

УДК 581.14

РОЛЬ Cl^- В ПРОРАСТАНИИ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА И РОСТЕ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ¹

© 2009 г. М. А. Брейгина, Н. П. Матвеева, И. П. Ермаков

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

E-mail: pollen-ions@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.04.08 г.

Окончательный вариант получен 13.10.08 г.

С использованием флуоресцентных методов изучали участие Cl^- в поляризации цитоплазмы пыльцевой трубки и регуляции мембранного потенциала в процессе прорастания *in vitro* пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum*. Выход Cl^- из клеток блокировали с помощью ингибитора анионных каналов (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) или путем добавления в среду инкубации Cl^- . Использовали концентрации этого ингибитора (40 мкМ) и внеклеточного Cl^- , полностью подавляющие прорастание пыльцевого зерна (200 мМ Cl^-) и рост трубки (100 мМ Cl^-). Выявлен выход анионов из пыльцевого зерна в первые минуты гидратации, который сохранялся в присутствии 200 мМ Cl^- . Ингибитор полностью блокировал этот процесс, что указывает на важную роль чувствительных к нему анионных каналов в трансмембранном переносе Cl^- на начальном этапе активации. В присутствии 100 мМ Cl^- происходила гиперполяризация мембраны пыльцевой трубки, однако экзогенный Cl^- не влиял на компартиментацию и движение органелл в трубке. Ингибитор вызывал деполяризацию плазматической мембраны в пыльцевом зерне и в трубке, нарушал полярную организацию цитоплазмы и движение органелл. Таким образом, активность чувствительных к указанному ингибитору хлоридных каналов необходима для регуляции потенциала на плазматической мембране и для поддержания функциональной компартиментации цитоплазмы, которая обеспечивает полярный рост.

Ключевые слова: мужской гаметофит, пыльцевая трубка, апикальный рост, хлорид, анионные каналы.

Мужской гаметофит покрытосеменных растений представляет собой удобную модель для изучения процессов клеточной поляризации и апикального роста. Многочисленные исследования выявили ряд общих механизмов регуляции роста пыльцевой трубки и корневых волосков, ризоидов папортников, гифов грибов и аксонов нервных клеток животных (Geitmann, Emons, 2000; Palanivelu, Preuss, 2000; Bushart, Roux, 2007). Реализация этих механизмов включает комплекс событий с участием различных клеточных компартиментов. Так, в пыльцевой трубке происходит формирование двух основных зон: апикального “растущего компартамента” и базального компартамента. Кончик трубки занят преимущественно секреторными везикулами, которые осуществляют поставку мембранного материала и компонентов клеточной стенки (Cheung, Wu, 2007). Более крупные органеллы, такие как митохондрии и вакуоли, движутся по траектории “обращенного фонтана”, практически не заходя в кончик трубки. Показано, что зонирование цитоплазмы и

движение органелл обеспечиваются актиновым цитоскелетом (Cai et al., 2005).

Структурная и функциональная компартиментация пыльцевой трубки тесно связана с ионным гомеостазом, поддержание которого обеспечивается, в частности, работой транспортных белков плазматической мембраны (Malhó et al., 2006). Необходимым условием роста является наличие крутого градиента Ca^{2+} в апикальной зоне трубки (Hepler et al., 2006). Высокая концентрация Ca^{2+} блокирует работу моторных белков и способствует фрагментации актина (Malhó et al., 2006), тем самым, возможно, препятствуя продвижению в апекс крупных органелл. Известно также, что Ca^{2+} играет ключевую роль в регуляции экзоцитоза в клетках животных (Battay et al., 1999). В связи с этим предполагают, что градиент Ca^{2+} контролирует локальный экзоцитоз в апексе (Campanoni, Blatt, 2007). В пыльцевой трубке выявлены также токи калия (Weisenseel, Jaffe, 1976; Obermeyer, Blatt, 1995; Messerli et al., 1999) и протонов (Fejő et al., 1999). Протонный градиент, предположительно, поддерживается благодаря работе H^+ -АТФазы (Fejő et al., 1999). Активность

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00746).

этого фермента необходима для прорастания пыльцевого зерна и роста трубки (Rodríguez-Rosales et al., 1989), он участвует в регуляции мембранного потенциала (Weisenseel, Wenisch, 1980; Obermeyer, Blatt, 1995) и pH цитоплазмы (Матвеева и др., 2002) в пыльцевом зерне.

Вопрос о токах Cl⁻ и активности анионных каналов в пыльцевом зерне и пыльцевой трубке остается предметом дискуссий (Hepler et al., 2006; Moreno et al., 2007). Попытка выявить анионные каналы электрофизиологическими методами не дала результатов (Dutta, Robinson, 2004), хотя данные транскриптомного анализа указывают на высокий уровень экспрессии двух специфических для пыльцы генов хлоридных каналов (Moreno et al., 2007). Данные о выходе Cl⁻ из пыльцевой трубки также противоречивы. По данным Зония с соавторами (Zonia et al., 2002), рост трубки сопровождается интенсивным осциллирующим током Cl⁻. Другие авторы (Messerli et al., 2004), используя такие же ионоселективные электроды, показали, что входные потоки H⁺ могут быть ошибочно приняты за выходные потоки Cl⁻. Вклад других анионов, в том числе органических, не изучен. В связи с этим возникает необходимость использования альтернативных методических подходов к изучению данного вопроса.

Представления об участии анионных каналов в прорастании пыльцевого зерна и росте трубки подтверждают данные ингибиторного анализа. Блок анионных каналов с помощью NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) или DIDS (4,4'-diisothiocyanato-2,2'-disulfonic acid stilbene) полностью подавляет эти процессы (Матвеева и др., 2003б; Zonia et al., 2002).

