

УДК 581.14

## ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС $K^+$ И $Cl^-$ В ПРОЦЕССЕ АКТИВАЦИИ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА *in vivo* И *in vitro*

© 2012 г. М. А. Брейгина, Н. П. Матвеева, Д. С. Андреюк, И. П. Ермаков

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,  
119899 Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

E-mail: Pollen-ions@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.04.11 г.

Окончательный вариант получен 05.06.11 г.

Изучали возможность выхода  $K^+$  и  $Cl^-$  из пыльцевых зерен табака в процессе их активации в условиях *in vitro* и на рыльце пестика. С этой целью использовали рентгеноспектральный микроанализ, пламенную фотометрию и спектрофлуориметрию. Установлено, что относительное содержание калия и хлора в микрообъеме пыльцевого зерна снижается в процессе его гидратации и активации на рыльце пестика. Выход этих ионов из пыльцевых зерен обнаружен как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. В модельных экспериментах *in vitro* ингибитор анионных каналов NPPB (5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота) в концентрации, блокирующей прорастание пыльцы, подавлял выход  $Cl^-$ , а ингибитор калиевых каналов ТЕА (хлорид тетраэтиламмония) частично подавлял выход  $K^+$  и снижал процент активированных клеток. Другой ингибитор калиевых каналов  $Ba^{2+}$  вызывал резкое уменьшение объема клеток и блокировал процесс активации. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что инициация прорастания пыльцевого зерна *in vivo*, как и *in vitro*, сопряжена с активацией выходных потоков  $K^+$  и  $Cl^-$ . Важную роль в этих процессах играют ионные каналы плазмалеммы, чувствительные к NPPB, ТЕА или  $Ba^{2+}$ .

**Ключевые слова:** мужской гаметофит, пыльцевое зерно, прорастание пыльцы на рыльце, хлор, калий, РМА.

Одной из главных задач современной физиологии мужского гаметофита становится соотношение закономерностей, установленных *in vitro*, с особенностями развития и прорастания пыльцы *in vivo* (Cheung et al., 2010; Iwano et al., 2009). Прорастание пыльцы в растворе и на рыльце пестика — два достаточно различных процесса, поскольку *in vitro*, во-первых, исключены межклеточные взаимодействия между мужским гаметофитом и тканями спорофита, а во-вторых, резко ускорен процесс гидратации пыльцы. В исследованиях прорастания пыльцы *in vitro* оптическими и электрофизиологическими методами было показано, что неорганические ионы играют центральную роль в регуляции этого процесса (Hepler et al., 2006). Наиболее изучены в этом отношении  $Ca^{2+}$  и  $H^+$ , гораздо меньше —  $K^+$ , и почти не изучен  $Cl^-$  (Hepler et al., 2006; Hepler, Winship, 2010). Вместе с тем, ингибиторный анализ показал, что активация калиевых и хлоридных каналов плазмалеммы является необходимым условием прорастания пыльцы *in vitro* (Матвеева и др., 2003; Sze et al., 2006; Брейгина и др., 2009а; 2010; Fan et al., 2001, Griessner, Obermeyer, 2003).

В последние годы ионную регуляцию роста пыльцевых трубок *in vivo* изучали с использовани-

ем мутантных и трансгенных растений. Рост пыльцевых трубок или их ориентация в тканях пестика были нарушены у мутантов арабидопсиса по генам катионных каналов или калиевых транспортеров (Frietsch et al., 2007; Lu et al., 2011). С помощью трансгенных растений, экспрессирующих флуоресцирующий белок, было показано, что в кончике пыльцевой трубки, растущей как *in vitro*, так и *in vivo*, формируется крутой градиент цитозольной концентрации кальция (Iwano et al., 2009). Однако аналогичные подходы малоприменимы для изучения процессов гидратации и активации пыльцы, предшествующих прорастанию, ввиду редкого выявления соответствующих мутантов (Bock et al., 2006) и методических ограничений, связанных с наличием у пыльцевого зерна массивной оболочки. Поэтому одним из важнейших методов в исследованиях ионной регуляции прорастания пыльцы *in vivo* остается РМА (рентгено-спектральный микроанализ), который сочетает в себе разрешающую способность электронного микроскопа с возможностью анализа распределения элементов в органах и тканях (Hodson, 1995). С помощью РМА было обнаружено высокое содержание кальция в оболочке пыльцевого зерна (Stanley, 1971). Калий был выявлен в оболочке и в цитоплазме, где, по не-

которым данным, он был распределен равномерно, а по другим — локализован преимущественно в области апертур (Yamada 1973; Rehman et al., 2004). В пыльце *Brassica* через 3 часа после совместимого опыления внутриклеточная концентрация К, а также Cl, и S возрастала, в то время как при несовместимом опылении этот эффект отсутствовал (Iwano et al., 1999).

Вопрос о роли К<sup>+</sup> в прорастании пыльцы обсуждался в работах последних лет, главным образом, в связи с функционированием калиевых каналов при прорастании пыльцы *in vitro* (Fan et al., 2001; Sze et al., 2006; Griessner, Obermeyer, 2003). Однако по-прежнему сохраняют актуальность данные ранней работы Баше и Маскаренхаса (Bashe, Mascarenhas, 1984), которые при изучении гидратации пыльцы на рыльце доказали, что без снижения внутриклеточной концентрации калия невозможна инициация белкового синтеза. Вопрос о том, обусловлены ли изменения концентрации К<sup>+</sup> в цитозоле только увеличением объема пыльцевого зерна или необходим выход этого катиона через плазматическую мембрану, остался открытым.

