

УДК 582.47:58.085:581.162.41

DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-20-34

РОСТ И РАЗВИТИЕ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*Juniperus communis*): РОЛЬ ЯДРА КЛЕТКИ ТРУБКИ

М.В. Сурсо¹, д-р с.-х. наук; ResearcherID: J-2197-2018,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7482-9848>

Д.Г. Чухчин², канд. техн. наук, проф.; ResearcherID: O-9487-2015,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3250-8469>

¹Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики РАН, наб. Северной Двины, д. 23, г. Архангельск, Россия, 163000; e-mail: surso@fciarctic.ru

²Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, д. 17, г. Архангельск, Россия, 163000; e-mail: dimatsch@mail.ru

Предпринята попытка на примере можжевельника обыкновенного выяснить функциональное значение ядра клетки трубки и его связь со структурами пыльцевой трубки у голосеменных растений. Пыльцевые трубки можжевельника в культуре *in vitro* изучались методами световой микроскопии (проходящий свет, флуоресценция) и инфракрасной Фурье-спектроскопии. Дано краткое описание процесса роста и развития пыльцевых трубок можжевельника. Опыты по ферментативному разрушению стенки пыльцевой трубки позволили выявить взаимосвязь генеративного ядра с протопластом, ассоциированным с ядром клетки трубки. Установлено, что генеративное ядро довольно прочно связано с протопластом ядра клетки трубки силой поверхностного натяжения внутренних мембран. Доказано, что протопласт и оба ядра некоторое время сохраняют нативность вне тела трубки после лизиса ее кончика. Однако ни генеративное ядро, ни ядро клетки трубки не могут самостоятельно функционировать вне протопласта пыльцевой трубки. Микрофибриллы актинового цитоскелета распределены во внутреннем объеме трубки неравномерно, большая их часть сконцентрирована в центральной части трубки и ассоциирована с ядром клетки трубки и протопластом. В составе пластид преобладают лейкопласты, в основном это амилопласты, большая часть которых сконцентрирована вокруг ядра клетки трубки. Протопласт содержит большое количество митохондрий. Лизосомы распределены по всему объему пыльцевой трубки более или менее равномерно, однако значительная их часть, особенно у активно растущих трубок, скапливается вокруг ядра клетки трубки и вблизи кончика трубки. Использование в качестве маркера дейтерия позволило установить последовательность синтеза и локализацию синтезируемых веществ в процессе роста пыльцевой трубки. Повышенное содержание дейтерия наблюдалось в зоне протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки. На основе новых экспериментальных данных высказано предположение, что, возможно, ядро клетки трубки контролирует синтез органических веществ и их распределение в теле трубки. Вероятно, ядро клетки трубки способствует ее полярному росту и ориентирует во времени и пространстве рост кончика трубки *in vivo*.

Для цитирования: Сурсо М.В., Чухчин Д.Г. Рост и развитие пыльцевой трубки можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis*): роль ядра клетки трубки // Изв. вузов. Лесн. журн. 2020. № 2. С. 20–34. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-20-34

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 18-04-00056. Образцы пыльцы собраны при проведении экспедиционных работ в рамках ФНИР по государственному заданию ФИЦКИА РАН (тема №0409-2019-0039), № гос. регистрации – АААА-А18-118011690221-0.

Благодарность: Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова.

Ключевые слова: можжевельник, пыльцевая трубка, ядро клетки трубки, инфракрасная спектроскопия, дейтерий, ферментативный гидролиз.

Введение

Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок являются важнейшим этапом в репродуктивной деятельности растений. У семенных растений пыльцевая трубка служит средством доставки мужских гамет к яйцеклетке, в пыльцевой трубке в большинстве случаев происходят заключительные этапы микрогаметогенеза. Поэтому пыльцевые трубки служат удобным лабораторным объектом при изучении физиолого-биохимических и структурно-динамических процессов в растительных клетках (например, полярности, апикального роста клеток, циркуляции цитоплазмы, транспорта ионов) [22, 24]. Вместе с тем у большинства голосеменных через кончики пыльцевых трубок, проникающих вглубь нуцеллуса семязачатков, выделяются гидролитические ферменты, способствующие лизису клеток тканей нуцеллуса. Продукты этого катаболизма служат питательной средой для нормального роста и развития пыльцевой трубки. Таким образом, пыльцевая трубка голосеменных осуществляет гетеротрофный тип питания, являясь по сути, эндопаразитом. В связи с этим для нее, как и для клеток некоторых других эмбриональных тканей, термин «растительная клетка» можно использовать лишь с определенными оговорками.

Взгляды на процессы роста и развития пыльцевых трубок со времен Амичи претерпели значительную эволюцию. Современные представления о развитии пыльцевых трубок основаны главным образом на экспериментах с проращиванием *in vitro* пыльцы покрытосеменных растений. В последние годы активно проводятся исследования роли филаментозных протеинов в прорастании пыльцы и росте пыльцевых трубок, связи микрофиламентов актинового цитоскелета с ядерными структурами, циркуляцией цитоплазмы [6, 18, 20, 35], транспорта везикул, эндо- и экзоцитоза в пыльцевых трубках [2, 4, 28, 29, 38]. Изучаются транспорт ионов и полярный рост пыльцевых трубок [5, 16, 19, 21, 23, 37, 39], роль ферментов в регуляции роста пыльцевых трубок и в процессах перемещения ядер и спермиев в растущих пыльцевых трубках [15, 25, 40]. В настоящее время для анализа состава пыльцы и пыльцевых трубок широко используется FTIR-спектроскопия (инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием), позволяющая интерпретировать определенные пики инфракрасных спектров [1, 3, 9, 26, 32, 41]. Все перечисленные исследования, выполненные на высоком техническом уровне, отвечают на вопрос «как?», но не говорят «почему?».

Роль генеративного ядра пыльцевой трубки голосеменных вполне понятна [31], однако функциональное значение ядра клетки трубки не столь очевидно. В этой статье сделана попытка дать теоретическое обоснование возможной роли ядра клетки трубки в росте и развитии пыльцевой трубки у можжевельника обыкновенного. Следует отметить, что процессы развития пыльцевых трубок *in vitro* у можжевельника обыкновенного изучены недостаточно. Известно

лишь несколько экспериментальных работ, посвященных механизму сбрасывания экзины при прорастании пыльцы, особенностям роста пыльцевых трубок и микрогаметогенезу у можжевельника [10–14, 30, 33, 34]. Для понимания функции ядра клетки трубки важно знать эти процессы, поэтому их описанию в статье уделено определенное внимание.

У видов сем. Cupressaceae зрелая пыльца обычно 2-клеточная [7, 8, 17], однако пыльцевые зерна можжевельника являются одноклеточными структурами, представляя собой не проросшие в микрогаметофит микроспоры. При инкубировании пыльцы в dH_2O , а также в водных растворах сахарозы или минеральных солей развитие пыльцевых трубок чаще всего заканчивается на стадии «туфельки». На агаровых средах, содержащих сахарозу, продолжительность роста пыльцевых трубок ограничена лишь динамикой развития микрофлоры, избежать которого сложно из-за естественного фона грибных спор, содержащихся в образцах пыльцы [33].