Можно предположить, что в прорастающем пыльцевом зерне Cl⁻ наряду с Ca²⁺ участвует в поляризации цитоплазмы и регуляции мембранного потенциала на плазмалемме, как это происходит в других клетках эукариот (Jentsch et al., 2002). Проверка этой гипотезы стала основной задачей нашей работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1 выращивали в климатической камере при температуре 25°C и 16-часовом световом дне. Сухую пыльцу хранили при -20°C. Перед использованием пыльцу промывали диэтиловым эфиром для удаления липофильных покровных материалов, высушивали на воздухе, а затем инкубировали во влажной камере 2 ч при 25°C.

Культивирование пыльцевых зерен *in vitro* проводили при 25°C в стандартной питательной среде, содержащей 0.3 М сахарозы, 1.6 мМ Н₃ВО₃, 3 мМ Са(НО₃)₂, 0.8 мМ МgSO₄ и 1 мМ КНО₃ в 25 мМ MES-трис-буфере, pH 5.9. Для инкубации ис-

пользовали чашки Петри (диаметром 2.5 см) или пластиковые культуральные камеры объемом 35 мкл ("CoverWell, Schleicher & Schuell", Германия), обработанные изнутри 0.01%-ным поли-L-лизинном ("Sigma", США). Анализировали трубки, прикрепившиеся к верхней стенке камеры.

Перенос Cl⁻ через плазматическую мембрану блокировали двумя способами: 1) с помощью ингибитора анионных каналов NPPB ("Sigma", США), конечная концентрация которого составляла 40 мкМ, и 2) добавляя Cl⁻ в инкубационную среду с тем, чтобы выровнять электрохимический потенциал для этого иона по обе стороны плазматической мембраны.

Для расчетов внеклеточной концентрации Cl⁻ (C_{out}) использовали уравнение:

$$\Delta\mu = \mu_{in} - \mu_{out} = RT \ln [C_{in}/C_{out}] + zFE,$$

из которого при условии $\Delta\mu = 0$ получаем:

$$C_{out} = C_{in} e^{zFE/RT},$$

где μ_{in} , μ_{out} – значения электрохимического потенциала для иона по обе стороны мембраны; C_{in} , C_{out} – концентрации иона по обе стороны мембраны (М); E – электрический потенциал на мембране (В); R – газовая постоянная; T – абсолютная температура (К); F – число Фарадея; z – заряд иона.

Значения мембранного потенциала E были получены в предварительных экспериментах и составляли для неактивированного пыльцевого зерна и трубки -37 и -77 мВ соответственно. Внутриклеточная концентрация Cl⁻ в гидратированном пыльцевом зерне табака $C_{in} \approx 50$ мМ (Андреюк и др., 2000), для трубки экспериментальные данные отсутствуют, поэтому, основываясь на результатах анализа различных растительных клеток (Taiz, Zeiger, 2006), было выбрано значение $C_{in} = 5$ мМ. Расчеты показали, что для подавления выхода Cl⁻ из пыльцевого зерна достаточно внести в среду 200 мМ Cl⁻, для пыльцевой трубки – 100 мМ. Эти концентрации и были использованы в экспериментах.

Среду с высокой концентрацией Cl⁻ готовили, добавляя в стандартную среду 4М HCl и доводя pH до 5.9 бис-трис-пропаном (0.5 М). Чтобы исключить изменение осмотических условий, в средах с высокой концентрацией Cl⁻ соответствующим образом уменьшали содержание сахарозы. В контроле вместо Cl⁻ добавляли маннит.

В экспериментах по изучению прорастания пыльцевых зерен NPPB или 200 мМ Cl⁻ присутствовали в среде с момента начала инкубации. При изучении роста пыльцевых трубок NPPB или 100 мМ Cl⁻ вносили в среду после того, как трубки, росшие в стандартной среде, достигали длины, большей диаметра пыльцевого зерна.

Эффективность прорастания пыльцы (доля пыльцевых зерен, проросших после 60 мин культивирования) определяли в фиксированных пробах. В каждой пробе просчитывали по 500 клеток.

Фиксация клеток. По окончании культивирования в суспензию клеток добавляли (в соотношении 1 : 1) 2%-ный раствор параформальдегида в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4. Продолжительность фиксации составляла 15 ч при 6°C. Пробы отмывали от фиксатора в двух сменах того же буфера.

Величину мембранного потенциала вегетивной клетки пыльцевого зерна и трубки определяли методом флуоресцентной микроскопии с использованием анионного красителя DiBAC₄(3) (bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol, "Molecular probes", Нидерланды), поступление которого в клетку зависит от потенциала на плазматической мембране (Emri et al., 1998). Расчет значений потенциала в мВ проводили по описанному ранее методу (Emri et al., 1998), используя формулу:

$$E = (RT/F) \ln(I/I_0),$$

где I , I_0 – интенсивность флуоресценции тестируемой клетки и клеток в фиксированной пробе (полностью деполяризованные клетки) соответственно.

Значения интенсивности флуоресценции для пыльцевых зерен включали поправку на неспецифическое связывание красителя с оболочкой. С этой целью одновременно с изучаемыми клетками окрашивали фрагменты оболочек, полученные при разрушении пыльцевых зерен. Неспецифического связывания красителя со стенкой трубки не выявлено.

Концентрация рабочего раствора красителя DiBAC₄(3) (5 мкМ) и продолжительность окрашивания (10 мин) были определены в предварительных экспериментах.

