

**Immunolokalizacja lipoksygenazy
w mikrosporze *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw.**

**EWA SZCZUKA¹, BOŻENA PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA²,
EWA SKÓRZYŃSKA-POLIT³, JOLANTA SOBIESKA⁴,
JAROSŁAW PAWELEC², TOMASZ PIERSIAK²**

¹Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, Akademicka 19,
20 033 Lublin, e mail: plantrep@biotop.umcs.lublin.pl

¹Department of Plant Anatomy and Cytology, Maria Curie Skłodowska University,
Akademicka 19, 20 033 Lublin, Poland, corresponding author:
e mail: plantrep@biotop.umcs.lublin.pl

²Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej,
Akademicka 19, 20 033 Lublin

²Department of Comparative Anatomy and Anthropology, Maria Curie Skłodowska University,
Akademicka 19, 20 033 Lublin, Poland

³Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej,
Akademicka 19, 20 033 Lublin

³Department of Plant Physiology, Maria Curie Skłodowska University, Akademicka 19,
20 033 Lublin, Poland

⁴Zakład Naukowy Biologii i Ogrodnictwa, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy,
Wyższa Szkoła Humanistyczno-Przyrodnicza w Sandomierzu, Krakowska 26,
27 600 Sandomierz

⁴Scientific Department of Biology and Horticulture, University College of Arts and Natural
Science in Sandomierz, Krakowska 26, 27 600 Sandomierz, Poland

Immunolocalization of lipoxygenase in the microspore of *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw.

(Otrzymano: 14.07.2005)

S u m m a r y

Localization of lipoxygenase (LOX) in the microspore of *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw. was investigated with the immunogold labelling method. The enzyme was found in the cytoplasm, nucleus and sporoderm. The most intensive reaction was observed in the cytoplasm, where the immunogold particles were sometimes grouped into clusters of several or more and showed the highest density. The smallest amount of particles occurred in the sporoderm. The role of lipoxygenase in the microspore is discussed.

WSTĘP

Lipoksygenaza jest enzymem występującym w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Bierze udział w wielu kluczowych procesach komórkowych roślin, ale jej fizjologiczna funkcja nie jest dotychczas dokładnie poznana. Według niektórych doniesień literaturowych wysoka aktywność lipoksygenazy jest związana z wczesnymi stadiami rozwoju roślin (Matsui i in., 1988; Holtman i in., 1996; Schmitt i Van Mechelen, 1997). Lipoksygenaze wyizolowano z rozwijających się ziarniaków jęczmienia i z 48-godzinnych siewek łubinu (Beneytout i in., 1988; Schmitt i Van Mechelen, 1997). W kwiatach *Brassica sp.* opisano wyjątkowo wysoką aktywność lipoksygenazy w porównaniu z liśćmi i owocami (Galliar di Chan, 1980).

W prezentowanej pracy przedstawiamy rozmieszczenie lipoksygenazy w mikrosprzeczności złoci żółtej (*Gagea lutea*) przy użyciu metody immunozłotowej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Rośliny *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw. (Liliaceae) zbierano z naturalnych stanowisk w okolicach Nowego Nartu w styczniu 2003. Pylniki izolowano z pąków kwiatowych, zamkniętych wewnątrz cebul. Po sprawdzeniu stadium rozwoju (w tym celu utrwalone pylniki rozgniatano w acetokarminie i obserwowano w mikroskopie świetlnym), pylniki utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego i kwasu octowego (3:1).

Mikroskopia fluorescencyjna

W celu obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym, pylniki z mikrosporami płukano trzykrotnie w wodzie, rozgniatano w mieszaninie roztworu $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI w PBS i gliceryny. DAPI stosowano w celu zabarwienia DNA (Wędzony, 1996). Tak wybarwione mikrospory oglądano w mikroskopie Nikon Optiphot przy długości fali 400 nm.

