …

Биполярное прорастание: динамика

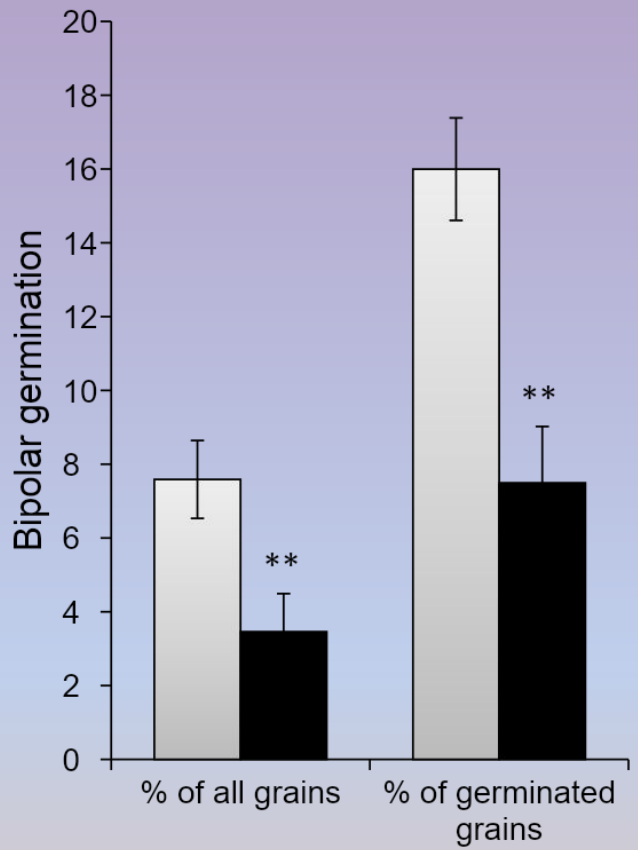
Breygina et al., 2019

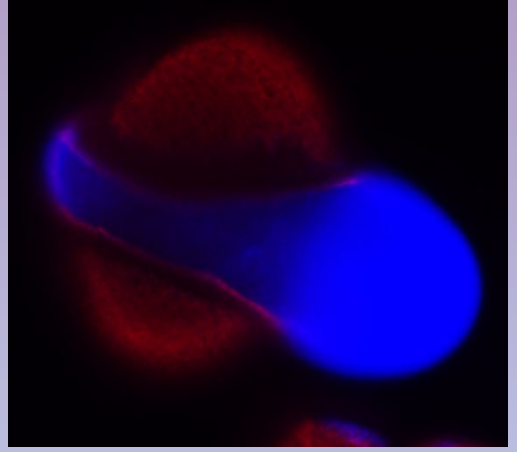


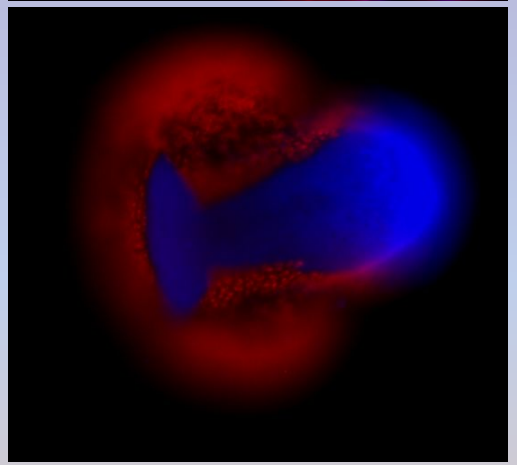


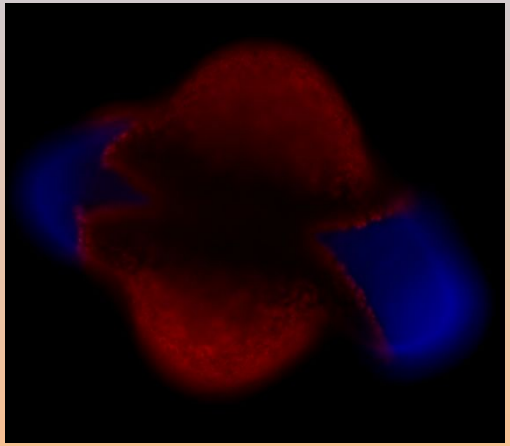
- 2 часа
- 6 часов
- 9 часов

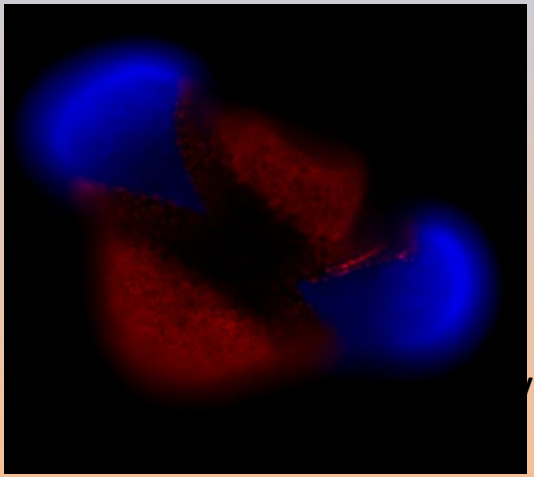
Сколько разрывов – столько и трубок











Биполярное прорастание : почему?

- Биполярное прорастание характерно для мешковой пыльцы
- Мы описали феномен и посмотрели, можно ли на него повлиять
- Снова АФК!

ygina et al., 2019