Выявление транспортных везикул и митохондрий. Транспортные везикулы выявляли по методу Партона с соавторами (Parton et al., 2001), окрашивая пыльцевые трубки липофильным красителем FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide, "Molecular probes", Нидерланды), который проникает в живую клетку только путем эндоцитоза и окрашивает различные популяции везикул (Samaž, 2005). Конечная концентрация красителя составляла 8 мкМ.

Митохондрии выявляли, окрашивая пыльцевые трубки флуоресцентным красителем NAO (110-N-nonyl acridine orange, "Molecular probes", Нидерланды) (Mileykovskaya et al., 2001). Конечная концентрация красителя составляла 5 мкМ.

В экспериментах по выявлению способности трубок к эндоцитозу FM4-64 присутствовал в ин-

кубационной среде в течение последних 20 мин культивирования.

Распределение транспортных везикул и митохондрий в трубке изучали, проращивая пыльцевые зерна в присутствии FM4-64 и NAO, после чего инкубировали в течение 10 мин в среде без красителей, которая содержала NPPV или 100 мМ Ca^{2+} , в контроле ингибиторы отсутствовали.

Выход анионов из пыльцевых зерен в раствор выявляли с помощью флуоресцентного индикатора MEQ (6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide, "Molecular Probes", Нидерланды). Стандартные навески пыльцевых зерен инкубировали в среде, содержащей 5 мкМ MEQ, в течение 2 или 10 мин. Затем пыльцу осаждали центрифугированием (60 с, 3000 g) и измеряли интенсивность флуоресценции красителя. В работе использовали спектрофлуориметр RF-5301PC ("Shimadzu", Япония). Флуоресценцию возбуждали при длине волны 344 нм, регистрировали при 445 нм. Аутофлуоресценция среды, в которой инкубировали пыльцевые зерна, была пренебрежимо мала.

Микроскопия, фотографирование и компьютерный анализ изображения. В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT ("Zeiss", Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.5, оснащенный цифровой камерой AxioCam HRC. Флуоресценцию возбуждали светом ртутной лампы, используя соответствующие блоки фильтров: для DiBAC₄(3) и NAO – возбуждение при $\lambda_{max} = 485$ нм, регистрация в диапазоне длин волн 515–565 нм; для FM4-64 – возбуждение при $\lambda_{max} = 546$ нм, регистрация при длинах волн более 590 нм. Препараты фотографировали с использованием скоростной автоматической заслонки, которая позволяла освещать препарат только в момент съемки и делать серии фотографий с определенным интервалом (45 с). Денситометрию и морфометрию объектов проводили с помощью указанного пакета программ.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили не менее чем в трех повторностях. Достоверность различий рассчитывали с помощью t -критерия Стьюдента. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучали эффективность прорастания пыльцевых зерен и скорость роста трубок в условиях блока выхода Ca^{2+} из клеток. Концентрации Ca^{2+} , блокирующие выход этого иона из пыльцевых зерен и трубок, по нашим расчетам (см. "Материал и методика"), составляли 200 и 100 мМ соответственно. Ниже показано подавление прорастания

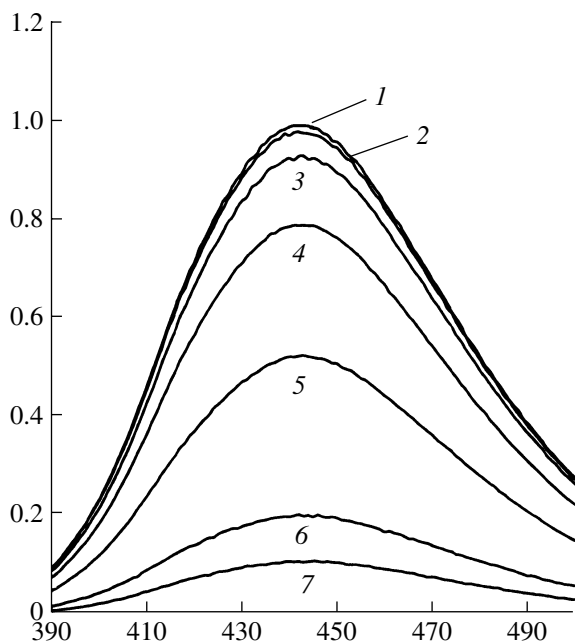


Рис. 1. Влияние различных анионов на спектр флуоресценции MEQ: 1 – раствор MEQ (5 мкМ) в стандартной среде инкубации; 2 – то же с добавлением глутаминовой кислоты; 3 – малат; 4 – цитрат; 5 – 20 мМ Cl⁻; 6 – 100 мМ Cl⁻; 7 – 200 мМ Cl⁻ (все анионы, кроме Cl⁻, взяты в концентрации 20 мМ, рН среды 5.9).

По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, отн. ед. (значения нормированы к интенсивности флуоресценции раствора красителя в максимуме при 445 нм).

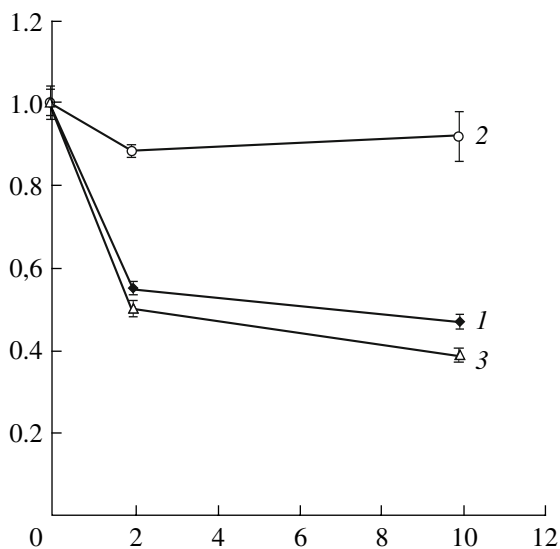


Рис. 2. Выход анионов из пылевых зерен, выявляемый по тушению флуоресценции MEQ: 1 – контроль (пыльцевые зерна инкубировали в стандартной среде прорастания без ингибиторов); 2 – в присутствии 40 мкМ NPPB; 3 – в присутствии 200 мМ Cl⁻.