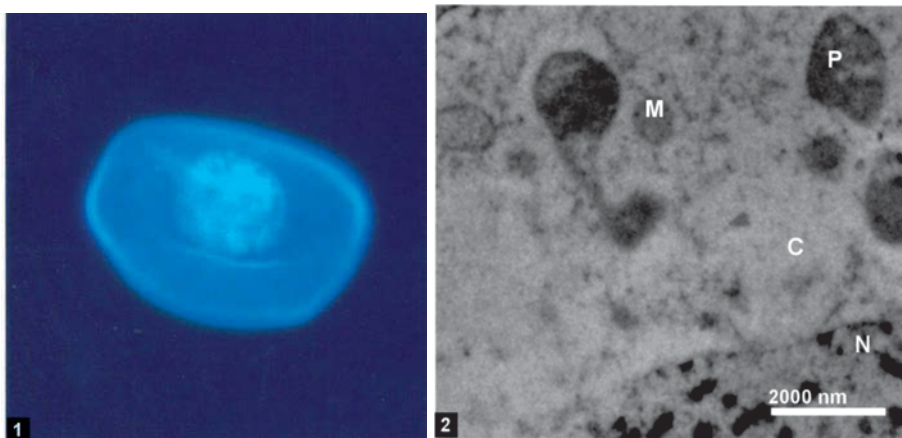
Immunolokalizacja lipoksygenazy

Małe fragmenty (2-3mm) pylników *Gagea lutea* utrwalano w 2% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M roztworze PBS przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Fragmenty poddane preparatyce płukano trzykrotnie buforem PBS i 0,5 M roztworem chlorku amonu w PBS. Skrawki odwadniano w alkoholu i zatapiano w żywicy LR White (Sigma). Ultracienkie skrawki montowano na siatkach niklowych i przemywano 0,56 M nadjodanem sodu, wodą destylowaną i 0,1 M HCl. Następnie siatki inkubowano w 1% roztworze BSA przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu siatek w roztworze PBS-BSA inkubowano je w roztworze króliczych przeciwciał anti-LOX w rozcieńczeniu 1:1000 w buforze PBS-BSA. Następnie płukano siatki buforem PBS-BSA i inkubowano przez 40 minut z drugimi przeciwciałami anti-króliczymi sprzęgniętymi ze złotem w rozcieńczeniu 1:50. Siatki po reakcji

plukano wodą dejonizowaną i suszono w temperaturze pokojowej. Dodatkowo wykonano reakcje kontrolne, w których materiał na siatkach inkubowano z pominięciem króliczych przeciwciał anti-LOX. Siatki kontrastowano 2% octanem uranylu i płynem Reynoldsa. Obrazy analizowano przy użyciu mikroskopu elektronowego LEO-Zeiss 912AB.

WYNIKI

Mikrospora *Gagea lutea* ma regularny, owalny kształt, a jej powierzchnia widoczna w mikroskopie świetlnym jest gładka. Większą część (około 2/3) objętości mikrospory zajmuje cytoplazma. Kuliste jądro mikrospory w zależności od stadium jej rozwoju ułożone jest w różnym miejscu. Lipoksygenazę lokalizowano w mikrosporach z jądrem umieszczonym centralnie, takich jak pokazano na ryc. 1. Mikrospory w badanym stadium rozwoju zawierają gęstą cytoplazmę, krótkie i nieliczne cysterny siateczki śródplazmatycznej, niewielką liczbę organelli takich jak plastydy i mitochondria; jądro mikrospory wypełnia chromatyna, która jest znacznie gęstsza dla elektronów niż cytoplazma (ryc. 2). W cytoplazmie obserwowano cząsteczki złota wskazujące na obecność lipoksygenazy. Cząsteczki występowały licznie i dość równomiernie na terenie całej cytoplazmy mikrospory (ryc. 3). Sporadycznie znajdowano cząsteczki złota zebrane w większych grupach. Na obrazie w mikroskopie elektronowym jądro mikrospory



Ryc. 1. Mikrospora *Gagea lutea*. Mikroskop fluorescencyjny. Barwienie DAPI. 800 x.

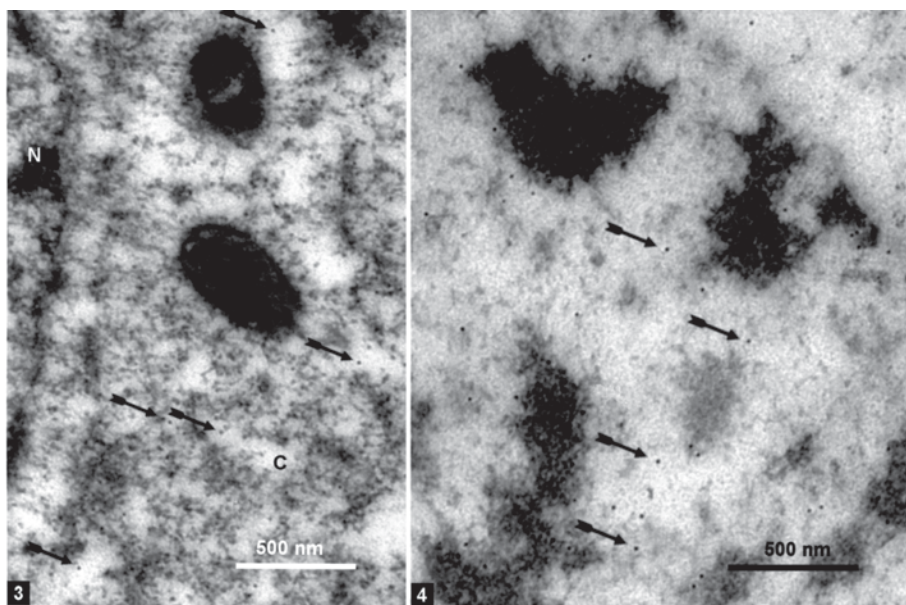
Fig. 1. Microspore of *Gagea lutea*. Fluorescence microscope. DAPI staining.