Цель исследования – описание развития пыльцевой трубки можжевельника обыкновенного и выяснение возможной роли ядра клетки трубки и ассоциированного с ним протопласта в этом процессе.

Объекты и методы исследования

Световая микроскопия. Пыльцу проращивали *in vitro* в течение 168 ч во влажных камерах (чашки Петри) в термостате при температуре 26,5 °C на 1,0 % агаре с добавлением 5,0 % (w/v) сахарозы. Проросшую пыльцу смывали с поверхности геля и 3 раза промывали в dH_2O . Неокрашенные или окрашенные 2,5 % (w/v) водным раствором щелочного синего (или 0,25 % (w/v) водным раствором сафранина) пыльцевые трубки на разных стадиях развития просматривали в проходящем свете на микроскопе AxioScope A1 («Carl Zeiss», Германия). При изучении актинового цитоскелета пыльцевые трубки фиксировали в 4,0 % (w/v) растворе параформальдегида в актистабилизирующем буфере, содержащем 100 mM Pipes, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ и 75 mM KCl (pH 6,9), в течение 1 ч. Затем образцы трижды промывали в фосфатном буфере и инкубировали в темноте в растворе 0,2 нМ TRITC-фаллоидин в фосфатном буфере в течение 1 ч. Микрофиламенты актинового цитоскелета в пыльцевых трубках визуализировали на флуоресцентном микроскопе Altam Lum 1LED (светофильтр В, 420...485 нм). При изучении ядерных структур пыльцевые трубки инкубировали в растворе 300 нМ DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) в dH_2O в течение 0,5 ч в темноте и после 3-кратной промывки в dH_2O просматривали на флуоресцентном микроскопе Altam Lum 1LED (светофильтр UV, 330...400 нм).

Ферментативный гидролиз полисахаридов клеточных стенок пыльцевых трубок. Проводили с помощью ламинариазы (катализирует гидролиз каллозы), пектинлиазы (катализирует гидролиз пектина), эндоглюконазы II (катализирует гидролиз целлюлозы) и целлюлазы (катализирует гидролиз целлюлозы). Состав препарата ламинариазы: КМЦ-аза (карбоксиметилцеллюлаза) – 3 900 ед./г; ламинариаза – 12 000 ед./г; белок – 840 мг/г. Состав препарата эндоглюконазы II: белок – 750 мг/г, КМЦ-аза – 15 000 ед./г; β -глюконаза – 10 000 ед./г; АФБ – 90 ед./г; авицелаза – 250 ед./г; целлобиаза – 50 ед./г; β -глюкозидаза – 90 ед./г. Состав препарата целлюлазы: КМЦ-аза (карбокси-

метилцеллюлаза) – 19 142 ед./г; ксиланаза – 19 671 ед./г; β -глюкозидаза – 1 173 ед./г; белок – 889 мг/г. Пыльцу проращивали, как описано выше, в течение 168 ч. В водную суспензию чистой культуры пыльцевых трубок добавляли 10 % (v/v) стокового водного раствора (10 мг/мл) соответствующего фермента. Культуры трубок инкубировали при температуре 37 °С. Препараты пыльцевых трубок после гидролиза просматривали с периодичностью примерно 2 ч в течение 8...24 ч. Препараты окрашивали в растворе 300 нМ DAPI в dH_2O .

Сканирующая электронная микроскопия. Разрушенные с помощью каталитических ферментов протопласты пыльцевых трубок 3 раза промывали в dH_2O , водную суспензию лиофильно высушивали. Образец наносили на пленку-подложку и после напыления золота просматривали на сканирующем электронном микроскопе при различных режимах увеличения.

FTIR-спектроскопия. Схема измерений показана на рис. 1.

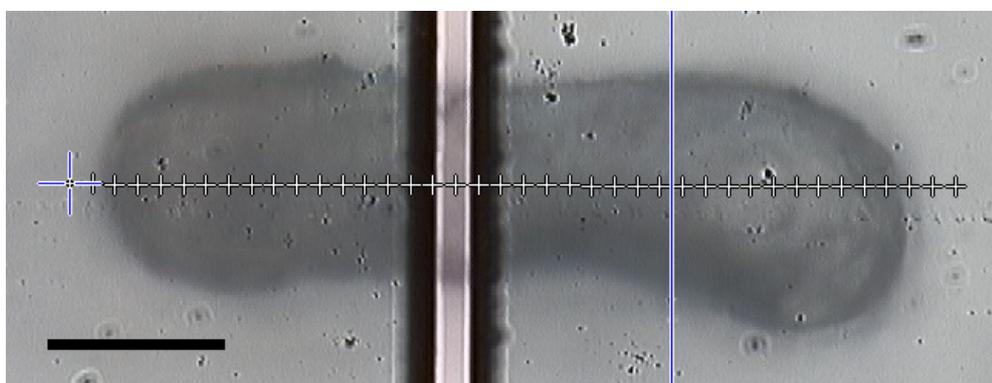


Рис. 1. Схема измерений ИК-спектров по длине пыльцевой трубки (крестиками обозначены точки автоматического позиционирования центра столика микроскопа при записи спектров; количество крестиков равно количеству полученных спектров; 40 спектров записаны последовательно слева направо; светлая вертикальная полоса (область сканирования) вырезается с помощью специальной апертуры, пластины которой (более темные области) поглощают ИК-излучение и пропускают видимый свет; в качестве фона, относительно которого проводилась запись, использована та же апертура с полосой сканирования, проходящей мимо объекта исследования.

Цена деления измерительной шкалы – 50 μm (фото Д.Г. Чухчина)

Fig. 1. The scheme of infrared spectra measurement along the pollen tube. The crosses indicate the points of automatic positioning of the center of the microscope table while spectra are recording. The number of crosses is equal to the number of spectra obtained; 40 spectra were recorded sequentially from the left to the right. The light vertical band in the center of the image represents the scan area. It is cut using a special aperture, the plates of which (darker areas) absorb infrared radiation and transmit visible light. The same aperture with the scanning band passing by the object of study was used as the background for the spectra recording.