При исследовании протопластов, выделенных из пыльцевых зерен *Brassica chinensis*, *Lilium longiflorum* или *Arabidopsis thaliana* был обнаружен трансмембранный перенос К<sup>+</sup> как через входные, так и через выходных каналы (Fan et al., 2001; 2003; Griessner, Obermeyer, 2003; Obermeyer, Blatt, 1995). Следует, однако, учитывать, что направление калиевых потоков зависит от потенциала на плазмалемме. Мембранный потенциал пыльцевых зерен существенно ниже по абсолютному значению, чем потенциал выделенных из них протопластов (Брейгина и др., 2009б). Поэтому можно предположить, что в период гидратации пыльцевого зерна преобладают процессы выхода К<sup>+</sup> из клеток. Это предположение подтверждают данные Хёкстра с соавторами (Hoekstra et al., 1999). Эти авторы изучали изменение проницаемости мембран в зависимости от условий гидратации пыльцы *in vitro*. Они обнаружили, что в неблагоприятных условиях потери К<sup>+</sup> составляют до 90% от общего содержания К<sup>+</sup> в клетках. Однако и в оптимальных условиях, по данным этих авторов, гидратация сопровождается выходом К<sup>+</sup> (~35%). Это явление осталось неизученным.

В настоящей работе изучали возможность выхода К<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> из пыльцевых зерен табака в процессе их гидратации как в условиях *in vitro*, так и на рыльце пестика. С этой целью использовали комплекс методов: РМА, плазменную фотометрию и спектрофлуориметрию.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### *Растительный материал и подготовка проб*

Растения табака *Nicotiana tabacum* L., сорт Petit Havana SR1, выращивали из семян в климатической камере (25°C, 16 ч световой день).

В экспериментах по изучению выхода ионов из пыльцевых зерен *in vitro* использовали сухую пыльцу, хранившуюся при -20°C. Ее размораживали, промывали гексаном для удаления липофильных покровных материалов и высушивали на воздухе. Стандартные навески пыльцы инкубировали во влажной камере (2 ч, 25°C), а затем суспендировали в жидкой питательной среде. Среда содержала 0.3 М сахарозу, 1.6 мМ Н<sub>3</sub>В<sub>3</sub>О<sub>3</sub>, 3 мМ Са(НО<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.8 мМ МgSO<sub>4</sub> и 1 мМ КНО<sub>3</sub>, добавленные в 25 мМ MES-Tris буфер, рН 5.9. В некоторых опытах в среде присутствовали ингибиторы хлоридных или калиевых каналов (см. ниже). Для выявления выхода Cl<sup>-</sup> из пыльцевых зерен в среду добавляли флуоресцентный индикатор MEQ (6-methoxy-N-ethylquinolinium chloride) (Molecular Probes, Нидерланды) до конечной концентрации 5 мкМ. Время инкубации пыльцы *in vitro* составляло 2 или 10 мин. По окончании инкубации пыльцу осаждали центрифугированием (30 сек, 3000 г). Надосадочную жидкость использовали для анализа.

В качестве ингибиторов калиевых каналов использовали ТЕА-Cl (tetraethylammonium chloride, 10 и 20 мМ) и Ва(НО<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 мМ), активность анионных каналов блокировали с помощью NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid), концентрация которого составляла 40 мкМ, что достаточно для полного подавления прорастания пыльцы табака (Матвеева и др., 2003).

Аналогичным образом инкубировали и осаждали клетки, которые окрашивали рН-зависимым красителем флуоресцеиндиацетатом (ФДА), флуоресценция которого возрастает с увеличением внутриклеточного рН по мере активации пыльцевых зерен (Матвеева и др., 2002). Концентрация красителя составляла 10 мкМ, время окрашивания 2 мин. Окрашенные клетки незамедлительно фотографировали (см. ниже).

Подготовка проб для РМА включала опыты с гидратацией свежесобранной пыльцы на рыльце пестика и опыты с быстрым отмыванием пыльцы от стеночных ионов.

Тычинки из цветков удаляли накануне их раскрытия. Пыльцу на рыльце раскрывшегося цветка наносили кисточкой. По истечении заданного времени (1, 20 или 40 мин) опыленные рыльца срезали и фиксировали в жидком изобутане ( $t_{пл} = -159.6^\circ\text{C}$ ), охлаждаемом жидким азотом, высушивали при -60°C и давлении  $1.33 \times 10^{-4}$  Па

(установка Polaron Freeze Drier E5300, Великобритания).

Для получения проб пыльцы, отмытой от подвижных ионов, локализованных в оболочке, сухую пыльцу дважды промывали в бидистиллированной воде с 10% сахарозой. Каплю густой суспензии объемом 1 мкл распределяли по листочку медной фольги  $1 \times 3$  мм, быстро фиксировали в жидком изобутане и высушивали из замороженного состояния, как описано выше.

Высушенную пыльцу наклеивали углеродным клеем AMRAY (Великобритания) на углеродный столик и напыляли углеродом. Для сравнения брали также свежесобранную дегидратированную пыльцу. Для анализа брали отдельно лежащие пыльцевые зерна.

#### Методы анализа проб

Препараты пыльцевых зерен, окрашенных ФДА, анализировали и фотографировали с помощью исследовательского микроскопа AxioPlan 2 imaging MOT, оснащенного цифровой камерой AxioCam HRC (Zeiss, Германия). Флуоресценцию возбуждали в диапазоне длин волн 475–495 нм и регистрировали при 515–565 нм. Препараты фотографировали при одинаковой выдержке с помощью скоростной автоматической заслонки. Каждое поле зрения снимали в свете флуоресценции и в светлом поле. Анализ изображений, включая измерение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных ФДА, и определение размеров пыльцевых зерен в светлополюсных препаратах, проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.7. Пороговая интенсивность флуоресценции, отделяющая клетки, не приступившие к активации, была выбрана на уровне медианы выборки пыльцевых зерен в контрольных пробах, инкубированных в течение 10 мин. Долю физиологически активных клеток определяли по отношению числа клеток с флуоресценцией выше пороговой к общему числу клеток. Для каждого варианта просчитывали по 500 клеток в трех отдельно взятых пробах.