По оси абсцисс – время инкубации, мин; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, отн. ед. (для каждой кривой за единицу принята интенсивность флуоресценции соответствующего раствора без добавления в него пыльцы).

пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок в присутствии 40 мкМ NPPB или Cl⁻.

	Контроль	Cl ⁻	NPPB
Эффективность прорастания, %	46.8 ± 1.90	2.9 ± 1.00	0.0 ± 1.00
Скорость роста трубок, мкМ/мин	0.58 ± 0.06	0.06 ± 0.06	0.00 ± 0.07

Эти данные демонстрируют полную остановку прорастания пыльцы и роста трубок в присутствии указанных концентраций Cl⁻, выявляя тем самым необходимость выхода Cl⁻ для реализации этих процессов. Аналогичным образом действовал ингибитор анионных каналов NPPB.

Для оценки эффективности блокирования выхода Cl⁻ использовали флуоресцентный индикатор MEQ, который реагирует на увеличение концентрации Cl⁻ в растворе тушением флуоресценции (Verkman et al., 1989). Эксперименты по оценке специфичности MEQ показали, что краситель реагирует не только на Cl⁻ (20, 100, 200 мМ), но и на органические анионы, цитрат и малат, взятые в концентрации 20 мМ, хотя действие Cl⁻ было наиболее выраженным; глутаминовая кислота не снижала флуоресценцию MEQ (рис. 1). Таким образом, использование MEQ позволяло выявить выход из пыльцевого зерна анионов, включая Cl⁻, и оценить полноту экспериментального блока этого процесса.

Интенсивность флуоресценции MEQ существенно снизилась после первых 2 мин инкубации пыльцевых зерен в среде с красителем (рис. 2), в последующие 8 мин она изменялась незначительно. В присутствии NPPB тушения флуоресценции практически не происходило (рис. 2), что свидетельствует о полном блоке анионных каналов. Полученные данные выявляют выход анионов из пыльцевого зерна в первые минуты его активации, который осуществляется, главным образом, через NPPB-чувствительные каналы. В присутствии 200 мМ Cl⁻ тушение красителя было несколько более выраженным, чем в контроле (рис. 2). Поскольку высокая концентрация Cl⁻ в среде инкубации препятствует выходу этого аниона, данный факт указывает на появление в среде других анионов, поступающих из пыльцевого зерна.

Зависимость мембранного потенциала от трансмембранного транспорта Cl⁻ изучали в процессе активации пыльцевого зерна (через 10 и 30 мин от начала процесса) и после образования пыльцевой трубки. В контрольных пробах мембранный потенциал возрастал по абсолютной величине в ходе активации (рис. 3, а); еще более отрицательные значения были характерны для пыльцевой трубки (рис. 3, б). Под действием NPPB в пыльцевом зерне и в трубке происходила заметная депо-

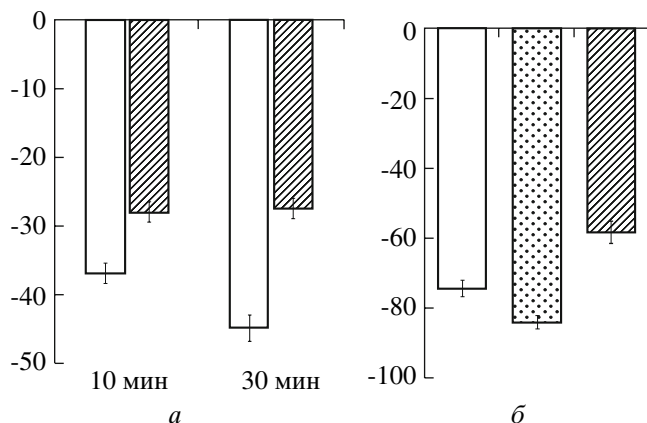


Рис. 3. Изменения мембранного потенциала (E , мВ) в условиях блока выхода Cl^- : *a* – пыльцевые зерна на начальной стадии активации (10-минутная инкубация) и полностью активированные (30-минутная инкубация); *б* – пыльцевые трубки (50-минутная инкубация). (□) – контроль, инкубация в стандартной среде; (▨) – то же + 40 мкМ NPPV; (▩) – стандартная среда + 100 мМ Cl^- .

ляризация мембраны (рис. 3). В присутствии 100 мМ Cl^- , напротив, происходила гиперполяризация мембраны трубки (рис. 3, б).

Влияние блока выхода Cl^- на эндоцитоз демонстрирует рис. 4. Включение красителя FM4-64 в кончик пыльцевой трубки наблюдали как в контроле, так и в присутствии 100 мМ Cl^- или NPPV. Однако NPPV существенно изменял картину последующего распределения красителя в трубке. В контроле и в присутствии 100 мМ Cl^- наблюдали формирование характерного окрашенного конуса в апикальной части трубки (рис. 4, *a*, *б*), NPPV подавлял формирование конуса, окрашенный материал оставался в примембранной области (рис. 4 *в*). Эти данные свидетельствуют о сохранении способности пыльцевых трубок к эндоцитозу в условиях блока выхода Cl^- и в то же время указывают на существенные нарушения в процессе транспорта органелл под действием NPPV.