Scale bar – 50 μm (photo by D.G. Chukhchin)

Пыльцу проращивали *in vitro* во влажных камерах (чашки Петри) в термостате при температуре 26,5 °С на 1,0 % агаре с добавлением 5,0 % сахарозы в течение 96 ч. Проросшую пыльцу смывали с поверхности геля и 3 раза промывали в dH_2O . В суспензию добавляли 15,0 % (v/v) дейтерий (D_2O), который в отличие от трития (^3H) и изотопа углерода (^{14}C) не обладает радиоактивностью

и не влияет на физиологические процессы в клетках растений. Кроме того, он хорошо детектируется методом FTIR-спектроскопии в области валентных колебаний C–D связей. Теоретически увеличение массы водорода в 2 раза должно приводить к уменьшению резонансной частоты колебаний в $\sqrt{2}$ раз и смещать полосу поглощения в область 2000...2100 см^{-1} , где отсутствуют полосы поглощения, характерные для живых объектов. Полученную смесь инкубировали в течение 72 ч при постоянном перемешивании в шейкере. Чистую культуру пыльцевых трубок замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Исследования пыльцевых трубок можжевельника обыкновенного в инфракрасной области спектра проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре Vertex 70v («Bruker», Германия) с помощью инфракрасного микроскопа HYPERION 3000 («Bruker», Германия). Использовали точечный МСТ-детектор, позволяющий снимать ИК-спектры в точке размером 1 мкм. Условия записи спектров: фон – зеркальная поверхность (напыление Au–Pd); режим записи спектров – отражение; объектив – 36х-IR. Число сканирований в каждой точке позиционирования – 1024; разрешение – 4 см^{-1} .

В качестве маркера использовали C–D связь. Это связано с тем, что водород может спонтанно обмениваться с дейтерием в O–H и O–D связях. Исследуемые участки пыльцевых трубок имеют разную отражающую способность и, соответственно, разные абсолютные значения оптических плотностей. Однако измерение отношения оптических плотностей A_{2100}/A_{2930} устраняет эти недостатки и позволяет корректно характеризовать содержание C–D связи. Еще более точные результаты можно получить, используя отношение площадей пиков $S_{\text{C-D}}$ и $S_{\text{C-H}}$ колебаний:

$$ID = \frac{\int_{\lambda=1980 \text{ см}^{-1}}^{2220 \text{ см}^{-1}} Ad\lambda - \left(\frac{A_{2220} + A_{1980}}{2} \right) (2220 - 1980)}{\int_{\lambda=2788 \text{ см}^{-1}}^{3044 \text{ см}^{-1}} Ad\lambda - \left(\frac{A_{3044} + A_{2788}}{2} \right) (3024 - 2788)},$$

где ID – индекс дейтерирования.

Степень дейтерирования пропорциональна концентрации дейтерия в веществе клетки, ее значение должно быть одинаковым по всей длине трубки, выращенной только на H_2O . Точно так же оно будет одинаковым и у трубок, культивируемых только на D_2O . Замена H_2O на D_2O в процессе роста пыльцевой трубки позволяет установить последовательность синтеза и локализацию синтезируемых веществ, при образовании которых используется вода.

Результаты исследования и их обсуждение

Прорастание микроспоры в микрогаметофит у можжевельника начинается после сбрасывания экзины, когда микроспора находится в центре гидрофильной капсулы. В результате деления ядра микроспоры образуется 2-клеточный микрогаметофит, состоящий из маленькой генеративной клетки и более крупной клетки трубки, разделенных перегородкой (рис. 2, А).

Пыльцевая трубка приобретает сначала овальную, затем туфелькообразную форму, но все еще целиком вмещается в гидрофильную капсулу. Постепенно

но растущий кончик пыльцевой трубки достигает края гидрофильной капсулы и проходит сквозь нее, не прорывая ее стенки. Ядро генеративной клетки остается в дистальной части трубки, прижимаясь к одной из ее боковых стенок, ядро клетки-трубки постепенно перемещается ближе к ее центральной зоне (рис. 2, B). В культуре *in vitro* гидрофильная капсула сохраняется в течение всего времени прорастивания. При прорастании пыльцы можжевельника *in vivo* гидрофильная капсула сохраняется в течение всей жизни пыльцевых трубок, вплоть до момента оплодотворения. Перегородка между генеративным ядром и ядром клетки трубки обычно лизирует, но иногда может сохраняться некоторое время (рис. 2, D).

Ядро клетки трубки с ассоциированным протопластом и цитоплазмой отгорожены внутренней мембраной (рис. 2, C). Такая же мембрана имеется и у генеративного ядра. На отдельных препаратах, окрашенных щелочным синим, иногда просматривалась наружная мембрана, отслаивающаяся от внутренней поверхности стенки трубки в районе генеративного ядра и, вероятно, объединяющая оба ядра и ассоциированные с ядром клетки трубки протопласт и гиалоплазму. Микрофибриллы актинового цитоскелета распределены во внутреннем объеме трубки неравномерно. Большая их часть сконцентрирована в центральной части трубки и ассоциирована с ядром клетки трубки (рис. 2, E).

Цитоплазматический тяж между ядрами, описанный для *Taxus yunnanensis* [36], у можжевельника отсутствует. Однако опыты по ферментативному разрушению стенки трубки показали, что генеративное ядро довольно прочно связано с протопластом ядра клетки трубки. В случае лизиса кончика трубки ядро клетки трубки, окруженное протопластом, выходит наружу. Генеративное ядро, прочно прилепившееся к дистальной поверхности протопласта, неизбежно следует вслед за ним (рис. 2, F). При этом большая часть гиалоплазмы все еще находится внутри трубки. При полном лизисе стенки трубки и излиянии гиалоплазмы связь между генеративным ядром и протопластом сохраняется в большинстве случаев. Возможно, эта довольно прочная связь осуществляется посредством силы поверхностного натяжения внутренних мембран. Генеративное ядро как бы приклеивается к поверхности протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки. Оба ядра и протопласт сохраняют нативность вне тела трубки (рис. 2, G). В случае потери генеративного ядра нативность ядра клетки трубки и ассоциированного с ним протопласта также сохраняется. При длительном (18 ч и более) ферментативном гидролизе целлюлозы протопласт пыльцевой трубки полностью разрушается, распадаясь на отдельные пластиды, которые сохраняют нативность (рис. 2, H). Оба ядра трубки при этом дегенерируют, т. е. генеративное ядро, как и ядро клетки трубки, не может самостоятельно функционировать вне протопласта пыльцевой трубки. В составе пластид по-видимому преобладают лейкопласты, в большинстве своем это амилопласты, реагирующие на окрашивание раствором J–KJ. Большая часть амилопластов сконцентрирована вокруг ядра клетки трубки (рис. 2, I, J). После введения препарата амилазы в водную суспензию, содержащую пластиды разрушенных пыльцевых трубок, амилопласты полностью лизируют. Кроме того, протопласт содержит очень большое количество митохондрий и лизосом (рис. 3).