Интенсивность флуоресценции MEQ в средах, кондиционированных пыльцевыми зернами в процессе их гидратации *in vitro*, регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония). Флуоресценцию возбуждали при 344 нм, регистрировали при 445 нм. Аутофлуоресценция среды, в которой инкубировали пыльцевые зерна, была пренебрежимо мала.

Выход калия из пыльцевых зерен в раствор выявляли методом пламенной фотометрии на приборе FP 640 (LEKI, Финляндия). Калибровочные растворы готовили, добавляя в среду инкубации KCl, конечная концентрация  $K^+$  в них составляла от 1.5 до 6 мМ.

При проведении РМА использовали сканирующий электронный микроскоп CamScan-S2 (Obducat CamScan Ltd., Великобритания), снабженный анализатором рентгеновского излучения с дисперсией по энергии LINK AN10/55 (Oxford Instruments, Великобритания). Анализ проводили при закрытом Ве окне детектора. Спектры получали при ускоряющем напряжении 20 кВ и продолжительности счета 100 с, микрорастр размером  $8 \times 10$  мкм располагали в центре пыльцевого зерна.

В предварительных опытах было проведено сканирование точечным лучом пыльцевых зерен, гидратированных *in vitro* и лежащих на медной подложке (данные не приводятся). Характеристический пик меди отчетливо выявлялся на расстоянии 0.5 мкм от края пыльцевого зерна. По мере движения к центру пылинки пик меди уменьшался и полностью исчезал на расстоянии 4 мкм от края. Этот пик отсутствовал и при использовании микрорастра. Это означает, что электронный луч тормозился преимущественно во внутриклеточном пространстве, и полученные при этом спектры рентгеновского излучения характеризуют его элементный состав.

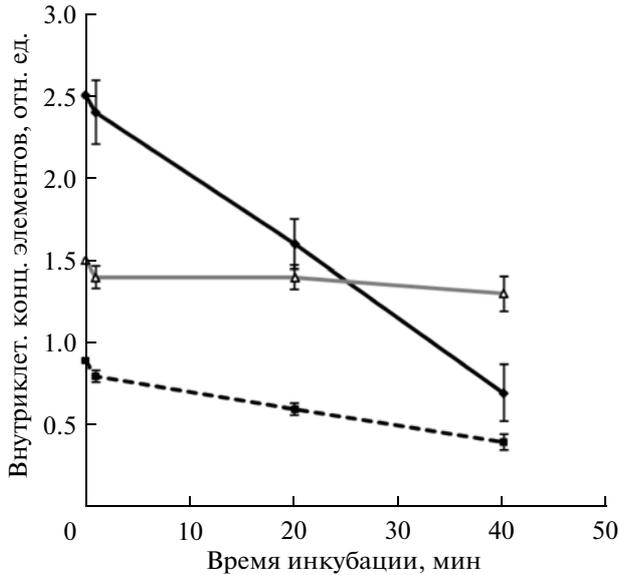
В спектрах определяли высоту пика характеристического излучения для серы ( $K\alpha$ , 2.307 кэВ), хлора ( $K\alpha$ , 2.621 кэВ) и калия ( $K\alpha$ , 3.312 кэВ). В качестве фона для пика калия использовали среднюю величину сигнала в области 2.8–3.1 кэВ. Фоном для пиков серы и хлора считали прямую линию, соединяющую усредненные значения фона в областях 1.8 и 2.8 кэВ. Анализируя спектры, согласно общепринятым методам (Hodson, 1995), рассчитывали для каждого изучаемого элемента отношение пик/фон. Этот показатель отражает относительное содержание данного элемента в образце, т.е. долю атомов данного элемента среди всех атомов в исследуемом микрообъеме образца. Средние значения рассчитывали по данным от 13 до 24 (в зависимости от варибельности выборки) спектров, полученных не менее чем с трех отдельных препаратов.

#### Статистическая обработка

Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 или 0.01. На рисунках приведены средние значения и их стандартная ошибка.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

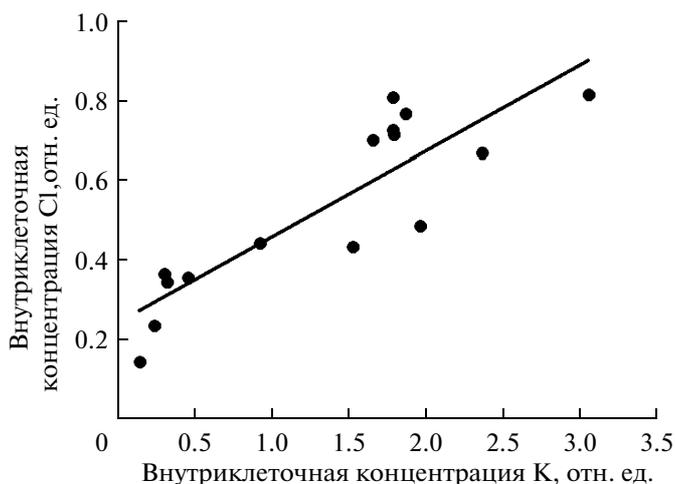
Гидратация пыльцевых зерен на рыльце сопровождалась снижением относительного содержания в микрообъеме пыльцевого зерна элементов, представленных подвижными ионами, — калия и хлора (рис. 1). Для сравнения приведены значения



**Рис. 1.** Изменение относительного содержания элементов в микрообъеме пыльцевого зерна (черная линия – K, пунктир – Cl, серая – S) в процессе гидратации пыльцевых зерен на рыльце пестика. Последняя точка (40 мин) соответствует стадии полностью гидратированной пыльцы.

