

УДК 581.14

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ПРОРАСТАНИИ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА¹

© 2009 г. А. В. Смирнова, Н. П. Матвеева, О. Г. Полесская, И. П. Ермаков

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

E-mail: smirnova-msu@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.11.08 г.

Окончательный вариант получен 01.06.09 г.

Изучали образование активных форм кислорода в пыльце на ранней стадии прорастания, подготавливающей образование пыльцевой трубки. В это время пыльцевое зерно гидратируется, резко увеличивает свой объем и переходит из состояния покоя к активному метаболизму. Использование флуоресцентных методов позволило обнаружить активные формы кислорода в цитоплазме и внутреннем слое оболочки пыльцевого зерна – интине. Цитоплазматические активные формы кислорода обнаружены, главным образом, в митохондриях, а внеклеточные – в апертурных зонах интины, а также в растворе, окружающем пыльцевые зерна *in vitro*. Содержание внеклеточных активных форм кислорода снижалось под действием супероксиддисмутазы (100 ед/мл) и дифенилениодонима (100 мкМ), что указывает на НАДФ·Н-оксидазу в качестве одного из возможных их продуцентов. В условиях подавления продукции внеклеточных активных форм кислорода (100 мкМ дифенилениодонима) или усиленной их ликвидации (при добавлении 10–100 мкМ аскорбиновой кислоты) число проросших пыльцевых зерен возрастало. Этот эффект исчезал при дальнейшем увеличении концентрации указанных реагентов. Результаты свидетельствуют о значимости процессов генерации/ликвидации внеклеточных активных форм кислорода для прорастания пыльцевого зерна.

Ключевые слова: пыльцевое зерно, прорастание, активные формы кислорода, красители DCFH-DA и MitoSOX.

Активные формы кислорода (АФК) – частично восстановленные или активированные его производные, такие как супероксидрадикал ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксилрадикал ($\cdot OH$), синглетный кислород (1O_2) и некоторые другие соединения, – являются токсичным побочным продуктом кислородного метаболизма и могут повреждать клеточные белки, липиды мембран и ДНК. Динамическое равновесие между образованием АФК и их ликвидацией в клетке поддерживается благодаря антиоксидантным системам, в числе которых белки и низкомолекулярные вещества (Halliwell, 2006; Полесская, 2007). Исследования последних лет показали, что АФК играют важную роль в регуляции важнейших физиологических процессов, включая рост и развитие, программируемую клеточную смерть, ответ на биотические и абиотические стрессы (Garper, Dolan, 2006; Иванов, 2007; Полесская, 2007; Dunand et al., 2007; Coelho et al., 2008). В клетках растений АФК могут выполнять сигнальные функции (Mittler et al., 2004), а также участвовать в модификации полимерного матрикса клеточной стенки, регу-

лируя тем самым ее жесткость (Garper, Dolan, 2006; Lindsay, Fry, 2007; Macpherson et al., 2008). Выявлено два разнонаправленных механизма модификации полимерного матрикса с участием АФК. Первый из них увеличивает жесткость стенки за счет сшивания структурных полимеров (тирозинсодержащих белков или фенолполисахаридных конъюгатов) в реакциях, происходящих с участием пероксидаз и H_2O_2 (Lindsay, Fry, 2007). Второй механизм способствует разрыхлению полимерного матрикса. Он предполагает, что в стенке образуется высокорекционно-способный $\cdot OH$, который разрезает полисахаридные цепи (Fry, 1998; Liskay et al., 2004).

Цитоплазматические АФК в растительной клетке образуются, главным образом, в митохондриях, хлоропластах и пероксисомах (Mittler et al., 2004). Одним из важных источников АФК, выявляемых в клеточной стенке, является НАДФ·Н-оксидаза плазматической мембраны. Она генерирует $O_2^{\cdot-}$, который легко превращается в H_2O_2 и может поступать в цитоплазму или выходить во внешнюю среду (Sagi, Fluhr, 2006). Предполагают также, что локализованные в стенке пероксидазы, а также оксалаток-

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

сидазы и аминоксидазы принимают участие в продукции H_2O_2 (Mittler et al., 2004).

Представления о роли АФК в жизнедеятельности растительной клетки сформировались на основании изучения процессов, происходящих в вегетативных органах растений, а также в культурах соматических клеток и протопластов. Данные об участии АФК в репродуктивных процессах практически отсутствуют. Лишь в последние годы появились сведения о накоплении H_2O_2 в папиллах рыльца и NO – в пыльце, которые послужили основой для предположения о сигнальных функциях АФК и NO в процессах взаимодействия пыльцевого зерна с клетками рыльца (McInnis et al., 2006). Показано участие H_2O_2 и NO в реализации ингибирующего действия УФ-В-излучения на прорастание пыльцевого зерна и рост трубки *in vitro* (He et al., 2006, 2007). Ингибирование активности НАДФ-Н-оксидазы плазматической мембраны дифенилениодоний хлоридом (diphenylene iodonium chloride, DPI) или посредством включения соответствующей антисмысловой последовательности подавляло рост пыльцевой трубки (Potocky et al., 2007). АФК были обнаружены в ее апикальной части.

Отсутствуют литературные данные о продукции АФК в начале прорастания пыльцевого зерна, когда происходит подготовка к образованию пыльцевой трубки. Этот этап в жизни мужского гаметофита представляет особый интерес, поскольку он связан с переходом из состояния физиологического покоя к активному росту (Heslop-Harrison, 1987). Пыльцевое зерно выходит из пыльника обезвоженным: содержание воды в пыльце табака *Nicotiana tabacum* L., например, составляет менее 10%. Его активация во влажной среде начинается с гидратации и резкого увеличения объема протопласта и поверхности сложно организованной оболочки, которая включает наружный слой – спорополлениновую экзину и внутренний слой – преимущественно полисахаридную интину. Механизмы, обеспечивающие уникальную способность полимерного матрикса интины к быстрому растяжению, не выяснены. Возможно, они связаны с изменениями состава функциональных групп этого матрикса, которые затрагивают содержание в нем пектинов и соединений фенольного типа (Мейчик и др., 2006, 2009).