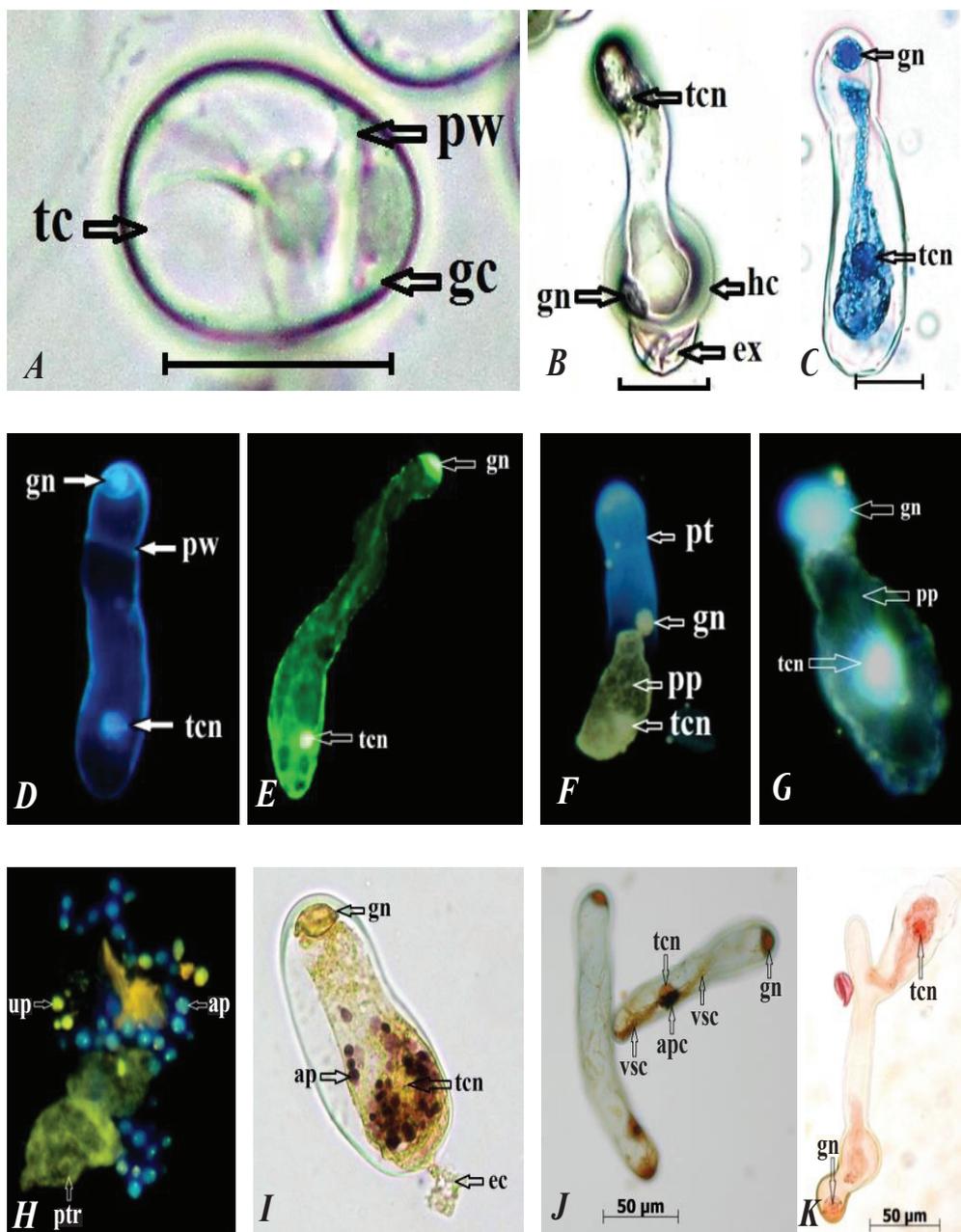


Рис. 2. Прорастание пыльцы можжевельника обыкновенного *in vitro*: *A* – 2-клеточный микрогаметофит внутри гидрофильной капсулы (генеративная клетка и клетка трубки разделены перегородкой); *B* – сформировавшаяся пыльцевая трубка (дистальный кончик трубки остается внутри сохранившейся гидрофильной капсулы); *C* – внутри пыльцевой трубки видна мембрана, отделяющая ядро клетки трубки с ассоциированным протопластом и цитоплазмой от генеративного ядра; *D* – у вполне сформировавшейся пыльцевой трубки между генеративным ядром и ядром клетки трубки все еще сохраняется разделительная перегородка; *E* – цитоскелет пыльцевой трубки можжевельника; *F* – кончик пыльцевой трубки лизировал под воздействием ламинариазы, протопласт выходит наружу через разрушенный кончик, генеративное ядро частично оторвалось от поверхности протопласта, гиалоплазма все еще находится внутри тела трубки;

G – оболочка трубки полностью лизировала под воздействием целлюлазы, гиалоплазма отсутствует, протопласт, ядро клетки трубки и генеративное ядро сохранили нативность; *H* – оболочка пыльцевой трубки полностью лизировала, протопласт разрушен, оба ядра дегенерировали, пластиды «высыпались» из протопласта, в составе лейкопластов преобладают амилопласты; *I* – пыльцевые трубки после 3 дней проращивания (активный рост трубок): амилопласты аккумулируются вокруг ядра клетки трубки, везикулы более или менее распределены по внутреннему объему трубки, более высокая концентрация везикул наблюдается вблизи кончика трубки, содержимое везикул выходит наружу через растущий кончик трубки; *J* – пыльцевая трубка через 7 дней проращивания (полностью сформировавшаяся пыльцевая трубка): амилопласты плотным кольцом окружают ядро клетки трубки, везикулы сконцентрированы вокруг ядра клетки трубки и вблизи кончика трубки; *K* – ветвление пыльцевой трубки можжевельника (ядро клетки трубки с большей частью ассоциированного протопласта переходит в более длинный отросток); *A, B* – без окрашивания; *C* – окрашивание 2,5 % (v/v) водным раствором щелочного синего; *D, F-H* – 300 nM DAPI; *E* – FITC-phalloidin; *I, J* – 1,0 % (v/v) водным раствором I-KI; *K* – 0,25 % (v/v) водным раствором сафранина; tc – клетка трубки; gc – генеративная клетка; pw – разделительная перегородка; tcn – ядро клетки трубки; gn – генеративное ядро; hc – гидрофильная капсула; ex – экзина пыльцевого зерна; pt – пыльцевая трубка; pp – протопласт; ptr – останки пыльцевой трубки; ap – амилопласты; up – пластиды неизвестного происхождения (вероятно, митохондрии); ec – экзоцитоз; apc – скопление амилопластов; vsc – скопление везикул.

Цена деления измерительной шкалы – 50 μm (фото М.В. Сурсо)