для органогенного элемента – серы, которые остаются неизменными.

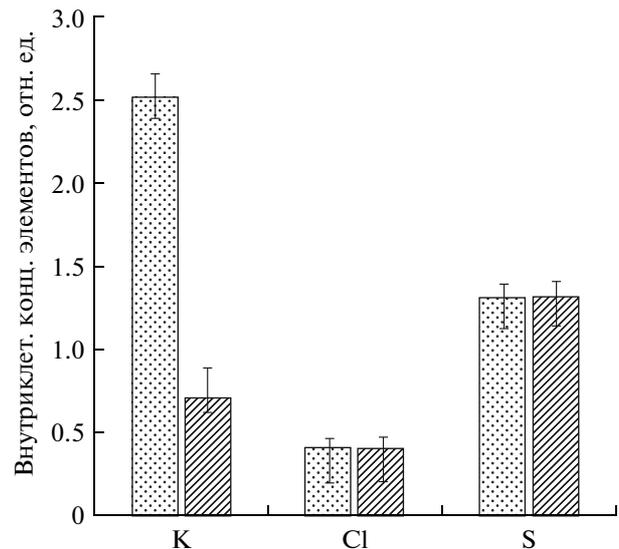
Сопоставление относительных высот пиков K и Cl в отдельно взятых клетках выявило высокую корреляцию между этими величинами в гидратированных (сфероидальных) пыльцевых зернах, ко-



**Рис. 2.** Корреляция между относительным содержанием K и Cl в микрообъеме гидратированного пыльцевого зерна после 20 минут инкубации на рыльце. Коэффициент корреляции  $r = 0.87$ .

торые инкубировали на рыльце в течение 20 мин ( $r = 0.87$ , рис. 2). При увеличении времени инкубации пыльцы на рыльце до 40 мин корреляция была менее выраженной ( $r = 0.56$ ), хотя и достоверной ( $p < 0.05$ ). В негидратированной пыльце (1 мин инкубации на рыльце), которая имела эллипсоидную форму, указанные величины не коррелировали ( $r = -0.1$ ). Таким образом, на определенном этапе гидратации пыльцевого зерна *in vivo* происходят согласованные изменения внутриклеточных концентраций подвижных ионов –  $K^+$  и  $Cl^-$ .

Эти изменения могли быть обусловлены изменением объема цитоплазмы в процессе гидратации или выходом из нее ионов в окружающую среду. Нельзя было также исключить, что определенный вклад в обнаруженный эффект вносит вымывание  $K^+$  из оболочки пыльцевого зерна. Для того чтобы оценить эту возможность, провели анализ пыльцевых зерен, быстро гидратированных в изотоничной жидкой среде (~1 мин). Тем самым, были созданы условия, облегчающие вымывание ионов из оболочки по сравнению с гидратацией пыльцы *in vivo* в окружении липофильного экссудата рыльца. При этом объем и форма пыльцевых зерен, гидратированных *in vivo* и *in vitro*, были примерно одинаковы. Сопоставление спектров, полученных для этих образцов, выявило их существенное различие по величине пика калия, в то время как пики хлора и серы были одинаковыми (рис. 3). Это означает, что выход калия из оболочки был пренебрежимо мал, и снижение пика калия в процессе постепенной гидратации пыльцевого зерна на рыльце обусловлено выходом цитоплазматиче-



**Рис. 3.** Внутриклеточные концентрации K, Cl и S в пыльцевых зернах, быстро отмытых от стеночных ионов *in vitro* (1 минута, столбики в точку) и гидратированных *in vivo* (40 минут, заштрихованные столбики).

ского калия. Отсутствие различий по хлору на рисунке 3 можно объяснить быстрым выходом  $Cl^-$  из клеток в условиях *in vitro*.

Наиболее вероятным представлялось, что выход  $K^+$  и  $Cl^-$  из пыльцевых зерен происходит через ионные каналы плазмалеммы. Для проверки этого предположения изучали действие специфических ингибиторов калиевых и анионных каналов на выход соответствующих ионов из пыльцевых зерен *in vitro*.

Для обнаружения выхода  $Cl^-$  из пыльцевых зерен использовали флуоресцентный индикатор MEQ, который реагирует на увеличение концентрации  $Cl^-$  в растворе тушением флуоресценции. В контрольных препаратах после первых 2 мин инкубации пыльцы в присутствии красителя наблюдали существенное снижение интенсивности его флуоресценции (рис. 4а). В последующие 8 минут интенсивность флуоресценции раствора MEQ не изменялась, т.е. процесс выхода  $Cl^-$  был уже завершен. В присутствии блокатора анионных каналов NPPB тушения флуоресценции не происходило (рис. 4а), что свидетельствует о полном подавлении выхода  $Cl^-$  из клеток. Эти данные позволяют сделать вывод об участии NPPB-чувствительных анионных каналов в трансмембранном переносе  $Cl^-$  в процессе гидратации пыльцевых зерен.