В настоящей работе проверяли предположение о том, что процесс активации пыльцевого зерна сопровождается продукцией АФК, значимых для прорастания. В результате обнаружены места продукции АФК в пыльцевом зерне и установлено, что воздействия, снижающие содержание АФК в оболочке, влияют на эффективность прорастания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Растительный материал. Растения табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Petit Havana SR1) выращива-

ли из семян в климатической камере (25°C, 16-часовой световой день) в вермикулите вспученном, регулярно поливая их питательным раствором (Nitsch, 1965). Пыльники извлекали из цветков накануне раскрытия и помещали в термостат (25°C) на 2 сут. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при температуре –20°C. После размораживания пыльцевые зерна отмывали гексаном от трифины и высушивали на воздухе. Навески сухой пыльцы инкубировали во влажной камере (2 ч, 25°C), после чего их суспендировали в стандартной питательной среде (2 мг/мл) и инкубировали в течение 20–60 мин при 25°C.

Выделение и очистку экзин табака проводили, обрабатывая пыльцу смесью 1%-ной целлюлазы из *Trichoderma viride* и 1%-ной пектиназы из *Aspergillus niger* (“ICN”, США), растворенных в 25 мМ буфере MES-NaOH, pH 4.5 в течение 24 ч при 25°C. После этого пробы инкубировали сначала в 2%-ном растворе SDS (24 ч), а затем в 1%-ной HCl (30 мин). Все обработки чередовали с отмыванием материала дистиллированной водой на капроновых фильтрах (11 мкм) с помощью вакуумного насоса. Изолированные экзины фрагментировали с помощью гомогенизатора Diax 900 (“Heidolph”, Германия) при 26000 об/мин в течение 3 мин. Полученные фрагменты пятикратно отмывали стандартной питательной средой и использовали для окрашивания.

Протопласты выделяли из пыльцевых зерен лилии *Lilium longiflorum* Thunb., сорт World white. Пыльцу хранили, отмывали от трифины и выдерживали во влажной камере, как описано выше. После 30-минутной инкубации в стандартной питательной среде пыльцу переносили на 2 ч (29°C) в среду для выделения протопластов. Изолированные протопласты отмывали свежей средой, не содержащей ферменты, и немедленно использовали для окрашивания.

Состав питательных сред и добавляемые реагенты. Стандартная среда включала: 0.3 М сахарозу, 1.6 мМ H_3BO_3 , 3 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0.8 мМ $MgSO_4$ и 1 мМ KNO_3 в 50 мМ буфере MES-трис, pH 5.9.

Среда для выделения протопластов (Dutta, Robinson, 2004) содержала 1%-ную целлюлазу, 1%-ную пектиназу, 0.5 М глюкозу, 0.5 М сорбит, 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ KNO_3 , 0.2 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ $MgSO_4$, 1 мМ KI, 0.1 мМ $CuSO_4$, 5 мМ MES-трис, pH 5.7.

Использованы следующие реагенты: аскорбиновая кислота; 2',7'-дихлорофлуоресциндацетат (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA); супероксиддисмутаза (СОД); каталаза и 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) – “Sigma”, США; MitoSOX Red и MitoTracker Red CMXRos – “Molecular Probes”, Нидерланды; DPI – “MP Biomedicals, Inc.” Франция; целлюлаза и пектиназа – “ICN”, США.

Рабочие растворы ферментов готовили непосредственно перед проведением эксперимента. Кон-

центрированные растворы DPI (5 мг/мл), MitoSOX (5 мМ) и MitoTracker Red CMXRos (0.5 мМ) готовили в ДМСО; DCFH-DA (5 мМ) – в этаноле, а раствор DAPI (1 мг/мл) – в воде. Хранили их при -20°C . Дегидрохлорированный 2',7'-дихлорофлуоресцин (2',7'-dichlorodihydrofluorescein, DCFH) получали из DCFH-DA посредством гидролиза в NaOH (10 мМ) в течение 1 ч при 25°C (Cathcart et al., 1983). Затем гидролизат нейтрализовали 25-кратным объемом цитратно-фосфатного буфера (рН 6) и хранили в темноте на льду не более 2 ч. Аскорбиновую кислоту растворяли в питательной среде непосредственно перед использованием. рН этих растворов при необходимости доводили до 5.9 с помощью 1 М *трис*. В качестве источника $\text{O}_2^{\cdot-}$ использовали рибофлавин, освещаемый УФ (Beauchamp, Fridovich, 1971). Свежеприготовленный раствор рибофлавина (8 мкМ) в 50 мМ буфере $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$, рН 7.4, содержащем 1 мМ ЭДТА, освещали УФ в течение 1 мин. В контрольных пробах рибофлавин в среде отсутствовал.

Подготовка и окрашивание проб. Эффективность прорастания пыльцевых зерен определяли после 60 мин инкубации. DPI и аскорбиновую кислоту добавляли в среду до начала инкубации. По окончании культивирования пробы фиксировали, добавляя равный объем охлажденного 2%-ного раствора параформальдегида ("Germed", Германия) в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4. Проросшими считали пыльцевые зерна с трубками длиной не менее радиуса пыльцевого зерна. В каждой пробе просчитывали по 500 пыльцевых зерен.

Для выявления АФК, локализованных в цитоплазме и выделяемых в окружающую среду, использовали флуоресцентный краситель, чаще других применяемый в исследованиях животных и растительных клеток, – DCFH (Halliwell, Whiteman, 2004; Potocky et al., 2007; Coelho et al., 2008). Он не проявляет специфичности к определенному виду АФК, но позволяет выявить изменения их продукции в целом (Halliwell, Whiteman, 2004). Эфир DCFH-DA свободно проникает в клетки, где гидролизуется эстеразами до DCFH, который в свою очередь окисляется АФК с образованием флуоресцентной формы DCF (Halliwell, Whiteman, 2004). Часть красителя гидролизуется и окисляется в клеточной стенке, выявляя локализованные в ней АФК.