Fig. 2. The germination of juniper pollen *in vitro*: *A* – two-cell microgametophyte inside the hydrophilic capsule (generative cell and tube cell separated by a partition wall); *B* – formed pollen tube (the distal tip of the tube stays inside the well-preserved hydrophilic capsule); *C* – the membrane separating the tube cell nucleus with associated protoplast from the generative nucleus is visible inside the pollen tube; *D* – the partition wall still persists in fully formed pollen tube between the generative nucleus and tube cell nucleus; *E* – cytoskeleton of the pollen tube of juniper; *F* – the tip of the pollen tube was lysed under the influence of laminariase, protoplast comes out through the dissolved tip, the generative nucleus partially detached from the surface of the protoplast, hyaloplasm is still inside the tube body; *G* – the tube wall is completely lysed under the influence of cellulase, hyaloplasm is missing, the protoplast, the tube cell nucleus and generative nucleus have preserved the native character; *H* – the pollen tube wall is lysed fully, the protoplast is destroyed, both nuclei are degenerated, plastids spilled out of the protoplast, the composition of leucoplasts is dominated by amyloplasts; *I* – pollen tubes after 3 days of germination (active tube growth): amyloplasts accumulate around the tube cell nucleus, vesicles are more or less distributed throughout the inner volume of the tube, a higher concentration of vesicles is observed near the tube tip, the contents of the vesicles come out through the growing tube tip; *J* – pollen tube (fully formed) after 7 days of germination: amyloplasts form a tight ring around the tube cell nucleus, vesicles are concentrated around the tube cell nucleus and near the tube tip; *K* – branching pollen tubes of juniper (the nucleus of the cell tube with a large part of associated protoplast goes into a longer branch); *A, B* – without staining; *C* – staining with 2.5 % (v/v) aqueous solution of alkaliblau; *D, F-H* – 300 nM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); *E* – FITC-phalloidin (fluorescein isothiocyanate-phalloidin); *I, J* – staining with 1.0 % (v/v) aqueous solution of I-KI; *K* – staining with 0.25 % (v/v) aqueous solution of safranin; tc – tube cell; gc – generative cell; pw – partition wall; tcn – tube cell nucleus; gn – generative nucleus; hc – hydrophilic capsule; ex – exine of pollen grains; pt – pollen tube; pp – protoplast; ptr – pollen tube ruins; ap – amyloplasts; up – plastids of unknown origin (probably mitochondria); ec – exocytosis; apc – amyloplasts accumulation; vsc – vesicles accumulation.

Scale bar – 50 μm (photos by M. V. Surso)

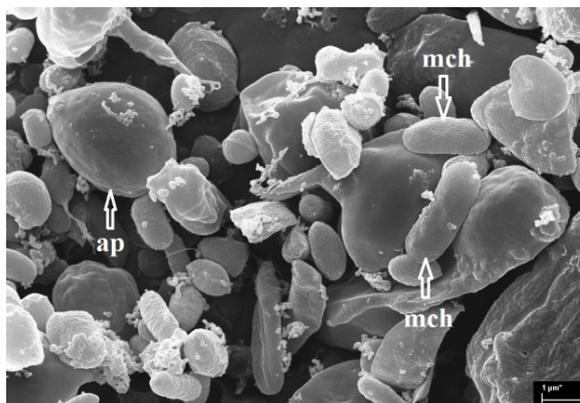


Рис. 3. Содержимое разрушенных протопластов пыльцевых трубок можжевельника: ap – амилопласты, mch – митохондрии. Цена деления шкалы – 1 μm (фото Д.Г. Чухчина)

Fig. 3. Ruins of the destroyed protoplasts of the pollen tubes of juniper: ap – amyloplast, mch – mitochondria. Scale bar – 1 μm (photo by D.G. Chukhchin)

Везикулы распределены по всему объему пыльцевой трубки более или менее равномерно. Однако значительная часть везикул, особенно у активно растущих трубок, скапливается вокруг ядра клетки трубки и вблизи ее кончика (см. рис. 2, *Л*). Вероятно, кончик стенки пыльцевой трубки у можжевельника состоит преимущественно из тонкого слоя каллозы. Основная часть стенки трубки – это эластичная пектиновая оболочка [27], на которую наслаиваются микрофибриллы целлюлозы, хорошо заметные на сканирующем электронном микроскопе и придающие ей упругость.

Вегетативное ядро участвует в регуляции роста пыльцевой трубки. Это косвенно подтверждается тем, что у ветвящихся пыльцевых трубок вегетативное ядро вместе с ассоциированным протопластом перемещается в наиболее быстро растущий кончик трубки (рис. 2, *К*). В северной тайге время между опылением и оплодотворением у можжевельника составляет примерно 13 месяцев, включая период зимнего покоя. Все это время генеративное ядро находится в состоянии анабиоза, активизируясь лишь перед оплодотворением. Поэтому в культуре *in vitro* деление генеративного ядра не наблюдается. В результате митоза генеративного ядра образуются два спермия. У видов сем. Cupressaceae, в отличие от других хвойных, спермии разделены перегородкой, т. е. имеют клеточное происхождение [17].

ИК-спектры пыльцевых трубок показаны на рис. 4.

Спектры с 1 по 11 и с 32 по 40 (рис. 1) почти идентичны фону и имеют малые оптические плотности во всем диапазоне. Это свидетельствует о том, что основная масса вещества пыльцевой трубки сосредоточена в центре, а периферия представлена только тонкой клеточной стенкой. В спектрах можно четко идентифицировать следующие полосы поглощения: широкая полоса 3100...3600 cm^{-1} – валентные колебания O–H групп; 2830...2970 cm^{-1} – валентные колебания C–H групп; 1730 cm^{-1} – валентные колебания C=O связей; 1030 cm^{-1} – колебания C–O–C связей.

На рис. 5 приведены зависимости оптической плотности от положения области сканирования на пыльцевой трубке.

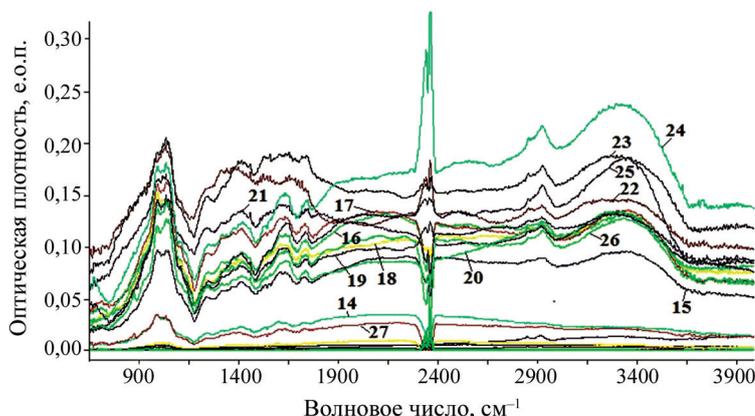


Рис. 4. ИК-спектры пыльцевых трубок можжевельника (е. о. п. – единицы оптической плотности; каждая кривая (номера с 14 по 26) соответствует ИК-спектру в одной точке измерения, номер кривой – точке автоматического позиционирования на рис. 1 (слева направо))

Fig. 4. Infrared spectra of the juniper pollen tubes (e.o.p. – units of optical density). Each curve (No. 14–26) corresponds to the infrared spectrum at one measurement point. The curve number corresponds to the point indicated by the cross in Fig. 1 (from the left to the right)