Выход  $K^+$  из пыльцевых зерен при их гидратации *in vitro* иллюстрирует рисунок 4б. Концентрация  $K^+$  во внеклеточной среде, по данным пламенной фотометрии (рис. 4б, кривая 1), возрастала в течение первых 2 мин инкубации и в дальнейшем не изменялась, т.е. динамика выхода  $K^+$  и  $Cl^-$  из пыльцевых зерен в целом совпадала. Ингибирование анионных каналов с помощью NPPB не влияло на выход  $K^+$  (рис. 4б, кривая 2), а ингибитор калиевых каналов  $Ba^{2+}$  вызывал не снижение, а, напротив, увеличение концентрации  $K^+$  в среде (рис. 4б, кривая 3). Это могло быть обусловлено утечкой  $K^+$  из пыльцевых зерен в результате нарушения осмотического баланса. Другой широко используемый ингибитор калиевых каналов TEA частично (примерно на 30%) блокировал выход  $K^+$  из пыльцевых зерен при двухминутной инкубации, при этом эффекты 10 мМ и 20 мМ TEA практически не различались (рис. 4б, кривые 4 и 5). Однако с увеличением времени инкубации до 10 мин концентрация  $K^+$  в среде в контрольных и обработанных TEA культурах достигала примерно одинаковых величин, возможно, вследствие увеличения выхода этого иона из клеток под действием TEA. Как и в случае с  $Ba^{2+}$ , это могло быть связано с нарушением осмотического баланса.

Наблюдения за отдельными клетками подтвердили предположение о том, что  $Ba^{2+}$  нарушает

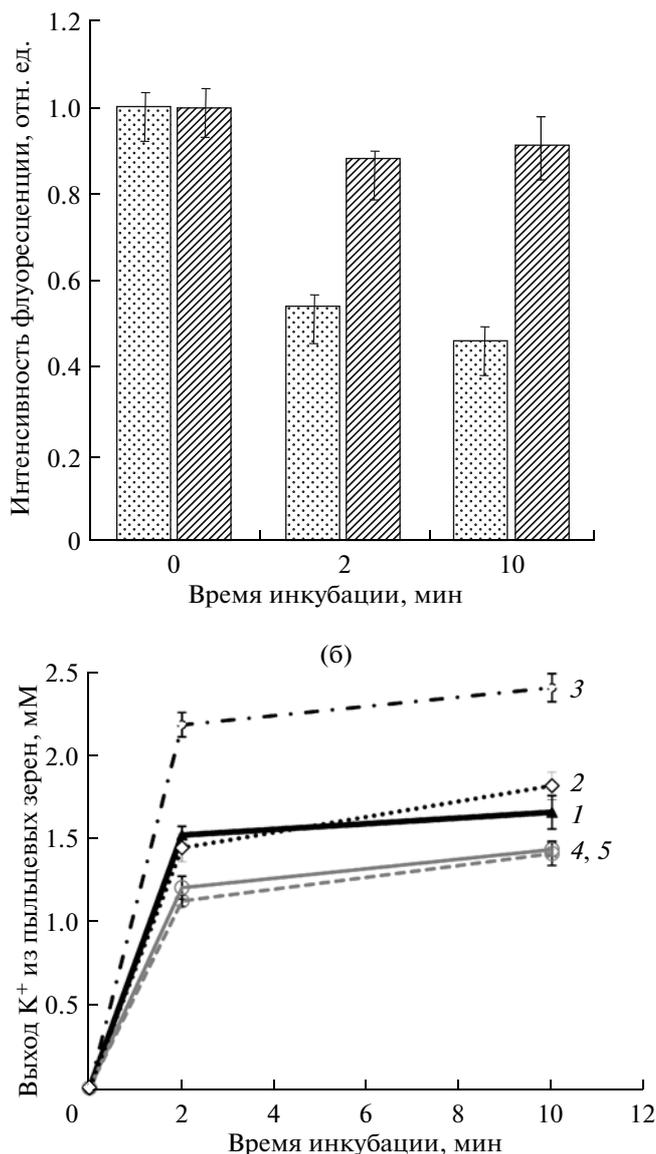
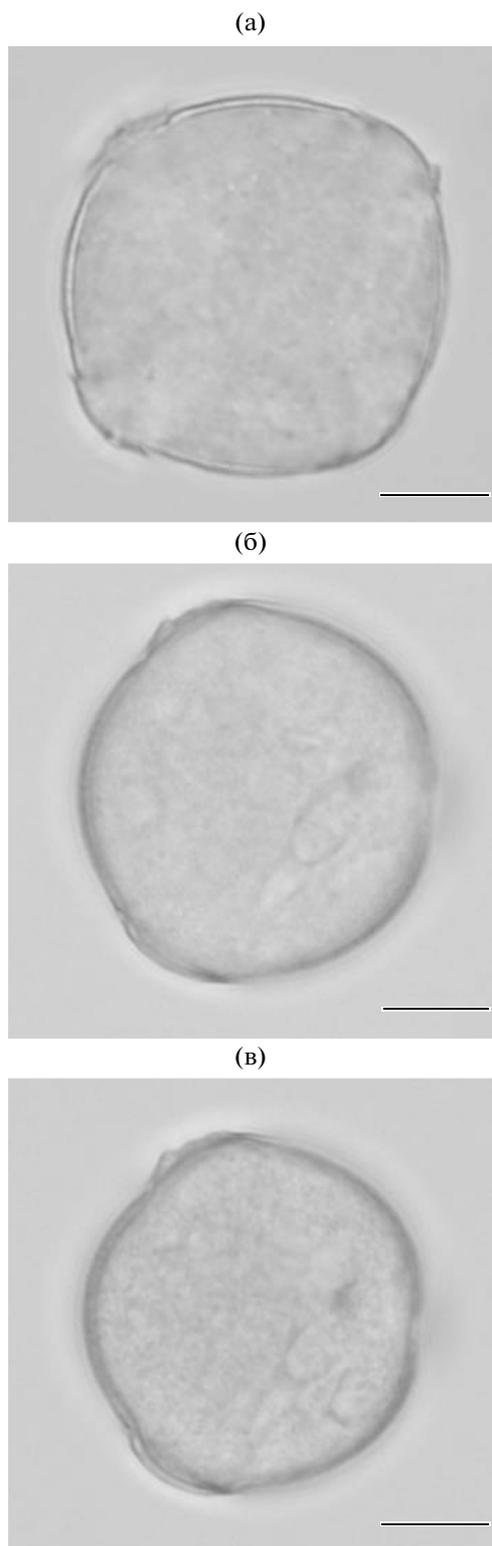