Пыльцу окрашивали 50 мкМ DCFH-DA (10 мин), затем отмывали свежей средой без красителя и использовали для микроскопии.

Выход АФК в раствор определяли, используя дегидрохлорированный DCFH. Пыльцевые зерна инкубировали в течение 20 мин в стандартной среде в присутствии одного из следующих реагентов (в контроле – без них): 100 мкМ DPI, 100 мкМ аскорбиновая кислота или 100 ед/мл СОД + 100 ед/мл каталаза. Затем пыльцу осаждали (6000 g, 5 мин) и к супернатанту добавляли DCFH до конечной концентрации 10 мкМ. После 10 мин инкубации измеряли интен-

сивность флуоресценции проб на спектрофлуориметре RF-5301 PC ("Shimadzu", Япония), возбуждая флуоресценцию при длине волны 524 нм и регистрируя – при 488 нм. Дополнительный контроль включал инкубацию красителя с каждым из указанных выше реагентов в стандартной среде, не кондиционированной пыльцевыми зернами.

Для обнаружения выхода АФК в оболочку использовали также MitoSOX, который представляет собой производное этидия и широко применяется при изучении генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$ митохондриями (Robinson et al., 2006). В гидрофобном окружении окисленный краситель интенсивно флуоресцирует при возбуждении в зеленой области. В качестве гидрофобной матрицы может служить молекула ДНК или искусственная гидрофобная мембрана (Olmstedt, Kearns, 1977; Bunker et al., 1999). В нашей работе предложено в качестве такой матрицы использовать гидрофобную экзину пыльцевого зерна. В предварительных опытах с окрашиванием изолированных и отмывтых экзин (5 мкМ MitoSOX, 10 мин) было показано, что после инкубации красителя с $\text{O}_2^{\cdot-}$ (способ генерации последнего описан выше) интенсивность флуоресценции красителя, связанного с экзиной, возрастала на 72% ($p < 0.01$). В соответствии с литературными данными (Robinson et al., 2006) добавление H_2O_2 (1 мМ) не оказывало эффекта.

Окраску пыльцевых зерен MitoSOX проводили после их инкубации в присутствии 100 мкМ DPI или 100 ед/мл СОД (в контроле – без добавок) в течение 20 мин, затем добавляли краситель до конечной концентрации 5 мкМ и окрашивали в течение 10 мин, после чего их просматривали в микроскопе. Одновременно окрашивали фрагменты изолированных экзин с тем, чтобы учесть вклад неспецифической флуоресценции красителя, не связанной с генерацией АФК.

В экспериментах с двойной окраской протопластов, выделенных из пыльцевых зерен лилии, наряду с DCFH-DA использовали флуоресцентный краситель MitoTracker Red CMXRos, специфически выявляющий активные митохондрии. Протопласты окрашивали сначала в растворе MitoTracker Red CMXRos (500 нМ) в течение 20 мин, затем инкубировали в 50 мкМ DCFH-DA (5 мин) и отмывали в среде без красителей.

Микроскопия и компьютерный анализ изображений. В работе использовали исследовательский микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, цифровую камеру AxioCam HRc и пакет программ AxioVision 4.7 ("Zeiss", Германия). Флуоресценцию возбуждали ртутной лампой. Для анализа флуоресценции использовали следующие блоки фильтров. Для DAPI: возбуждение – в диапазоне 359–371 нм, регистрация – при длинах волн > 397 нм; для DCF: возбуждение – 475–495 нм, регистрация – 515–565 нм; для

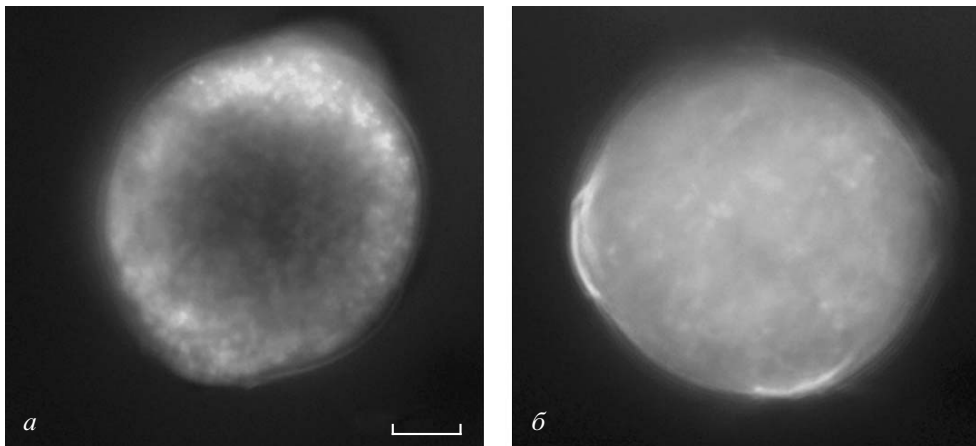


Рис. 1. Выявление АФК в пыльцевом зерне с помощью флуоресцентного красителя DCFH-DA. Внутриклеточные АФК сосредоточены в многочисленных ярко флуоресцирующих органеллах (а), внеклеточные – в апертурных областях интины (б). Масштаб – 8 мкм.

MitoTracker Red CMXRos и MitoSOX: возбуждение – 540–552 нм, регистрация – при длинах волн >590 нм. Среднюю интенсивность окрашивания пыльцевых зерен определяли в режиме автоматических измерений.

В предварительных опытах было установлено, что аутофлуоресценция пыльцевых зерен, изолированных экзин и протопластов пренебрежимо мала по сравнению с соответствующими величинами для окрашенных объектов.

Статистическая обработка. Все опыты проводили не менее чем в пяти биологических повторностях. Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 или 0.01. На рисунках приведены средние значения \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявление АФК в цитоплазме и оболочке пыльцевого зерна. Анализ пыльцевых зерен, окрашенных DCFH-DA, выявил два клеточных компартмента с высокой интенсивностью флуоресценции и, следовательно, с увеличенным содержанием АФК: во-первых, это многочисленные внутриклеточные органеллы (рис. 1, а) и, во-вторых, интина, а именно ее поровые области (рис. 1, б).