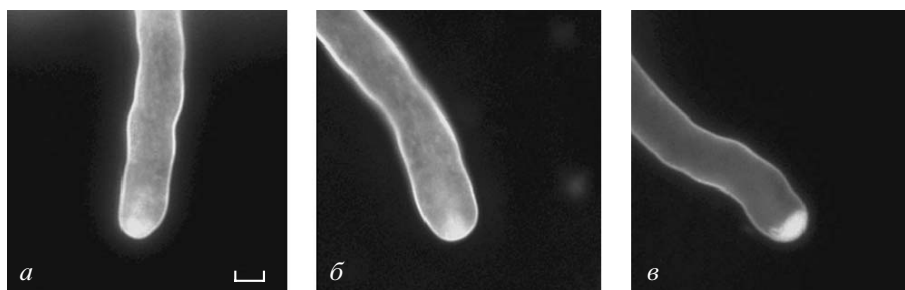


Рис. 4. Сохранение способности пыльцевых трубок к эндоцитозу в условиях блока выхода Cl^- . Инкубация пыльцевых зерен с трубками в течение 20 мин в стандартной среде без добавления ингибиторов (*a*), а также в присутствии 100 мМ Cl^- (*б*) и 40 мкМ NPPV (*в*) с последующей 20-минутной инкубацией с красителем FM4-64. Масштаб здесь и на рис. 5: 5 мкм.

Эти нарушения были еще более явными, когда с использованием двойной окраски изучали взаиморасположение в трубке движущихся везикул и митохондрий. На рис. 5 приведены характерные картины распределения органелл в трубках, которые росли в присутствии FM4-64 и NAO, а затем подвергались воздействию 100 мМ Cl^- или 40 мкМ NPPV. В контроле апикальная зона была свободна от митохондрий и включала конус транспортных везикул, такая картина сохранялась и в присутствии 100 мМ Cl^- . Под действием NPPV происходило перераспределение органелл: апикальный конус везикул исчезал, в апексе появлялись митохондрии, а мембранный материал, окрашенный FM4-64, распределялся в более дистальных областях трубки.

Анализ движения органелл во времени подтвердил (данные не приводятся), что 100 мМ Cl^- не нарушает движение митохондрий – в пыльцевых трубках сохранялось движение по типу “обратного фонтана” с разворотом в субапикальной зоне. В присутствии NPPV митохондрии продолжали двигаться вдоль трубки в обоих направлениях, но траектория их движения была продолжена в апикальную зону.

Таким образом, подавление выхода Cl^- препятствовало прорастанию пыльцевого зерна и росту пыльцевой трубки. NPPV полностью блокировал выход анионов из пыльцевого зерна, нарушал процесс гиперполяризации плазматической мембраны на начальном этапе прорастания и компартиментацию пыльцевой трубки, в частности организацию апикального компартмента. В присутствии 100 мМ Cl^- , т.е. в условиях избирательного блока выхода Cl^- из трубки, остановка роста не сопровождалась указанными изменениями структурной организации трубки, а величина мембранного потенциала сдвигалась в сторону отрицательных значений.