Ryc. 2 7. Mikrospora *Gagea lutea*. ME.

Fig. 2 7. Microspore of *Gagea lutea*. ME.

Ryc. 2. Fragment mikrospory. N jądro, C cytoplazma, M mitochondrium, P plastyd.

Fig. 2. Fragment of microspore. N nucleus, C cytoplasm, M mitochondrion, P plastid.



Ryc. 3. Cząsteczki immunozłota w cytoplazmie (strzałki). Zwraca uwagę duża gęstość cząsteczek immunozłota. N jądro, C cytoplazma.

Fig. 3. Immunogold particles in the cytoplasm (arrows). Note the high density of the gold particles. N nucleus, C cytoplasm.

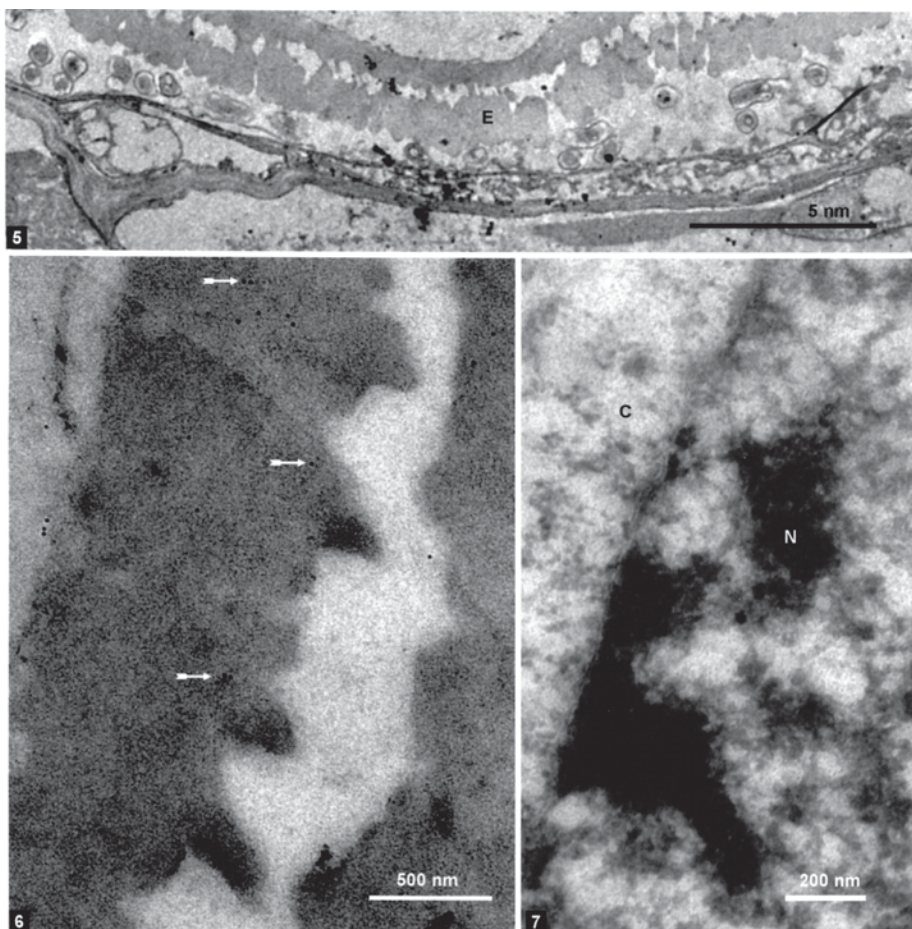
Ryc. 4. Część jądra z cząsteczkami złota (strzałki).