Можно было предположить, что указанные органеллы являются митохондриями. Для проверки этого предположения пробы одновременно окрашивали двумя красителями, которые различались по спектру флуоресценции. DCFH-DA (максимум флуоресценции в зеленой области) выявлял АФК (рис. 2, а), MitoTracker Red (флуоресцирует в красной области) специфично окрашивал активные митохондрии (рис. 2, б). Для того чтобы исключить неспецифическое связывание митохондриального красителя с экзиной, в этих опытах использовали

протопласты, выделенные из пыльцевых зерен лилии. Последовательный анализ флуоресценции обоих красителей в одном и том же протопласте выявил совпадение мест их связывания (рис. 2, в), что указывает на локализацию продукции внутриклеточных АФК в митохондриях.

Анализ образования внеклеточных АФК был продолжен с помощью изучения жидкой среды, в которой кратковременно (20 мин) инкубировали пыльцу. Такая кондиционированная среда увеличивала интенсивность флуоресценции дезэтерифицированного DCFH (рис. 3), что указывает на присутствие в ней АФК. Этот вывод подтверждают данные опытов, в которых кондиционирование среды происходило в присутствии антиоксидантов – аскорбиновой кислоты (100 мкМ) или СОД (100 ед/мл) + каталаза (100 ед/мл). Интенсивность флуоресценции DCF при этом существенно снижалась (рис. 4). DPI (100 мкМ) – ингибитор НАДФ-Н-оксидазы плазматической мембраны – так же, хотя и в меньшей степени, уменьшал эту величину, предположительно подавляя образование $O_2^{\cdot-}$. Контрольные измерения не выявили взаимодействия DPI, аскорбиновой кислоты, СОД и каталазы с красителем и показали, что аутофлуоресценцией разнообразных веществ, вымываемых в раствор из оболочки пыльцевого зерна, можно пренебречь (рис. 3).

Образование внеклеточных АФК пыльцевым зерном и зависимость этого процесса от DPI были подтверждены независимым методом с использованием красителя MitoSOX. В пыльцевых зернах, окрашенных MitoSOX, флуоресценция была наиболее интенсивной в области апертур (рис. 5), где и были проведены измерения, результаты которых представлены на рис. 6. Интенсивность флуоресценции пыльцевых зерен примерно в три раза превышала величину неспецифической флуоресценции красителя, связанного с фрагментами отмытой экзины в

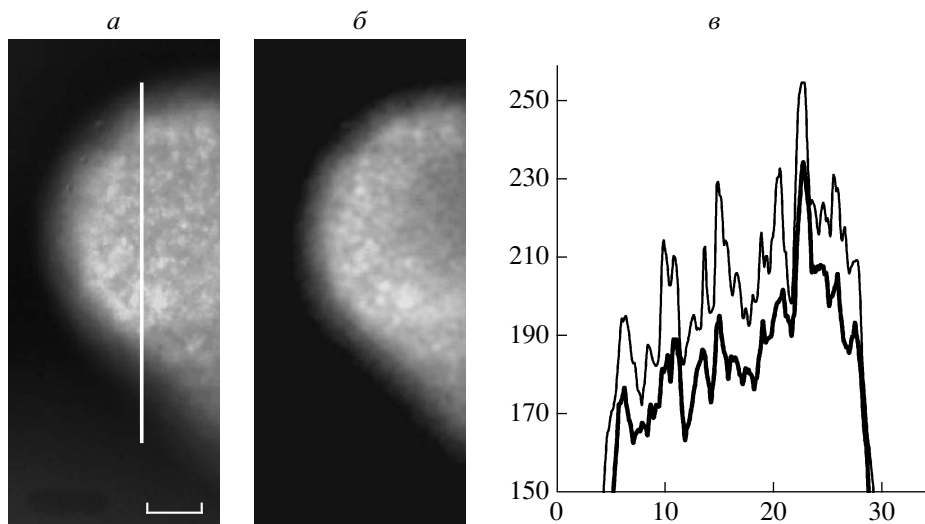


Рис. 2. Двойная окраска протопластов лилии DCFH-DA, выявляющим АФК (а, флуоресценция в зеленой области), и митохондриальным красителем MitoTracker Red CMXRos (б, флуоресценция в красной области), а также профиль распределения интенсивности флуоресценции этих красителей (по оси ординат, отн. ед.) вдоль линии сканирования, обозначенной на а (по оси абсцисс, мкм) (в).

(-) – DCFH-DA, (—) – MitoTracker Red. Максимумы флуоресценции соответствуют положению окрашенных органелл, их совпадение для обоих красителей указывает на митохондрии как главный источник АФК в цитоплазме. Масштаб – 10 мкм.

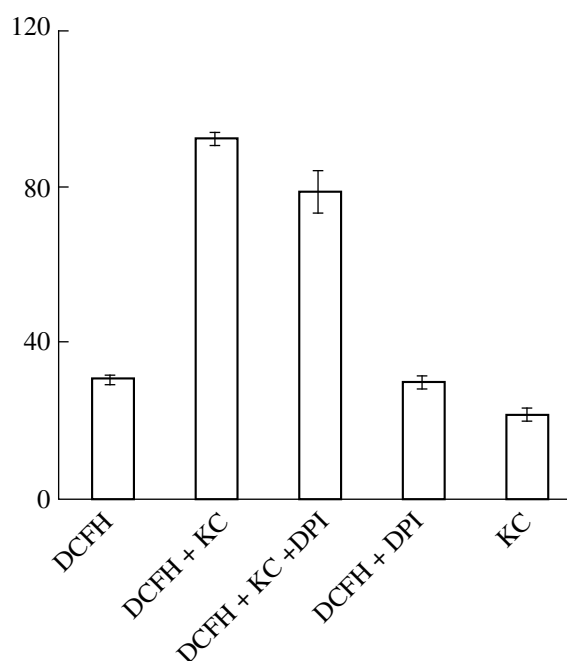


Рис. 3. Выход АФК из пыльцевых зерен в суспензионной культуре, выявляемый по увеличению интенсивности флуоресценции DCF, отн. ед.