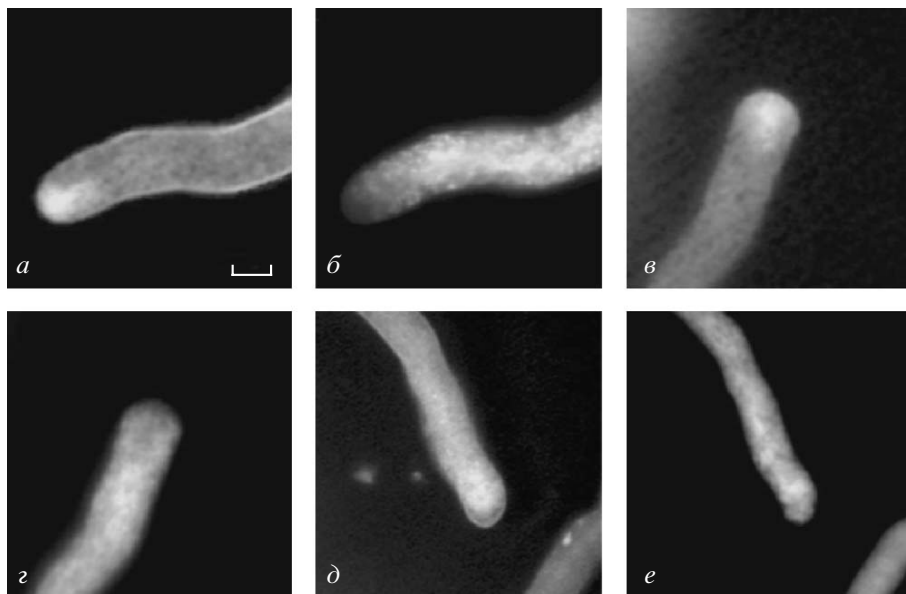


Рис. 5. Влияние блока выхода Cl^- из пыльцевых трубок на распределение в них транспортных везикул и митохондрий, выявляемых с помощью двойной окраски. Прорастание пыльцевых зерен и рост трубок происходили в среде с двумя красителями – FM4-64 (*a*, *в*, *д*) и NAO (*б*, *г*, *е*), затем пробы инкубировали в течение 10 мин в среде без красителей, содержащей NPPВ или Cl^- : *a*, *б* – контроль; *в*, *г* – 100 мМ Cl^- ; *д*, *е* – 40 мкМ NPPВ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Роль Cl^- в прорастании пыльцевого зерна изучали с использованием двух способов подавления переноса этого иона через плазматическую мембрану: во-первых, ингибировали выход анионов через каналы с помощью NPPВ, широко используемого в исследованиях клеток животных и растений (Jentsch et al., 2002; Roberts, 2006); во-вторых, селективно блокировали выход Cl^- , увеличивая его концентрацию во внеклеточной среде до уровня, обеспечивающего электрохимическое равновесие между внутри- и внеклеточным Cl^- . Выбор ингибитора был основан на проведенных ранее исследованиях (Матвеева и др., 2003б; Zonia et al., 2002). В этих работах NPPВ был отмечен как наиболее эффективный ингибитор в отношении подавления прорастания пыльцевого зерна (Матвеева и др., 2003б) и роста пыльцевой трубки (Zonia et al., 2002). Эффективные концентрации внеклеточного Cl^- были определены на основании расчетов (см. “Материал и методику”); их адекватность подтвердили наши эксперименты, в которых внеклеточный Cl^- полностью подавлял прорастание пыльцы (200 мМ Cl^-) и рост трубок (100 мМ Cl^-) (см. выше).

Вопрос о выявлении выхода Cl^- из пыльцевых зерен и трубок достаточно труден в методическом отношении. Использование ионоселективных микроэлектродов породило комплекс противоречий (Zonia et al., 2002; Messerli et al., 2004), которые мы попытались разрешить с помощью флуоресцентного метода. В качестве индикатора концентрации Cl^- был выбран MEQ, который ис-

пользуют в исследованиях клеток животных (Wöll et al., 1996). Предварительный анализ показал, что MEQ не является строго специфичным красителем на Cl^- . Его флуоресценция зависит, хотя и в меньшей степени, от присутствия малата или цитрата (рис. 1). Эти интермедиаты цикла Кребса присутствуют в пыльцевом зерне (Stanley, 1971) и предположительно могут выходить через анионные каналы, как это происходит в клетках корня (Ma et al., 2000). Таким образом, MEQ – это краситель, выявляющий изменения концентрации различных анионов, но чувствительный преимущественно к изменению концентрации Cl^- .

Данные о выходе анионов из пыльцевого зерна и о действии NPPВ на этот процесс (рис. 2) хорошо согласуются с результатами, полученными ранее на этом же объекте с помощью Cl^- -селективных электродов (Матвеева и др., 2003б). Условия электрохимического равновесия по Cl^- не препятствуют выходу из пыльцевого зерна других анионов (рис. 2). Вполне вероятно, что при этом из клетки вместо Cl^- выходят органические анионы, необходимые для прорастания, что и приводит к остановке ростовых процессов. В совокупности эти результаты демонстрируют важную роль в прорастании NPPВ-чувствительных анионных каналов, через которые в первые минуты активации из пыльцевых зерен выходит Cl^- .

Величина потенциала на плазматической мембране в ходе активации и прорастания пыльцевого зерна сдвигалась в сторону отрицательных значений (рис. 3), достигая в пыльцевой трубке

–77 мВ (рис. 3, б), что согласуется с данными, полученными другими методами (–55 мВ для *Agapanthus*; –100 мВ – для *Arabidopsis*) (Malhó et al., 1995; Mouline et al., 2001). Значения для пыльцевых зерен варьируют от –30 до –150 мВ (Weissenel, Wenisch, 1980; Feijó et al., 1995). Большой разброс в значениях потенциала может быть связан как с особенностями объектов, так и с методическими различиями, в частности с продолжительной инкубацией пыльцы в питательной среде при проведении микроэлектродных исследований (Obermeyer, Blatt, 1995). В настоящей работе использован неинвазивный флуоресцентный метод (Матвеева и др., 2004), позволяющий определять изменения мембранного потенциала в первые минуты от начала гидратации пыльцевого зерна.

Выявленные изменения мембранного потенциала в процессе активации пыльцевого зерна (рис. 3, а) предположительно связаны с увеличением активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны – главной электрогенной силы на плазматической мембране растительной клетки (Sze et al., 1999, 2006). В пользу этого предположения свидетельствуют данные об изменениях рН в ходе активации пыльцевого зерна: внутриклеточный рН сдвигается в щелочную сторону (Матвеева и др., 2002), внеклеточный – в кислую (Rodríguez-Rosales et al., 1989). Установлено также, что воздействия, ингибирующие (с помощью ванадата) или стимулирующие (с помощью фузикокина) работу H^+ -АТФазы, соответствующим образом изменяют эффективность прорастания пыльцы (Rodríguez-Rosales et al., 1989) и внутриклеточный рН (Матвеева и др., 2003а).

Ингибирование переноса Cl^- через плазматическую мембрану вызывало разнонаправленный эффект в зависимости от способа воздействия. Эффект 100 мМ Cl^- (рис. 3, б) хорошо согласуется с результатами изучения соматических клеток растений, согласно которым одна из главных функций Cl^- состоит в регуляции электрического потенциала на мембране, причем выход хлорида связан с деполяризацией мембраны (Sze et al., 2006). Эффект NPPV в пыльцевом зерне и трубке, по-видимому, является опосредованным и нуждается в дальнейшем изучении. Возможно, особенность пыльцевых зерен состоит в том, что NPPV-чувствительные каналы являются главным путем выхода анионов (рис. 2). Вместе с тем вход и выход анионов может происходить с участием различных транспортных белков. В частности, анионообменный белок выявлен в транскриптоме пыльцы *Arabidopsis* (Becker et al., 2003). Обсуждается также участие H^+ -анионного симпортера в переносе Cl^- через плазматическую мембрану пыльцевой трубки (Sze et al., 2006). Полученные данные (рис. 2) свидетельствуют о ключевой роли выходных анионных каналов в прорастании, оставляя открытым вопрос о роли входных потоков Cl^- .