Рис. 4. Выход  $Cl^-$  (а) и  $K^+$  (б) в среду инкубации из пыльцевых зерен *in vitro* (точка 2 мин соответствует стадии полностью гидратированной пыльцы):

(а) тушение флуоресценции MEQ, отражающее выход  $Cl^-$ : столбики в точку – контроль, штриховка – в среду добавлен ингибитор анионных каналов NPPB, 40 мкМ; (б) выход  $K^+$ : контроль – сплошная черная линия (1); ингибитор хлоридных каналов NPPB (40 мкМ) – точечная черная линия (2), ингибитор калиевых каналов  $Ba^{2+}$  – пунктирная черная линия (3), ингибитор калиевых каналов TEA: 10 мМ – сплошная серая линия (4), 20 мМ – пунктирная серая линия (5).

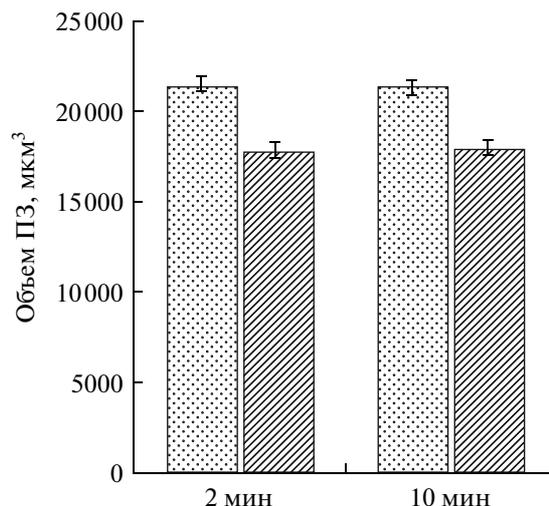
осморегуляцию в пыльцевых зернах. Пыльцевые зерна в присутствии  $Ba^{2+}$  гидратировались, достигая такого же объема, как и пыльца в контроле (рис. 5а), но уже через 1 мин начинали сжиматься (рис. 5б). С увеличением времени инкубации этот эффект становился еще более выраженным (рис. 5в). Анализ показал, что сжатие пыльцевых зерен, по-видимому, обусловленное выходом



**Рис. 5.** Уменьшение объема пыльцевого зерна под действием  $Ba^{2+}$ :

(а) пыльцевое зерно, гидратированное в среде без  $Ba^{2+}$  (1 мин),

(б, в) изменение объема пыльцевого зерна при его гидратации в присутствии 5 мМ  $Ba^{2+}$  в течение 1.5 мин (б) и 4 мин (в). Масштабная линейка – 10 мкм.