Контроль: DCFH – стандартная среда, DCFH + DPI – то же + DPI; KC – кондиционированная пыльцевыми зернами среда без добавления красителя (пренебрежимо низкая аутофлуоресценция), DCFH + KC – добавление к среде, кондиционированной пыльцевыми зернами, DCFH; DCFH + KC + DPI – добавление к среде, в которой пыльцевые зерна инкубировали в присутствии 100 мкМ DPI, DCFH.

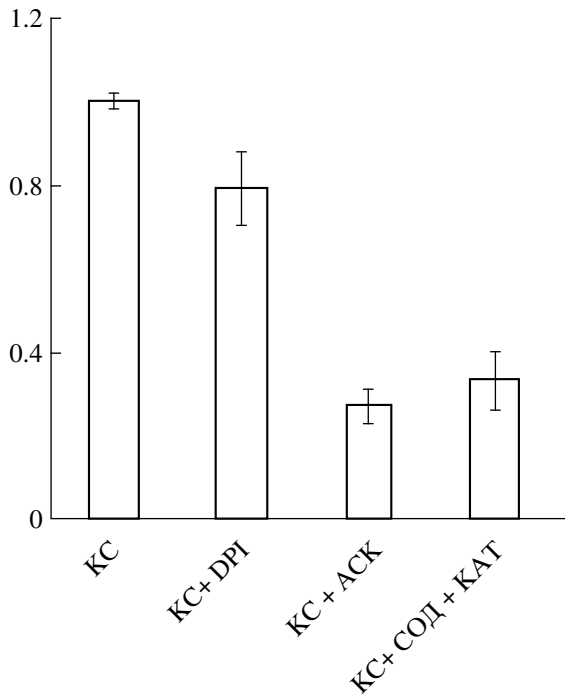


Рис. 4. Изменение содержания АФК (интенсивности флуоресценции DCF, отн. ед.) в среде, кондиционированной пыльцевыми зёрнами (КС) в присутствии 100 мкМ DPI (КС + DPI), 100 мкМ аскорбиновой кислоты (КС + АСК); смеси 100 ед/мл СОД и 100 ед/мл каталазы (КС + СОД + КАТ). За единицу принята интенсивность флуоресценции DCF в контроле.

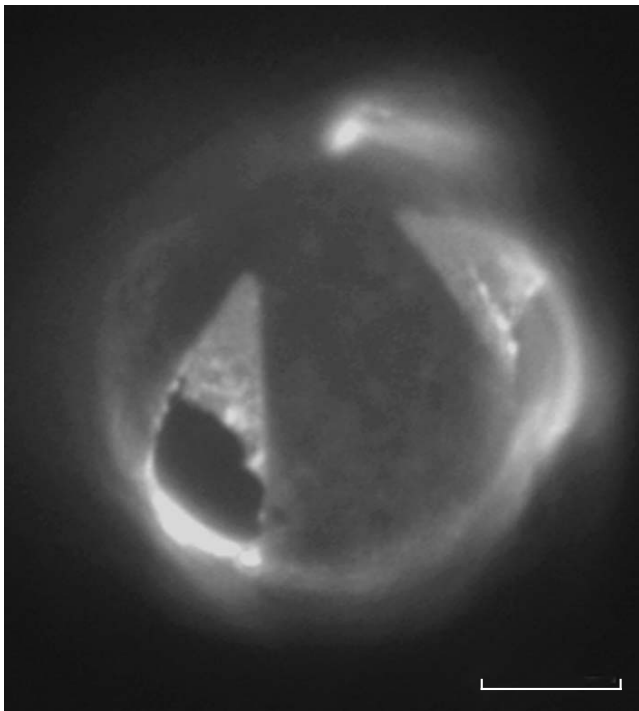


Рис. 5. Пыльцевое зёрно, окрашенное MitoSOX. Окисленный краситель связался преимущественно с апертурными областями экзины. Масштаб – 10 мкм.

отсутствие АФК. Под действием СОД (100 ед/мл) интенсивность флуоресценции снижалась, $p < 0.05$ (рис. 6), демонстрируя подавление выхода O_2^- в оболочку. Аналогичным образом действовал DPI (100 мкМ) (рис. 6).

Действие DPI и аскорбиновой кислоты на прорастание пыльцевых зёрен и содержание в них АФК. Для того чтобы установить, в какой мере значимы внеклеточные АФК, выявленные при активации пыльцевых зёрен, изучали их прорастание в условиях подавления продукции АФК (в присутствии DPI) или усиленной их ликвидации посредством добавления в инкубационную среду мощного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. Концентрацию DPI варьировали в диапазоне 10–200 мкМ, которую обычно используют для ингибирования НАДФ-Н-оксидазы в клетках растений (Foreman et al., 2003; Potocky et al., 2007; Macpherson et al., 2008). Под действием DPI (100 мкМ) эффективность прорастания возрастала почти на 30% (рис. 7, а). В присутствии DPI (200 мкМ) прорастание заметно снижалось ($p < 0.01$) и не отличалось от контроля, как и в растворе с низкой концентрацией этого ингибитора (10 мкМ).

Действие аскорбиновой кислоты на прорастание также зависело от ее концентрации: 10 и 100 мкМ растворы увеличивали эффективность прорастания на 18 и 40% соответственно, $p < 0.01$ (рис. 7, б). Однако при дальнейшем увеличении концентрации (0.5 и 1 мМ) стимулирующий эффект исчезал и даже сменялся ингибированием прорастания (5 мМ).