Полный блок анионного выходного потока под действием NPPV может нарушать ионную регуляцию работы H^+ -АТФазы, которая контролирует как мембранный потенциал, так и внутриклеточный рН в растительных клетках. Можно предположить, что, действуя на протонную помпу, NPPV влияет не только на динамику мембранного потенциала (рис. 3), но и на величину внутриклеточного рН. Ранее было показано, что сдвиг рН цитозоля в кислую сторону в условиях блока выхода Cl^- этакриновой кислотой коррелирует с блоком прорастания пыльцевых зерен (Матвеева и др., 2003а).

Главным условием полярного роста клеток (пыльцевой трубки, корневого волоска, гифы гриба, зиготы фукуса, ризоида папоротника и др.) является упорядоченный процесс везикулярного транспорта, который обеспечивает формирование новой стенки и плазматической мембраны в апикальной части клетки (Geitmann et al., 2000; Hadley et al., 2006; Bushart et al., 2007). Наши данные показывают, что подавление выхода Cl^- из трубки не препятствует поступлению красителя FM4-64 в кончик (рис. 4), т.е. процесс эндоцитоза не нарушен. Анализ организации растущего компартмента и движения органелл показал, что в присутствии 100 мМ Cl^- , несмотря на остановку роста, сохранялась типичная картина движения органелл, описанная в литературе (Cheung, Wu, 2007), в то время как NPPV нарушал эту сегрегацию (рис. 5). Известно, что нарушение организации растущего компартмента, например ингибиторами полимеризации актина, останавливает рост трубки (Cheung, Wu, 2007). В то же время известны примеры, когда остановка роста не сопровождалась дезорганизацией растущего компартмента, в частности при действии на трубки фенилгликозида Ярива, который связывается с арабиногалактановыми белками (Roy et al., 1999).

Результаты исследования, представленные в нашей работе, демонстрируют два сценария остановки прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки в условиях блока выхода Cl^- . Согласно первому, полный блок выхода анионов нарушает процесс гиперполяризации мембраны и структуру растущего компартмента, и любой из этих причин, по-видимому, достаточно для остановки роста. По второму сценарию в условиях электрохимического равновесия по Cl^- видимые причины подавления роста трубки не обнаружены. Можно предположить, что клетка в этом случае вынуждена поддерживать потенциал на мембране за счет выброса органических анионов, при недостатке которых рост становится невозможным. Механизмы влияния анионных каналов на компартментацию цитоплазмы, взаимосвязь токов хлорида и калия, взаимовлияние анионных и кальциевых каналов представляют несомненный интерес и нуждаются в дальнейшем изучении.

Таким образом, полученные данные указывают на важную роль переноса Cl^- через плазматическую мембрану в прорастании пыльцевого зерна и в росте трубки. Активность хлоридных каналов необходима для регуляции потенциала на плазматической мембране и функциональной компартментации цитоплазмы, которая обеспечивает полярный рост.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреюк Д.С., Матвеева Н.П., Тукеева М.И. и др. Динамика неорганических ионов в микроспоре и пыльцевом зерне табака в процессе развития мужского гаметофита // Онтогенез. 2000. Т. 31. С. 114–119.
- Матвеева Н.П., Войцех О.О., Андреюк Д.С. и др. Роль H^+ -АТФазы и альтернативной оксидазы в регуляции величины внутриклеточного рН на разных стадиях развития мужского гаметофита табака // Там же. 2002. Т. 33. С. 436–443.
- Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Войцех О.О. и др. Регуляторные изменения внутриклеточного рН и выхода Cl^- на ранних стадиях прорастания пыльцевых зерен *in vitro* // Физиология растений. 2003а. Т. 50. С. 360–365.
- Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Трансмембранный перенос хлорида при прорастании пыльцевого зерна табака // Биохимия. 2003б. Т. 68. С. 1550–1555.
- Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Лазарева Е.А. и др. Влияние конканавалина А на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН в процессе активации пыльцевого зерна табака *in vitro* // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 549–554.
- Batley N.H., James N.C., Greenland A.J. et al. Exocytosis and endocytosis // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 643–659.
- Becker J.D., Boavida L.C., Carneiro J. et al. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 713–725.
- Bushart T.J., Roux S.J. Conserved features of germination and polarized cell growth: a few insights from a pollen–fern spore comparison // Annal. Bot. 2007. V. 99. P. 9–17.
- Cai G., Casino C.D., Romagnoli S. et al. Pollen cytoskeleton during germination and tube growth // Curr. Sci. 2005. V. 89. P. 1853–1860.
- Campanoni P., Blatt M.R. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 65–74.
- Cheung A.Y., Wu H.-M. Structural and functional compartmentalization in pollen tubes // Ibid. 2007. V. 58. P. 75–82.
- Dutta R., Robinson K.R. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1398–1406.
- Emri M., Balkay L., Krasznai Z. et al. Wide applicability of a flow cytometric assay to measure absolute membrane potentials on the millivolt scale // Eur. Biophys. J. 1998. V. 28. P. 78–83.
- Feijó J.A., Malhó R., Obermeyer G. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth // Protoplasma. 1995. V. 187. P. 155–167.
- Feijó J.A., Sainhas J., Hackett G.R. et al. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip // J. Cell Biol. 1999. V. 144. P. 483–496.
- Geitmann A., Emons A.M.C. The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth // J. Microscop. 2000. V. 198. P. 218–245.
- Hadley R., Hable W.E., Kropf D.L. Polarization of the endomembrane system is an early event in fucoid zygote development // BMC Plant Biol. 2006. V. 6. № 5. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/5>)
- Hepler P.K., Lovy-Wheeler A., McKenna S. et al. Ions and pollen tube growth // The pollen tube / Ed. Malhó R. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. P. 47–69.
- Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F. et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 503–568.
- Ma J.F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. P. 383–390.
- Malhó R., Read N.D., Trewavas A.J. et al. Calcium channel activity during pollen tube growth // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1173–1184.
- Malhó R., Liu Q., Monteiro D. et al. Signalling pathways in pollen germination and tube growth // Protoplasma. 2006. V. 228. P. 21–30.
- Messerli M.A., Danuser G., Robinson K.R. Pulsatile influxes of H^+ , K^+ and Ca^{2+} lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes // J. Cell Sci. 1999. V. 112. P. 1497–1509.
- Messerli M.A., Smith P.J.S., Lewis R. C. et al. Chloride fluxes in lily pollen tubes: a critical reevaluation // Plant J. 2004. V. 40. P. 799–812.
- Mileykovskaya E., Dowhana W., Birkeb R.L. et al. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces // FEBS Lett. 2001. V. 507. P. 187–190.
- Moreno N., Colaco R., Feijó J.A. The pollen tube oscillator: integrating biophysics and biochemistry into cellular growth and morphogenesis // Rhythms in plants: phenomenology, mechanisms, and adaptive significance / Eds. Mancuso S., Shabala S. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 39–62.
- Mouline K., Véry A.-A., Gaymard F. et al. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K^+ channel in *Arabidopsis* // Genes Devel. 2001. V. 16. P. 339–350.
- Obermeyer G., Blatt M.R. Electrical properties of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*: characteristics of the non-germinating pollen grain // J. Exp. Bot. 1995. V. 46. P. 803–813.
- Palanivelu R., Preuss D. Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms // Tr. Cell Biol. 2000. V. 10. P. 517–524.
- Parton R.M., Fischer-Parton S., Watahiki M.K. et al. Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes // J. Cell Sci. 2001. V. 114. P. 2685–2695.