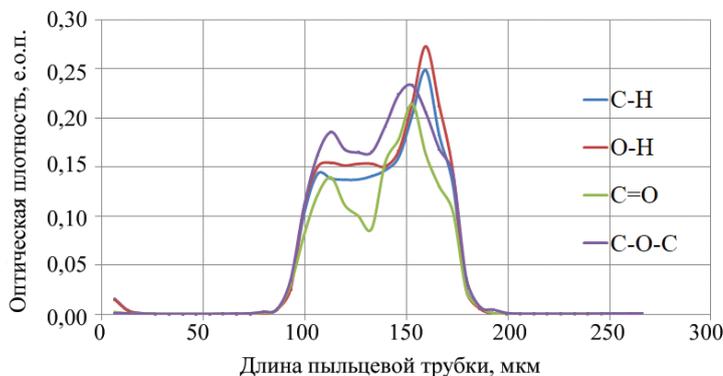


Рис. 5. Значения оптической плотности по длине пыльцевой трубки: C–H группы (липиды, углеводы, белки, РНК, ДНК); O–H группы (углеводы, белки, РНК, ДНК); C=O группы – карбонильные и карбоксильные группы (белки, РНК, ДНК, липиды); C–O–C группы (полисахариды)

Fig. 5 Absorbency values along the length of the pollen tube. C–H groups: lipids, carbohydrates, proteins, RNA, DNA. O–H groups: carbohydrates, proteins, RNA, DNA. C=O groups (carbonyl and carboxyl groups): proteins, RNA, DNA, lipids. C–O–C groups: polysaccharides

Оптическая плотность напрямую связана с концентрацией вещества, имеющего определенную химическую связь. Вещества в центральной части трубки, содержащей большую часть протопласта, распределены неравномерно.

Отношение концентраций может составлять 1,5–2 раза. Распределение C=O и C–O–C групп синхронно и имеет бимодальный характер. Максимумы расположены на периферии. Распределение C–H и O–H групп также синхронно и имеет один ярко выраженный максимум.

Значения индексов дейтерирования (*ID*) приведены на рис. 6.

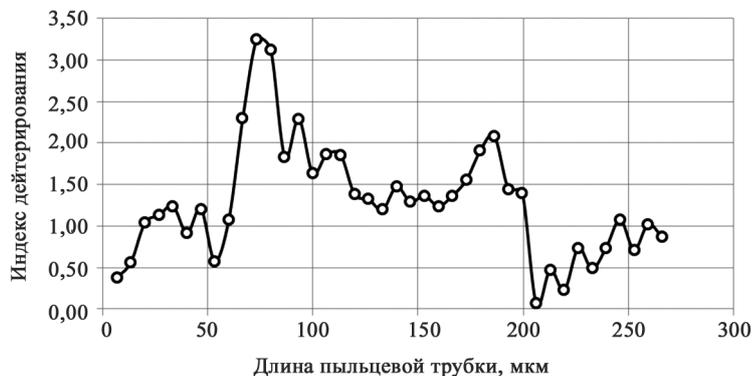


Рис. 6. Распределение индекса дейтерирования по длине пыльцевой трубки

Fig. 6 Distribution of the deuterium index along the length of the pollen tube

Относительное содержание дейтерия характеризует последовательность формирования тканей в объекте. Чем оно выше, тем позднее образована эта ткань. Из рис. 6 следует, что наибольшее содержание C–D связей находится на самых краях зоны протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки. Значит, и повышенное содержание дейтерия также наблюдается на краях протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки. Скорее всего, дейтерий локализован в фосфолипидном слое внутренней мембраны, отделяющей протопласт от стенки пыльцевой трубки.

Заключение

Ядро клетки трубки и ассоциированного с ним протопласта у можжевельника обыкновенного функционально связаны с синтезом органических веществ, необходимых для построения тела трубки. Вероятно, функция ядра клетки трубки заключается не только в регулировании процессов синтеза органических веществ, но и в распределении их при построении тела пыльцевой трубки. Очевидно, что ядро клетки трубки, непрерывно перемещаясь внутри тела трубки вместе с ассоциированным протопластом в сторону растущего кончика трубки, способствует ее полярному росту. Гораздо сложнее понять, каким образом у голосеменных, у которых отсутствует проводниковая ткань, кончик трубки, растущей *in vivo*, достигает строго определенной точки в строго определенный момент. При этом продолжительность жизни пыльцевой трубки у голосеменных растений может быть весьма значительной. Например, у можжевельника обыкновенного в северной тайге она составляет, с учетом зимнего покоя, около 13 мес. Не ясно, каким образом осуществляется интеракция мужского и женского гаметофитов, когда между ними нет прямого контакта. Но такая интеракция доказана результатами многочисленных экспериментов по искус-

ственному опылению. Не исключено, что ядро клетки трубки у голосеменных является одним из двух центров, координирующих интеракцию мужского и женского гаметофитов, и играет роль своеобразного гироскопа. Приняв *a priori* этот тезис, можно предположить, что кончик растущей пыльцевой трубки достигает яйцеклетки к моменту ее созревания во многом благодаря регуляторной функции ядра клетки трубки.

Хотя регуляторная функция ядра растительной клетки как результат сложной экспрессии генов в онтогенезе давно установлена и не оспаривается, следует признать, что это лишь в общих чертах объясняет механизм развития пыльцевой трубки. Наше исследование позволяет высказать осторожное предположение, что, возможно, этот механизм регулируется не одним, а многими составляющими.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bağcıoğlu M., Kohler A., Seifert S., Kneipp J., Zimmermann B. Monitoring of Plant–Environment Interactions by High-Throughput FTIR Spectroscopy of Pollen. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, no. 8, iss. 7, pp. 870–880. DOI: [10.1111/2041-210X.12697](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12697)
2. Battey N.H., James N.C., Greenland A.J., Brownlee C. Exocytosis and Endocytosis. *The Plant Cell*, 1999, vol. 11, pp. 643–659. DOI: [10.1105/tpc.11.4.643](https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.643)
3. Buta E., Cantor M., Ştefan R., Pop R., Mitre I., Buta M., Sestraş R.E. FT-IR Characterization of Pollen Biochemistry, Viability, and Germination Capacity in *Saintpaulia* H. Wendl. Genotypes. *Journal of Spectroscopy*, 2015, vol. 2015, art. 706370. 7 p. DOI: [10.1155/2015/706370](https://doi.org/10.1155/2015/706370)
4. Camacho L., Malhó R. Endo/Exocytosis in the Pollen Tube Apex is Differentially Regulated by Ca²⁺ and GTPases. *Journal of Experimental Botany*, 2003, no. 54, iss. 380, pp. 83–92. DOI: [10.1093/jxb/erg043](https://doi.org/10.1093/jxb/erg043)
5. Chen T., Wu X., Chen Y., Li X., Huang M., Zheng M., Baluška F., Šamaj J., Lin J. Combined Proteomic and Cytological Analysis of Ca²⁺-Calmodulin Regulation in *Picea meyeri* Pollen Tube Growth. *Plant Physiology*, 2009, vol. 149, pp. 1111–1126. DOI: [10.1104/pp.108.127514](https://doi.org/10.1104/pp.108.127514)
6. Chen Y., Chen T., Shen S., Zheng M., Guo Y., Lin J., Baluška F., Šamaj J. Differential Display Proteomic Analysis of *Picea meyeri* Pollen Germination and Pollen-Tube Growth after Inhibition of Actin Polymerization by Latrunculin B. *The Plant Journal*, 2006, vol. 47, iss. 2, pp. 174–195. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2006.02783.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02783.x)
7. Chichiriccò G., Pacini E. *Cupressus arizonica* Pollen Wall Zonation and *in vitro* Hydration. *Plant Systematics and Evolution*, 2008, vol. 270, iss. 3-4, pp. 231–242. DOI: [10.1007/s00606-007-0610-6](https://doi.org/10.1007/s00606-007-0610-6)
8. Chichiriccò G., Spanò L., Torraca G., Tartarini A. Hydration, Sporoderm Breaking and Germination of *Cupressus arizonica* Pollen. *Plant Biology*, 2009, vol. 11, iss. 3, pp. 359–368. DOI: [10.1111/j.1438-8677.2008.00134.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00134.x)
9. Depciuch J., Kasprzuk I., Drzymala E., Parlinska-Wojtan M. Identification of Birch Pollen Species Using FTIR Spectroscopy. *Aerobiologia*, 2018, vol. 34, iss. 4, pp. 525–538. DOI: [10.1007/s10453-018-9528-4](https://doi.org/10.1007/s10453-018-9528-4)
10. Diavanshir K., Fechner G.H. Pollen Germination and Pollen Tube Growth of *Juniperus* from Autumn and Winter Collections. *Silvae Genetica*, 1975, vol. 24, iss. 1, pp. 26–29.
11. Duhoux E. Structural Growth of the Wall of the Pollen Grain of *Juniperus communis* (Cupressaceae), Growth *in vitro* during the Hydration Phase. *Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences*, 1972, vol. 274, no. 20, pp. 2767–2770.