Для того чтобы установить, изменяют ли DPI и аскорбиновая кислота содержание внутриклеточных АФК или их эффекты связаны только с реакциями, идущими во внеклеточном матриксе, изучали флуоресценцию пыльцевых зёрен, окрашенных DCFH-DA, в указанных диапазонах концентраций обоих реагентов. DPI (100 мкМ) снижал интенсивность флуоресценции окрашенных пыльцевых зёрен на 18% ($p < 0.05$) (рис. 7, а). Для аскорбиновой кислоты значимые изменения интенсивности флуоресценции (снижение на 20%), а следовательно, и содержания внутриклеточных АФК выявлены лишь при максимальной ее концентрации (5 мМ), подавляющей прорастание (рис. 7, б). Следовательно, стимулирующее действие аскорбиновой кислоты на прорастание обусловлено процессами, происходящими в оболочке.

ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью чувствительных флуоресцентных методов обнаружено образование значимых количеств АФК в цитоплазме и оболочке пыльцевого зёрна (рис. 1, 5), которое готовится к прорастанию. Ранее внеклеточные АФК были обнаружены в апопластной жидкости в корнях, листьях, гипокоттилях и корневых волосках (Rodriguez et al., 2002;

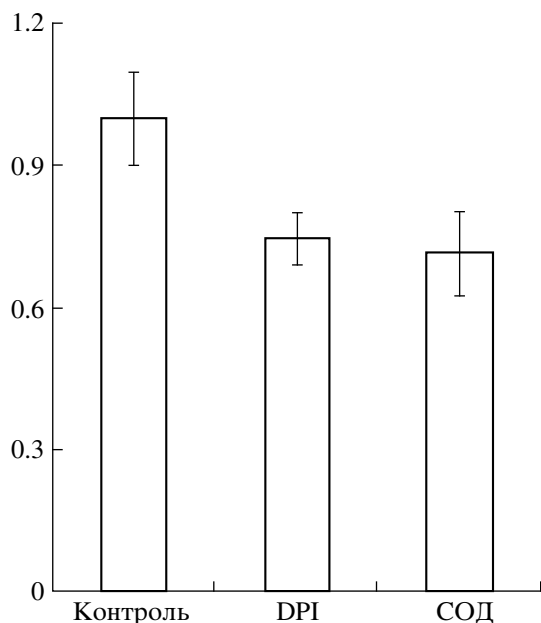


Рис. 6. Влияние DPI (100 мкМ) и СОД (100 ед/мл) на интенсивность флуоресценции пыльцевых зерен, окрашенных MitoSOX, отн. ед. За единицу принята интенсивность флуоресценции MitoSOX в контроле.

Liszakay et al., 2004; Pedreira et al., 2004; Monshausen et al., 2007).

Эксперименты с одновременной окраской протопластов пыльцевых зерен митохондриальным красителем и красителем на АФК (MitoTracker Red и DCFH-DA соответственно) выявили совместную локализацию их мест связывания (рис. 2). Это указывает на продукцию АФК в митохондриях. Аналогичным образом с использованием двойной окраски DCFH-DA и MitoTracker Red было показано, что митохондрии продуцируют АФК в зиготе фукуса (Soelho et al., 2002). Вывод о том, что митохондрии – главный источник цитоплазматических АФК, согласуется со сведениями по цитологии пыльцевого зерна, согласно которым число митохондрий в нем очень велико, а другие потенциальные источники АФК (хлоропласты, пероксисомы) отсутствуют (Cresti et al., 1985). При изучении пыльцевой трубки лилии также была выявлена корреляция между продукцией АФК и распределением митохондрий (Cardenas et al., 2006).

Внеклеточные АФК, продуцируемые пыльцевыми зернами в суспензионной культуре, были обнаружены как на поверхности клеток (рис. 1, б; 5), так и в окружающем их растворе (рис. 3). Наличие АФК в среде, кондиционированной пыльцевыми зернами, подтверждают данные о снижении интенсивности флуоресценции DCF под действием антиоксидантов – аскорбиновой кислоты и СОД в смеси с каталазой (рис. 4). Аналогичным образом эффект

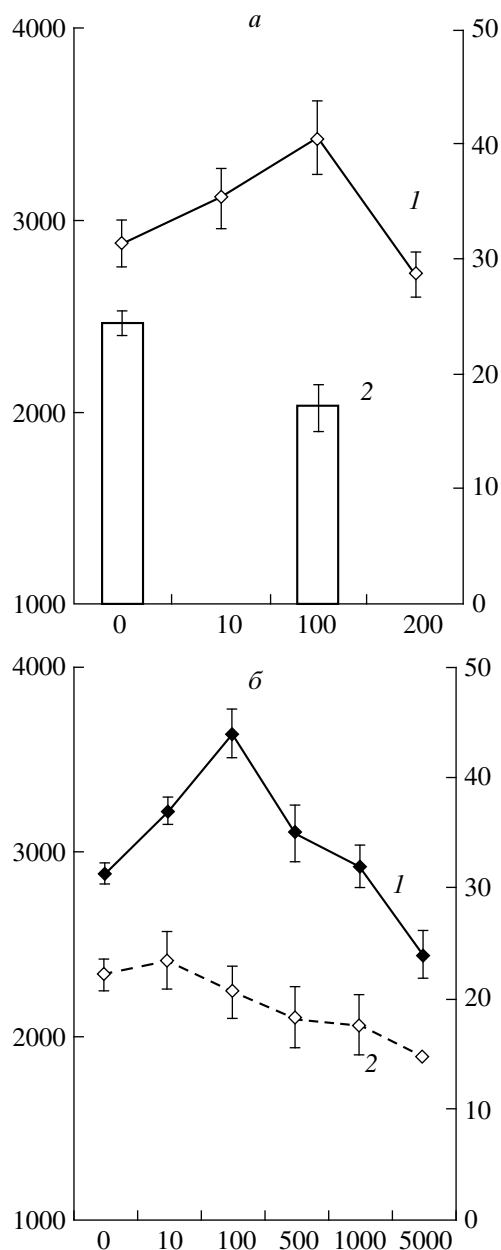


Рис. 7. Влияние концентрации DPI (а) и аскорбиновой кислоты (б) (по оси абсцисс, мкМ) на: эффективность прорастания (доля пыльцевых зерен, проросших за 60 мин, % – по оси ординат справа, 1) и содержание внутриклеточных АФК (интенсивность флуоресценции DCF, отн. ед. – по оси ординат слева, 2).