- Roberts S.K. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots // *New Phytol.* 2006. V. 169. P. 647–666.
- Rodriguez-Rosales M.P., Roldan M., Belver A. et al. Correlation between *in vitro* germination capacity and proton extrusion in olive pollen // *Plant Physiol. Biochem.* 1989. V. 27. P. 723–728.
- Roy S.J., Holdaway-Clarke T.L., Hackett G.R. et al. Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role of calcium in exocytosis // *Plant J.* 1999. V. 19. P. 379–386.
- Samaj J. Methods and molecular tools for studying endocytosis in plants – an overview // *Plant endocytosis* / Eds. Samaj J. et al. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. P. 1–17.
- Stanley R.G. Pollen chemistry and tube growth // *Pollen: development and physiology* / Ed. Heslop-Harrison J. L.: Butterworths, 1971. P. 131–155.
- Sze H., Li X., Palmgren M.G. Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases: regulation and biosynthesis // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 677–689.
- Sze H., Frietsch S., Li X. et al. Genomic and molecular analyses of transporters in the male gametophyte // *The pollen tube* / Ed. Malho R. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. P. 71–93.
- Taiz L., Zeiger L. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Ass., 2006. 705 p.
- Verkman A.S., Sellers M.C., Chao A.C. et al. Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications // *Annal. Biochem.* 1989. V. 178. P. 355–361.
- Weisenseel M.H., Jaffe L.F. The major growth current through lily pollen tubes enters as K^+ and leaves as H^+ // *Planta.* 1976. V. 133. P. 1–7.
- Weisenseel M.H., Wenisch H.H. The membrane potential of growing lily pollen // *Z. Pflanzenphysiol.* 1980. V. 99. P. 313–323.
- Wöll E., Gschwentner M., Furst J. et al. Fluorescence-optical measurements of chloride movements in cells using the membrane-permeable dye diH-MEQ // *Eur. J. Physiol.* 1996. V. 432. P. 486–493.
- Zonia L., Cordeiro S., Tupy J. et al. Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2233–2249.

The Role of Cl^- in Pollen Germination and Tube Growth

M. A. Breygina, N. P. Matveeva, and I. P. Ermakov

School of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: pollen-ions@rambler.ru

Abstract—The involvement of Cl^- in cytoplasm polarization in the pollen tube and membrane potential control during pollen germination *in vitro* was studied by fluorescence techniques in *Nicotiana tabacum*. Cl^- release from cells was blocked by the anion channel inhibitor nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) or by the addition of Cl^- to the incubation medium. The concentrations of the inhibitor (40 μM) and extracellular Cl^- completely inhibiting pollen germination (200 mM) and pollen tube growth (100 mM) were used. The release of anions from the pollen grain has been revealed in the first minutes of hydration also in the presence of 200 mM Cl^- . The inhibitor blocked this process completely, which points to the significance of the NPPB-sensitive anion channels in the transmembrane Cl^- transport at the early activation stage. The pollen tube membrane was hyperpolarized in the presence of 100 mM Cl^- ; however, exogenous Cl^- had no effect on the compartmentalization and organelle movement in the tube. The inhibitor depolarized the plasma membrane in the pollen grain and tube and affected the polar organization of the cytoplasm and organelle movement. Thus, activity of NPPB-sensitive chloride channels was required to regulate the potential on the plasma membrane and to maintain the functional compartmentalization of the cytoplasm, which provides for the polar growth.

Key words: male gametophyte, pollen tube, apical growth, chloride, anion channels.