12. Duhoux E. Formation of the Cell Wall of the Pollen Tube during Germination of Pollen in *Juniperus communis* Growth *in vitro*. *Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences*, 1972, vol. 274, no. 24, pp. 3238–3241.
13. Duhoux E. The Division of the Reproductive Cell and the Release of Its Products in the Pollen Tubes of *Juniperus communis* and *Cupressus arizonica*. *Revue Generale De Botanique*, 1974, vol. 81, no. 962/963/964, pp. 193–204.
14. Duhoux E. Mechanism of Exine Rupture in Hydrated Taxoid Type of Pollen. *Grana*, 1982, vol. 21, iss. 1, pp. 1–7. DOI: [10.1080/00173138209427673](https://doi.org/10.1080/00173138209427673)
15. Feijó J.A., Malhó R., Pais M.S.S. A Cytochemical Study on the Role of ATPases during Pollen Germination in *Agapanthus umbelatus* L'her. *Sexual Plant Reproduction*, 1992, vol. 5, iss. 2, pp. 138–145. DOI: [10.1007/BF00194873](https://doi.org/10.1007/BF00194873)
16. Feijó J.A., Sainhas J., Hackett G.R., Kunkel J.G., Hepler P.K. Growing Pollen Tubes Possess a Constitutive Alkaline Band in the Clear Zone and a Growth-Dependent Acidic Tip. *Journal of Cell Biology*, 1999, vol. 144, no. 3, pp. 483–496. DOI: [10.1083/jcb.144.3.483](https://doi.org/10.1083/jcb.144.3.483)
17. Fernando D.D., Lazzaro M.D., Owens J.N. Growth and Development of Conifer Pollen Tubes. *Sexual Plant Reproduction*, 2005, vol. 18, iss. 4, pp. 149–162. DOI: [10.1007/s00497-005-0008-y](https://doi.org/10.1007/s00497-005-0008-y)
18. Geitmann A., Snowman B.N., Emons A.M.C., Franklin-Tong V.E. Alterations in the Actin Cytoskeleton of Pollen Tubes are Induced by the Self-Incompatibility Reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, pp. 1239–1251. DOI: [10.1105/tpc.12.7.1239](https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1239)
19. Holdaway-Clarke T.L., Hepler P.K. Control of Pollen Tube Growth: Role of Ion Gradients and Fluxes. *New Phytologist*, 2003, vol. 159, iss. 3, pp. 539–563. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2003.00847.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00847.x)
20. Justus C.D., Anderhang 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, vol. 219, iss. 1, pp. 103–109. DOI: [10.1007/s00425-003-1193-2](https://doi.org/10.1007/s00425-003-1193-2)
21. Malho R., Read N.D., Trewavas A.J., Pais M.S. Calcium Channel Activity during Pollen Tube Growth and Reorientation. *The Plant Cell*, 1995, vol. 7, pp. 1173–1184. DOI: [10.1105/tpc.7.8.1173](https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1173)
22. Mascarenhas J.P. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *The Plant Cell*, 1993, vol. 5, pp. 1303–1314. DOI: [10.1105/tpc.5.10.1303](https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1303)
23. Messerli M.A., Robinson K.R. Ionic and Osmotic Disruptions of the Lily Pollen Tube Oscillator: Testing Proposed Models. *Planta*, 2003, vol. 217, iss. 1, pp. 147–157. DOI: [10.1007/s00425-003-0972-0](https://doi.org/10.1007/s00425-003-0972-0)
24. Moscatelli A., Cresti M. Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Ed. by S.S. Bhojwani, W.-Y. Soh. Dordrecht, Springer, 2001, pp. 33–65. DOI: [10.1007/978-94-017-1203-3_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1203-3_3)
25. Moutinho A., Love J., Trewavas A.J., Malhó R. Distribution of Calmodulin Protein and mRNA in Growing Pollen Tubes. *Sexual Plant Reproduction*, 1998, vol. 11, iss. 3, pp. 131–139. DOI: [10.1007/s004970050130](https://doi.org/10.1007/s004970050130)
26. Pappas C.S., Tarantilis P.A., Harizanis P.C., Polissiou M.G. New Method for Pollen Identification by FT-IR Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 2003, vol. 57, iss. 1, pp. 23–27. DOI: [10.1366/000370203321165160](https://doi.org/10.1366/000370203321165160)
27. Parre E., Geitmann A. Pectin and the Role of the Physical Properties of the Cell Wall in Pollen Tube Growth of *Solanum chacoense*. *Planta*, 2005, vol. 220, iss. 4, pp. 582–592. DOI: [10.1007/s00425-004-1368-5](https://doi.org/10.1007/s00425-004-1368-5)
28. Parton R.M., Fisher-Parton S., Watahiki M.K., Trewavas A.J. Dynamics of the Apical Vesicle Accumulation and the Rate of Growth are Related in Individual Pollen Tubes. *Journal of Cell Science*, 2001, vol. 114, iss. 14, pp. 2685–2695.
29. Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D., Menzel D. Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, pp. 1150–1161. DOI: [10.1104/pp.104.040683](https://doi.org/10.1104/pp.104.040683)