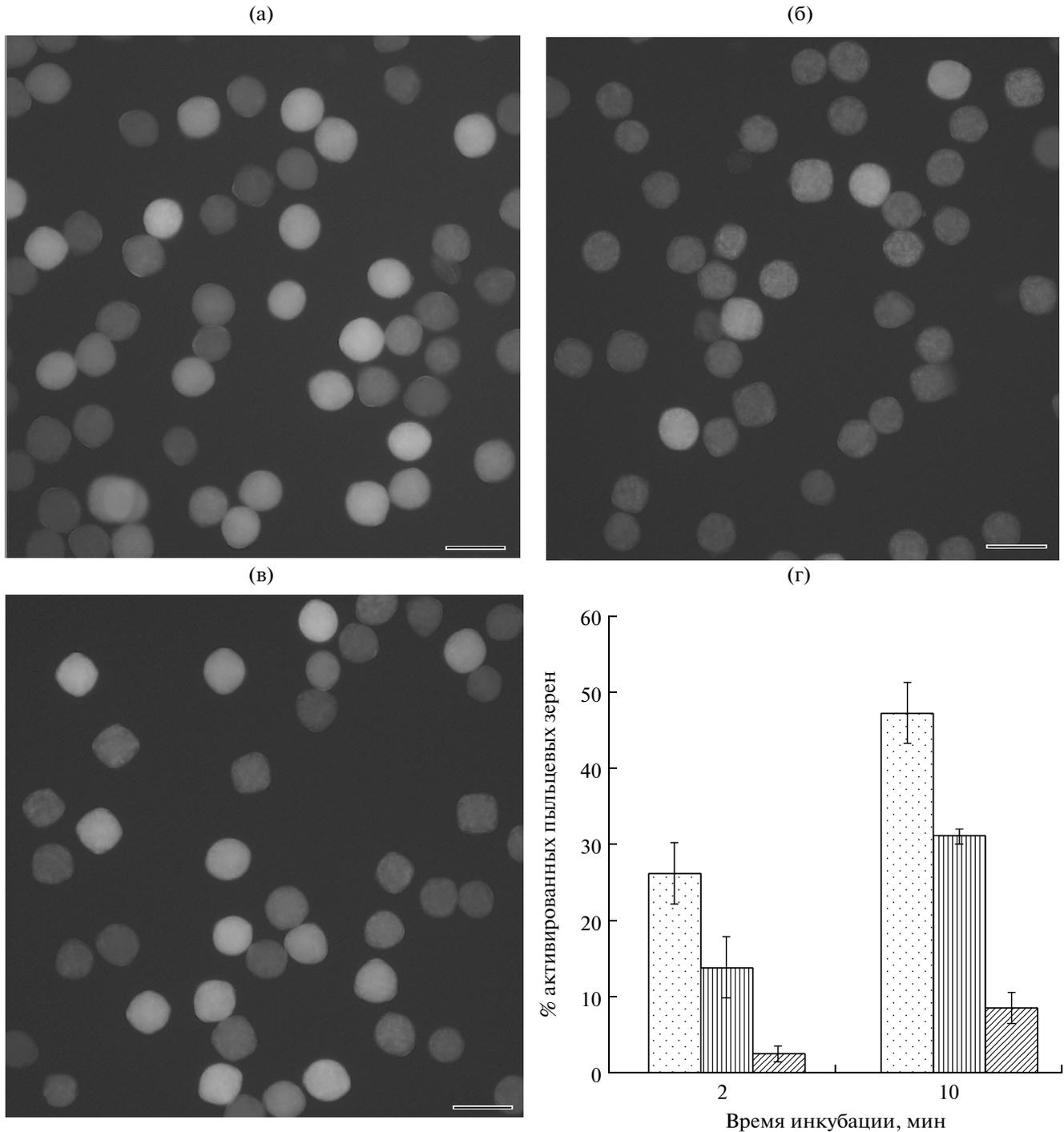


**Рис. 6.** Действие  $Ba^{2+}$  на объем пыльцевых зерен в культуре *in vitro*. Столбики в точку – контроль, заштрихованные столбики – 5 мМ  $Ba^{2+}$ .

из них осмотически активных веществ, прежде всего  $K^+$ , завершается в среднем за 2 мин (рис. 6).

Представлялось маловероятным, что пыльца, претерпевшая такие изменения, может приступить к активации метаболизма. Действительно, на препаратах, обработанных  $Ba^{2+}$  и окрашенных флуоресцентным рН-чувствительным красителем ФДА, мы видим, что подавляющее большинство составляют слабо флуоресцирующие пыльцевые зерна (рис. 7б). Для сравнения представлен снимок контрольной суспензии, где после 2 минут инкубации достаточно много ярко флуоресцирующих клеток (рис. 7а). ТЕА не вызывал быстрого сжимания клеток, однако после 2 мин инкубации доля интенсивно флуоресцирующих клеток была ниже, чем в контроле (рис. 7в, 7г). Этот эффект сохранялся и после 10 мин инкубации.  $Ba^{2+}$  к этому времени почти полностью блокировал активацию.

Таким образом, рассмотренные результаты в совокупности свидетельствуют о том, что гидратация пыльцевого зерна как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* сопровождается выходом из него подвижных ионов  $K^+$  и  $Cl^-$ . Важную роль в этих процессах играют анионные каналы, чувствительные к NPPВ, и калиевые каналы, чувствительные к ТЕА. Установлено также, что активность калиевых каналов необходима для эффективной осморегуляции и перехода пыльцевых зерен из состояния покоя к активному метаболизму. Вопрос о том, контролируют ли  $Ba^{2+}$ -чувствительные каналы вход и (или) выход  $K^+$ , нуждается в дальнейшем исследовании.



**Рис. 7.** Действие ингибиторов калиевых каналов  $Ba^{2+}$  и ТЕА на флуоресценцию пыльцевых зерен, окрашенных ФДА, которая отражает их функциональное состояние:

(а) контрольная суспензия без ингибиторов, (б) 5 мМ  $Ba^{2+}$ , (в) 10 мМ ТЕА; масштабная линейка – 50 мкм.

(г) процентное содержание в суспензии пыльцевых зерен, приступивших к активации: столбики в точку – контроль, вертикальная штриховка – 10 мМ ТЕА, косая штриховка – 5 мМ  $Ba^{2+}$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа спектров РМА выявили постепенное и согласованное снижение концентрации  $K^+$  и  $Cl^-$  в пыльцевых зернах в процессе их активации на рыльце пестика (рис. 1, 2). Тем самым

было получено экспериментальное подтверждение расчетных данных Баше и Маскаренхаса (1984) о более чем 2-кратном снижении концентрации цитозольного  $K^+$  в ходе этого процесса. В течение первых 20 мин инкубации пыльцы на

рыльце изменяется форма пыльцевого зерна – с эллипсоидной на сфероидальную – и увеличивается его объем, что отчасти могло бы объяснить уменьшение концентрации внутриклеточных ионов (рис. 1). Однако в течение последующих 20 мин снижение концентрации указанных ионов продолжается примерно с той же интенсивностью. В этом случае остается предполагать выход ионов из цитоплазмы и/или клеточной стенки. Вместе с тем, отсутствие изменений в содержании серы (рис. 1), свидетельствует в пользу предположения о том, что и в первые 20 минут выход  $K^+$  и  $Cl^-$  из клеток, а не изменение объема, вносит основной вклад в снижение внутриклеточной концентрации  $K^+$ .

Сопоставление спектров РМА пыльцы, гидратированной *in vivo* (40 мин) и быстро отмытой от стеночных ионов *in vitro* (1 мин), показало, что после отмывания пыльцы пик  $K^+$  остался много выше, чем при гидратации в условиях *in vivo* (рис. 3). Это означает, что пыльца в процессе гидратации на рыльце пестика теряет преимущественно цитоплазматические ионы. Отчасти это может происходить в результате неспецифической утечки ионов через липидный матрикс мембран в условиях фазового перехода. Однако при медленной гидратации *in vivo* вклад этого процесса должен быть меньше, чем *in vitro* (Hoekstra et al., 1999). Отметим также, что и в экспериментах *in vitro* эти процессы становятся значимыми лишь при достаточно низких температурах (Hoekstra et al., 1999).