СОД при окрашивании пыльцевых зерен MitoSOX демонстрирует выделение O_2^- в оболочку (рис. 6). Этот факт, наряду с данными о действии DPI на продукцию АФК (рис. 4, б), позволяет предполагать участие НАДФ-Н-оксидазы плазматической мембраны в генерации внеклеточных АФК. Косвенным образом на это указывают и литературные данные. Действительно, в пыльцевом зерне экспрессируют-

ся гены НАДФ-Н-оксидазы, в том числе специфичные для пыльцы *Atrboh H* и *Atrboh J* (Sagi, Fluhr, 2006). Белковый компонент, узнаваемый антителами к НАДФ-Н-оксидазе человека, выявлен в периплазматическом пространстве вегетативной клетки пыльцевого зерна (Boldogh et al., 2005).

Результаты наших экспериментов по действию DPI и аскорбиновой кислоты на прорастание выявили влияние внеклеточных АФК на этот процесс. Выбор аскорбиновой кислоты для снижения уровня эндогенных внеклеточных АФК определяется тем, что она является одним из наиболее мощных антиоксидантов в растительной клетке. Она ликвидирует $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и синглетный кислород и присутствует во всех клеточных компартментах, включая апопласт (Smimoff, 2000). Экзогенная аскорбиновая кислота в наших опытах выступала как внеклеточный антиоксидант (рис. 4), поскольку в суспензионных культурах пыльцы при pH 5.9 она находилась в форме аниона ($pK_{a1} = 4.2$; $pK_{a2} = 11.6$) и не могла проникнуть через плазматическую мембрану (Nogmans et al., 2000). Эксперименты подтвердили, что добавление аскорбиновой кислоты, исключая концентрацию 5 мМ, не изменяло содержание АФК в цитоплазме (рис. 7, б). Вместе с тем выявлено стимулирующее действие аскорбиновой кислоты в умеренных концентрациях (10 и 100 мкМ) на прорастание (рис. 7, б). Выход за оптимум в сторону больших концентраций реагента подавлял прорастание.

Аналогичным образом действовал DPI: в концентрации 100 мкМ он снижал продукцию внеклеточных АФК (рис. 4, б) и стимулировал прорастание пыльцы (рис. 7, а). Увеличение же его концентрации до 200 мкМ снижало прорастание до уровня контроля. Содержание внутриклеточных АФК в пыльцевом зерне под действием DPI немного снижалось (рис. 7, а), подобно тому, как это происходило в клетках корневых волосков и листьев (Rodriguez et al., 2002; Foreman et al., 2003).

Клетки растений по-разному реагируют на DPI, но сходным образом – на экзогенную аскорбиновую кислоту. Действительно, DPI ингибировал удлинение корней, листьев и рост пыльцевых трубок (Rodriguez et al., 2002; Dunand et al., 2007; Potocky et al., 2007), но стимулировал образование корневых волосков (Dunand et al., 2007) и прорастание пыльцы (рис. 7, а). Аскорбиновая кислота стимулировала рост корней и корневых волосков (Sanchez-Fernandez et al., 1997; Cordoba-Pedregosa et al., 2005), а также прорастание пыльцы (рис. 7, б). Действие аскорбиновой кислоты на ростовые процессы в значительной мере обусловлено ее участием в модификации клеточной стенки. Выступая как антиоксидант, аскорбиновая кислота ингибирует образование поперечных сшивок между макромолекулами, но при определенных условиях она может способствовать образованию *ОН в апопласте (Fry, 1998). Оба эти

процесса в конечном счете способствуют уменьшению жесткости клеточной стенки.

Можно предположить, что снижение содержания АФК в интине под действием DPI или аскорбиновой кислоты увеличивает пластичность полимерного матрикса и оптимизирует процесс прорастания пыльцы *in vitro*. Ранее вопрос о модификации интины рассматривался только в связи с действием гидролитических ферментов – пектиназ и пектинметилэстераз (Parre, Geitmann, 2005). Экзогенная пектиназа увеличивала пластичность интины и влияла на прорастание и рост трубки. При этом также обнаружен концентрационный оптимум, в котором пектиназа стимулировала прорастание, что хорошо согласуется с нашими данными (рис. 7).

Вопрос о том, в какой мере НАДФ-Н-оксидаза контролирует прорастание пыльцы на рыльце (Carol, Dolan, 2006), остается открытым.

Рассмотренные данные, с одной стороны, подтверждают зависимость прорастания от внеклеточных АФК, продуцируемых пыльцевым зерном. С другой стороны, выясняется, что, сдвигая соотношение процессов продукции/ликвидации АФК, удается повысить эффективность прорастания пыльцы. Иными словами, в условиях *in vitro* пыльца прорастает при неоптимальном соотношении указанных процессов. Возможно, в этих условиях теряется часть легко вымываемых компонентов антиоксидантных систем оболочки (включая аскорбиновую кислоту (Hegde, 1985)). Заслуживает также внимания вопрос о возможном присутствии антиоксидантов в экссудате рыльца, который окружает пыльцевое зерно при опылении на рыльце пестика.

Таким образом, мы показали, что на начальном этапе активации в пыльцевом зерне образуются АФК. Главным источником внутриклеточных АФК являются митохондрии, а в образовании внеклеточного $O_2^{\cdot-}$ предположительно участвует НАДФ-Н-оксидаза плазматической мембраны. Воздействия, направленные на изменение содержания АФК в интине (ингибирование их продукции, частичная ликвидация антиоксидантом), влияют на эффективность прорастания, демонстрируя важную роль пространственно-временной регуляции продукции АФК и активности антиоксидантов в интине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Иванов В.Б. Окислительный стресс как один из механизмов образования и поддержания ствольных клеток в корне // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 1365–1370.

Мейчик Н.Р., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И. и др. Особенности состава ионогенных групп полимерного матрикса оболочки пыльцевого зерна лилии // Там же. 2006. Т. 71. С. 1103–1111.