30. Southworth D. Pollen Exine Substructure. III. *Juniperus communis*. *Canadian Journal of Botany*, 1986, vol. 64, iss. 5, pp. 983–987. DOI: [10.1139/b86-132](https://doi.org/10.1139/b86-132)
31. Southworth D. Sperm and Generative Cell. *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Ed. by S.S. Bhowani, W.Y. Soh. Dordrecht, Springer, 2001, pp. 17–32. DOI: [10.1007/978-94-017-1203-3_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1203-3_2)
32. Sowa S., Connor K.F. Biochemical Changes during Pollen Germination Measured *in vivo* by Infrared Spectroscopy. *Plant Science*, 1995, vol. 105, iss. 1, pp. 23–30. DOI: [10.1016/0168-9452\(94\)04036-G](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)04036-G)
33. Surso M. Pollination and Pollen Germination in Common Juniper (*Juniperus communis*: Cupressaceae). *Arctic Environmental Research*, 2018, vol. 18, no. 4, pp. 162–174. DOI: [10.3897/issn2541-8416.2018.18.4.162](https://doi.org/10.3897/issn2541-8416.2018.18.4.162)
34. Takaso T., Owens J.N. Significance of Exine Shedding in Cupressaceae-Type Pollen. *Journal of Plant Research*, 2008, vol. 121, iss. 1, art. 83. DOI: [10.1007/s10265-007-0135-7](https://doi.org/10.1007/s10265-007-0135-7)
35. Vidali L., McKenna S.T., Hepler P.K. Actin Polymerization is Necessary for Pollen Tube Growth. *Molecular Biology of the Cell*, 2017, vol. 12, no. 8, pp. 2534–2545. DOI: [10.1091/mbc.12.8.2534](https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2534)
36. Wang B.-Y., Su J.-R., Fernando D.D., Yang Z.-H., Zhang Z.-J., Chen X.-M., Zhang Y.-P. Development of the Male Reproductive Structures in *Taxus yunnanensis*. *Plant Systematics and Evolution*, 2008, vol. 276, iss. 1-2, art. 51. DOI: [10.1007/s00606-008-0079-y](https://doi.org/10.1007/s00606-008-0079-y)
37. Wang Q., Lu L., Wu X., Li Y., Lin J. Boron Influences Pollen Germination and Pollen Tube Growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiology*, 2003, vol. 23, iss. 5, pp. 345–351. DOI: [10.1093/treephys/23.5.345](https://doi.org/10.1093/treephys/23.5.345)
38. Wang X., Teng Y., Wang Q., Li X., Sheng X., Zheng M., Šamaj J., Baluška F., Lin J. Imaging of Dynamic Secretory Vesicles in Living Pollen Tubes of *Picea meyeri* Using Evanescent Wave Microscopy. *Plant Physiology*, 2006, vol. 141, pp. 1591–1603. DOI: [10.1104/pp.106.080168](https://doi.org/10.1104/pp.106.080168)
39. Wu X., Chen T., Zheng M., Chen Y., Teng N., Šamaj J., Baluška F., Lin J. Integrative Proteomic and Cytological Analysis of the Effects of Extracellular Ca²⁺ Influx on *Pinus bungeana* Pollen Tube Development. *Journal of Proteome Research*, 2008, vol. 7, pp. 4299–4312. DOI: [10.1021/pr800241u](https://doi.org/10.1021/pr800241u)
40. Zhang L., Hao H., Wang Q., Fang K., Hou Z., Lin J. The Localization of Rac GTPase in *Picea willsonii* Pollen Tubes Implies Roles in Tube Growth and the Movement of the Tube Nucleus and Sperm Cells. *Plant Science*, 2007, vol. 172, iss. 6, pp. 1210–1217. DOI: [10.1016/j.plantsci.2007.02.011](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.011)
41. Zimmermann B. Chemical Characterization and Identification of Pinaceae Pollen by Infrared Microspectroscopy. *Planta*, 2018, vol. 247, iss. 1, pp. 171–180. DOI: [10.1007/s00425-017-2774-9](https://doi.org/10.1007/s00425-017-2774-9)

GROWTH AND DEVELOPMENT OF POLLEN TUBES IN COMMON JUNIPER (*Juniperus communis*): THE ROLE OF THE TUBE CELL NUCLEUS

M.V. Surso¹, Doctor of Agriculture; ResearcherID: [J-2197-2018](https://orcid.org/0000-0001-7482-9848),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7482-9848>

D.G. Chukhchin², Candidate of Engineering, Prof.; ResearcherID: [O-9487-2015](https://orcid.org/0000-0003-3250-8469),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3250-8469>

¹Federal Center for Integrated Arctic Research of the Russian Academy of Sciences, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 23, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation;

e-mail: surso@fciarctic.ru

²Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 17, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; e-mail: dimatsch@mail.ru

In this work we have tried to explain the functional value of the tube cell nucleus and its relationship with the structures of the pollen tube on the example of juniper. Juniper pollen tubes were studied *in vitro* by the methods of light microscopy (transmitted light, fluorescence) and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. A brief description of the growth and development processes of juniper pollen tubes is given. The experiments on the enzymatic destruction of the pollen tube wall revealed the relation between the generative nucleus and the protoplast associated with the tube cell nucleus. The generative nucleus is quite firmly connected with the protoplast of the tube cell nucleus by means of the surface tension of internal membranes. It was proven that the protoplast and the both nuclei save their integrity outside the tube body. That is, they retain their viability outside the tube body for some time after lysis the tube tip. However, both the generative nucleus and the tube cell nucleus cannot function independently outside the protoplast of the pollen tube. Microfibrils of the actin cytoskeleton are distributed irregularly inside the tube. Most of them are concentrated in the central part of the tube and associated with the tube cell nucleus and protoplast. Leucoplasts predominate in the composition of plastids. The majority of them are amyloplasts, the better part of which is concentrated around the tube cell nucleus and protoplast. Protoplast contains a large number of mitochondria. Lysosomes are distributed over the entire volume of the pollen tube more or less regularly. However, a significant part of lysosomes, especially in actively growing tubes, accumulates around the tube cell nucleus and near the tube tip. The use of deuterium as a marker allowed to establish the sequence of synthesis and localization of synthesized substances during the pollen tube growth. The increased deuterium content was observed in the zone of the protoplast associated with the tube cell nucleus. The obtained experimental data allowed to suggest that the tube cell nucleus likely controls the synthesis of organic substances and their distribution in the tube body. Probably, the tube cell nucleus promotes its polar growth and orients the growth of the tube tip *in vivo* in time and space.

For citation: Surso M.V., Chukhchin D.G. Growth and Development of Pollen Tubes in Common Juniper (*Juniperus communis*): The Role of the Tube Cell Nucleus. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2020, no. 2, pp. 20–34. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-20-34

Funding: The study was carried out with the financial support from the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the research project No. 18-04-00056. Pollen samples were collected during the expedition work within the framework of the research on the state assignment of the Russian Academy of Sciences (topic No. 0409-2019-0039), state registration No. AAAA-A18-118011690221-0.

Acknowledgments: This research was performed using the equipment of the Core Facility Center “Arktika” of the Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov.

Keywords: juniper, pollen tube, tube cell nucleus, infrared spectrometry, deuterium, enzymatic hydrolysis.

Поступила 05.06.19 / Received on June 5, 2019