Fig. 4. Fragment of nucleus with the gold particles (arrows).

wykazuje zróżnicowaną strukturę – bardziej elektronogęsta chromatyna poprzedzielana jest obszarami rzadszymi dla elektronów (ryc. 4). W jądrze znajdowano cząsteczki złota wykazujące obecność lipoksygenazy. Cząsteczki były rozmieszczone równomiernie, ale było ich znacznie mniej niż w cytoplazmie.

Najmniej liczne cząsteczki immunozłota obserwowano w egzynie sporodermi okrywającej mikrospore. Ta zewnętrzna część sporodermi mikrospory złoci żółtej jest zbudowana z wyraźnie widocznych w mikroskopie elektronowym dwu warstw przedzielonych przestworami i kanalikami (ryc. 5). W takiej sporodermie obserwowano nieliczne cząsteczki immunozłota. Niekiedy cząsteczki te tworzyły małe skupienia – jednak nigdy nie obserwowano grup złożonych z więcej niż trzech cząsteczek (ryc. 6).

W celu określenia specyficzności reakcji immunozłotowej przeprowadzono reakcję kontrolną. Reakcję przeprowadzono z pominięciem pierwszego przeciwciała. W cytoplazmie i jądrze mikrospory taka reakcja nie wykazała obecności cząsteczek złota (ryc. 7).



Ryc. 5. Fragment sporodermy mikrospory i komórek wewnętrznej warstwy ściany pylnika. E egzyna.

Fig. 5. Fragment of the microspore sporoderm and the cells of inner layers of the anther wall. E exine.

Ryc. 6. Cząsteczki złota (strzałki) w sporodermie mikrospory.

Fig. 6. Gold particles (arrows) in the microspore sporoderm.

Ryc. 7. Kontrola. Część jądra (N). C cytoplazma.

Fig. 7. Control. Fragment of the nucleus (N). C cytoplasm.

DYSKUSJA

Lipoksygenazę zlokalizowano w cytoplazmie, jądrze i sporodermie mikrospory *Gagea lutea*. Najintensywniejszą reakcję obserwowano w cytoplazmie, gdzie cząsteczki immunozłota niekiedy były zgrupowane po kilka lub kilkanaście i wykazywały największe zagęszczenie. Podobnie, wykazano obecność lipoksygenazy w cytoplazmie komórek parenchymy u kiełkujących nasion soi (Vernooy-Gerritsen i in., 1984). W cytoplazmie tych komórek lipoksygenaza była rozmieszczona w sposób przypadkowy. Wewnątrz komórek, także mikrospor, syntetyzowane są różne składniki łącznie z substancjami tłuszczowymi czy błonami. Lipoksygenaza jest enzymem rozpoczynającym szlak przemian zwanym „szlakiem lipoksygenazowym”, w wyniku którego powstają związki zaangażowane w wielu procesach zachodzących w cytoplazmie. Właśnie w cytoplazmie mikrospory obserwowano wyjątkowo liczne cząsteczki złota wskazujące na obecność lipoksygenazy. Enzym znajdowano także w pobliżu błon wewnątrz komórki. Lipoksygenazę związaną z błonami tylakoidowymi znajdowano już wcześniej w chloroplastach niedojrzałych owoców pomidora (Bosher i in., 1992), a także w błonach mikrosomalnych, błonie cytoplazmatycznej i ciałkach tłuszczowych (literatura w Fussen i Wasterinak, 2002). W mikrosporze złoci żółtej nie obserwowano wyraźnego powiązania obecności lipoksygenazy z błonami.

Najmniej cząsteczek immunozłota wskazującego na obecność lipoksygenazy obserwowano w sporodermie mikrospory. Lipoksygenaza występowała w zewnętrznej, nasyconej sporopoleniną warstwie sporodermy egzynie. Początkowo prekursorzy sporopoleniny syntetyzowane są wewnątrz mikrospory. Wiadomo, że sporopolenina zbudowana jest z wielu związków tworzących polimery pochodnych kwasów tłuszczowych oraz w mniejszym stopniu ze związków fenylopropanoidowych (literatura w Pifanelli i in., 1998). Obecność lipoksygenazy w warstwie egzynowej mikrospory, a później ziarna pyłku ma duże znaczenie (Szczuka i in., 2005). Niektóre związki występujące w szlaku lipoksygenazowym mogą nie tylko indukować programowaną śmierć komórki ale nawet wykazywać właściwości grzybobójcze lub aktywność mikrobiologiczną. Inne, będące jednymi z produktów pośrednich w szlaku liazy wodoroadnlenkowej, są substancjami wabiącymi, zapachowymi i odgrywają znaczną rolę jako elementy sygnalizacji u roślin (Porta i Rocha-Sosa, 2002). W sporodermie ziaren pyłku wielu roślin syntetyzowane są lotne substancje, które działają wabiąco albo odstarszająco na owady. Mogą one także odgrywać ważną rolę ochronną w przypadku ataku patogena. Wśród lotnych związków syntetyzowanych przez ziarna pyłku wielu roślin można znaleźć m.in. takie związki jak ksyleny czy heptadekanony.