Мейчик Н.Р., Смирнова А.В., Матвеева Н.П. и др. Изменение состава ионогенных групп оболочки пыльцевого

- зерна лилии при активации прорастания // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 232–240.
- Полеская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Изд-во МГУ, 2007. 139 с.
- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276–287.
- Boldogh I., Bacsi A., Choudhury B.K. et al. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal augments antigen-induced allergic airway inflammation // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. P. 2169–2179.
- Bunker C.E., Rollins H.W., Ma B. et al. Fluorescence spectroscopic probing of two distinctive microenvironments in perfluorinated ionomer membranes // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 1999. V. 126. P. 71–76.
- Cardenas L., McKenna S.T., Kunkel J.G. et al. NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth // Plant Physiol. 2006. V. 142. P. 1460–1468.
- Carol R.J., Dolan L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 1829–1834.
- Cathcart R., Schwiers E., Ames B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay // Anal. Biochem. 1983. V. 134. P. 111–116.
- Coelho S.M., Taylor A.R., Ryan K.P. et al. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in fucus rhizoid cells // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 2369–2381.
- Coelho S.M., Brownlee C., Bothwell J. A tip-high, Ca²⁺-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes // Planta. 2008. V. 227. P. 1037–1046.
- Cordoba-Pedregosa M.C., Villalba J.M., Cordoba F. et al. Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. // J. Exp. Bot. 2005. V. 412. P. 685–694.
- Cresti M., Ciampolini F., Mulcahy D.L.M. et al. Ultrastructure of *Nicotiana glauca* pollen, its germination and early tube formation // Am. J. Bot. 1985. V. 72. P. 719–727.
- Dunand C., Crevecoeur M., Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases // New Phytol. 2007. V. 174. P. 332–341.
- Dutta R., Robinson K.R. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1398–1406.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // Nature. 2003. V. 422. P. 442–446.
- Fry S.C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals // Biochem. J. 1998. V. 332. P. 507–515.
- Gapper C., Dolan L. Control of plant development by reactive oxygen species // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 341–345.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life // Ibid. 2006. V. 141. P. 312–322.
- Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142. P. 231–255.
- He J.M., Liu Z.-H., Xu H. et al. The involvement of hydrogen peroxide in UV-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paeonia suffruticosa* and *Paulownia tomentosa* *in vitro* // Plant Growth. Regul. 2006. V. 49. P. 199–208.
- He J.M., Bai X.-L., Wang R.-B. et al. The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paulownia tomentosa* *in vitro* // Physiol. Plant. 2007. V. 131. P. 273–282.
- Hegde R.R. Differential distribution of ascorbic acid and RNA in the developing anthers of *Datura stramonium* L. // Bot. Mag. Tokyo. 1985. V. 98. P. 219–223.
- Heslop-Harrison J. Pollen germination and pollen-tube growth // Int. Rev. Cytol. 1987. V. 107. P. 1–78.
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 263–267.
- Lindsay S.E., Fry S.C. Redox and wall-restructuring // The expanding cell: Plant cell monographs. V. 6. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 159–190.
- Liszskay A., van der Zalm E., Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and *OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 3114–3123.
- Macpherson N., Takeda S., Shang Z. et al. NADPH oxidase involvement in cellular integrity // Planta. 2008. V. 227. P. 1415–1418.
- McInnis S.M., Desikan R., Hancock J.T. et al. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? // New Phytol. 2006. V. 172. P. 221–228.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. et al. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. 2004. V. 10. P. 490–498.
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Messerli M.A. et al. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs // PNAS USA. 2007. V. 104. P. 20996–21001.
- Nitsch J.P. Deux especes photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. // Bull. Soc. Bot. Fr. 1965. V. 9. P. 517–522.
- Olmsted J., Kearns D.R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3647–3654.
- 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. V. 220. P. 582–592.
- Pedreira J., Sanz N., Pena M.J. et al. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 530–534.
- Potocky M., Jones M.A., Bezdova R. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth // New Phytol. 2007. V. 174. P. 742–751.

Robinson K.M., Janes M.S., Pehar M. et al. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes // PNAS USA. 2006. V. 103. P. 15038–15043.

Rodriguez A.A., Grunberg K.A., Taleisnik E.L. Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1627–1632.

Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Ibid. 2006. V. 141. P. 336–340.

Sanchez-Fernandez R., Fricker M., Corbern L.B. et al. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control // PNAS USA. 1997. V. 94. P. 2745–2750.

Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule // Curr. Opin. Plant Biol. 2000. V. 3. P. 229–235.

Formation of Reactive Oxygen Species during Pollen Grain Germination

A. V. Smirnova, N. P. Matveyeva, O. G. Polesskaya, and I. P. Yermakov

Moscow State University, Moscow, 119992 Russia;

e-mail: smirnova-msu@yandex.ru

Received November 27, 2008; in final form June 01, 2009

Abstract—The formation of reactive oxygen species in pollen at the early germination stage, which precedes the formation of the pollen tube, was studied. During this period, pollen grain is being hydrated, abruptly increasing its volume, and it passes from the resting state to active metabolism. Fluorescent methods have made it possible to reveal reactive oxygen species in the cytoplasm and inner layer of the pollen wall, intine. The cytoplasmic reactive oxygen species were mostly found in mitochondria, while extracellular ones were localized in aperture zones of intine, as well as in the solution surrounding pollen grains *in vitro*. The content of extracellular reactive oxygen species decreased after superoxide dismutase (100 units per ml) and diphenylene iodonium (100 μ M), which indicates NADPH oxidase as one of possible producer of them. In conditions of suppression of extracellular reactive oxygen species production (100 μ M diphenylene iodonium) or their promoted removal (after addition of 10 to 100 μ M ascorbic acid), the number of germinating pollen grains increased. This effect disappeared after further increase in the concentration of the listed reagents. The result is evidence of the significance of processes of generation/removal of extracellular reactive oxygen species for pollen germination.

Key words: pollen grain, germination, reactive oxygen species, DCFH-DA and MitoSOX staining agents.