Zewnętrzna warstwa okrywająca pyłku jest substancją o charakterze lipidowym, która wypełnia przestrzeń w zagłębieniach egzyny. Skład lipidów acylowych tej okrywy całkowicie różni się od składu lipidowego występującego w ziarnach pyłku. Dla przykładu w okrywie pyłku u *Brassica napus* występuje frakcja niepolarnych obojętnych estrów długo- lub krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych. Wśród lipidów w ziarnach pyłku stwierdzono obecność triacylogliceroli

i fosfolipidów, które wzbogacone są w wielonienasycone 18-węglowe kwasy tłuszczowe, głównie kwas linolenowy (Piffanelli i in., 1997). W rodzinie Liliaceae oprócz elajoplastów stwierdzono również obecność innego typu ciała lipidowego z substancjami tłuszczowymi, którego pochodzenie związane jest prawdopodobnie z ER (Piffanelli i in., 1998). Udział lipoksygenazy w powstawaniu różnorodnych związków lipidowych wyjaśnia jej lokalizację w zewnętrznej warstwie sporodermi mikrospory.

WNIOSKI

1. Lipoksygenaza występuje w cytoplazmie, jądrze i sporodermie mikrospory *Gagea lutea*.
2. Największą ilość cząsteczek immunozłota wskazującego na obecność lipoksygenazy obserwowano w cytoplazmie mikrospory; najmniej cząsteczek znaleziono w sporodermie.
3. Lokalizacja lipoksygenazy (przy użyciu znakowanych złotem przeciwciał) wskazuje na funkcjonowanie „szlaku lipoksygenazowego” w mikrosporze *Gagea lutea*.

LITERATURA

- Beneytout J.L., Najid A., Tixier M., 1988. Changes in lipoxygenase activity during seedling development of *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 58: 35-41.
- Bowsher C.G., Ferrie B.J.M., Ghosh S., Todd J., Thompson J.E., Rothstein S.J., 1992. Purification and partial characterization of a membrane associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiol.* 100: 1802-1807.
- Feussner L., Wasternack C., 2002. The lipoxygenase pathway. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 275-297.
- Galliard T., Chan H.W.S., 1980. Lipoxygenases. [In:] Stumpf PK, Conn EE (eds.) *The Biochemistry of Plants*, vol 4, Academic Press Inc, New York, pp. 131-161.
- Holtman W.L., Van Duijn G., Sedee N.J.A., Douma A.C., 1996. Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley. *Plant Physiol.* 111: 569-576.
- Matsui K., Kajiwara T., Hayashi K., Hatanaka A., 1988. Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 51: 3219-3221.
- Piffanelli P., Ross J.H.E., Murphy D.J., 1997. Intra and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J.* 11: 549-652.
- Piffanelli P., Ross J.H.E., Murphy D.J., 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* 11: 65-80.
- Porta H., Rocha Sosa M., 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130: 15-21.
- Schmitt N.F., Van Mechelen J.R., 1997. Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. *Plant Sci.* 128: 141-150.

- Szczuka E., Skórzyńska Polit E., Pawlikowska Pawłęga B., Sobieska J., Gawron A., 2005. Immunolocalization of lipoxygenase in the anther of *Gagea lutea* (L.) Ker. Gaw. (w druku).
- Vernooy Gerritsen M., Leunissen J.L.M., Veldink G.A., Vliegenthart J. F. G., 1984. Intracellular localization of lipoxygenase 1 and 2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein A colloidal gold complexes. *Plant Physiol.* 76: 1070-1079.
- Wędzony M., 1996. Mikroskopia fluorescencyjna dla botaników. S.c.Drukpol, Kraków.

Streszczenie

Metodą immunozłotową badano rozmieszczenie lipoksygenazy (LOX) w mikrosporze *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw. Enzym znaleziono w cytoplazmie, jądrze i sporodermie mikrospory. Najintensywniejszą reakcję obserwowano w cytoplazmie, gdzie czasteczki immunozłota niekiedy były zgrupowane po kilka lub kilkanaście i wykazywały największe zagęszczenie. Najmniej cząsteczek występowało w sporodermie. Dyskutowana jest rola lipoksygenazy w mikrosporze.