Наиболее вероятным представлялся выход ионов через каналы. По данным геномного и молекулярного анализа транспортных белков, в плазмалемме пыльцевых зерен присутствуют как калиевые, так и хлоридные каналы (Bock et al., 2006; Sze et al., 2006). Ранее было показано, что блокаторы тех и других каналов нарушают прорастание пыльцы *in vitro*. Ингибирование анионных каналов с помощью NPPB или DIDS полностью подавляло прорастание пыльцы табака (Матвеева и др., 2003). NPPB нарушал также процесс гиперполяризации плазмалеммы вегетативной клетки, характерный для начального этапа активации пыльцевого зерна (Брейгина и др., 2009а). Блокатор калиевых каналов  $Ba^{2+}$  снижал эффективность прорастания пыльцы арабидопсиса и скорость роста пыльцевых трубок (Fan et al., 2001). В протопластах, выделенных из пыльцы лилии и арабидопсиса, ингибирование калиевых каналов  $Ba^{2+}$  или ТЕА, в зависимости от условий, вызывало подавление входных или выходных потоков  $K^+$  (Griessner, Obermeyer, 2003; Fan et al., 2001).

Для обнаружения  $Cl^-$  в среде, кондиционированной пыльцевыми зернами в процессе их гидратации, в настоящей работе использовали флуорес-

центный индикатор MEQ, который широко применяется в исследованиях клеток животных. Результаты этих экспериментов (рис. 4а) хорошо согласуются с данными, полученными ранее с помощью ионоселективных электродов (Матвеева и др., 2003). Таким образом, двумя независимыми методами установлен факт выхода  $Cl^-$  из пыльцевых зерен через NPPB-чувствительные анионные каналы плазмалеммы.

Выход  $K^+$  из пыльцевых зерен в процессе их гидратации *in vitro* в настоящей работе был выявлен посредством пламенной фотометрии (рис. 4б). Процесс выхода  $K^+$ , как и  $Cl^-$  (рис. 4), завершился в течение первых 2 мин инкубации пыльцы в жидкой среде. В целом, наши данные о выходе  $K^+$  хорошо согласуются с недавними результатами определения величины мембранного потенциала в пыльцевых зернах (Брейгина и др., 2009), а также с более ранними работами, в которых также наблюдали выход  $K^+$ , но интерпретировали его как неконтролируемую утечку ионов (Hoekstra et al., 1999).

Широко используемый ингибитор калиевых каналов ТЕА заметно подавлял выход  $K^+$  из пыльцевых зерен после 2 минут инкубации (рис. 4б). При этом он снижал способность пыльцевых зерен к активации (рис. 7). Другой ингибитор калиевых каналов,  $Ba^{2+}$ , вызывал практически моментальное сжатие клеток (рис. 6) и блокировал активацию на 84% (рис. 7), одновременно с этим регистрировалось увеличение концентрации  $K^+$  в инкубационной среде (рис. 4б). Все это позволяет предполагать, что блокирование запуска прорастания под действием  $Ba^{2+}$  связано с нарушением осморегуляции. Таким образом, эксперименты с ингибиторами калиевых каналов показали, что активность ТЕА- и  $Ba^{2+}$ -чувствительных каналов необходима для запуска прорастания пыльцевого зерна. Выход  $K^+$  из пыльцы отчасти осуществляется через ТЕА-чувствительные каналы. Однако, поскольку этот ингибитор подавляет выход  $K^+$  не более чем на треть (рис. 4б), следует предполагать участие в трансмембранном переносе  $K^+$  других транспортных белков плазмалеммы.

В условиях *in vitro* блокирование хлоридных каналов не сказывалось на процессе выхода из клеток  $K^+$  (рис. 4б), однако *in vivo* внутриклеточные концентрации этих ионов изменялись согласованно (рис. 2). Эти различия можно объяснить разной скоростью процессов гидратации в жидкой среде и на рыльце пестика.

Значение  $K^+$  для прорастания пыльцы *in vitro* было показано достаточно давно (Weisenseel, Jaffe, 1976). Было высказано предположение о том, что входные калиевые потоки нужны для притока во-

ды в пыльцевое зерно при инициации прорастания (Obermeyer, Blatt, 1995). Позже было показано, что высокие ( $>1$  мМ) концентрации  $K^+$  в среде ингибируют прорастание пыльцы, хотя для роста пыльцевой трубки оптимальной является концентрация  $K^+$  равная 30 мМ (Fan et al., 2001). Исходя из этих данных, а также принимая во внимание высокую цитозольную концентрацию  $K^+$  в зрелом пыльцевом зерне (Bashe, Mascarenhas, 1984), Fan с сотрудниками (2001) предположили, что входные потоки  $K^+$  нужны для регуляции роста пыльцевой трубки, но они могли бы блокировать процесс активации пыльцевого зерна. В этой связи интересно отметить, что в условиях *in vivo* увеличение концентрации внутриклеточного  $K^+$  и  $Cl^-$  было обнаружено лишь через 3 ч после опыления (Iwano et al., 1999). Таким образом, полученные результаты, указывающие на выход указанных ионов из пыльцевых зерен на начальном этапе прорастания, хорошо согласуются с данными литературы.

В целом, рассмотренные данные свидетельствуют о том, что инициация прорастания пыльцевого зерна в условиях как *in vivo*, так и *in vitro* сопряжена с активацией выходных потоков  $K^+$  и  $Cl^-$ . Трансмембранный перенос этих ионов можно рассматривать как важную составляющую механизмов регуляции мембранного потенциала на плазмалемме вегетативной клетки, активации биосинтетических процессов в цитоплазме, а также осморегуляции.

Авторы выражают благодарность профессору Ю.В. Балнокину, А.Р. Генатулиной, Ю.В. Орловой, а также А.Г. Богданову.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00605-а) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” по направлению “Клеточные технологии” (Государственный контракт №П-403).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брейгина М.А., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Роль  $Cl^-$  в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки // Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 199–207.
- Брейгина М.А., Смирнова А.В., Матвеева Н.П. и др. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки // Цитология. 2009. Т. 51 С. 815–823.
- Брейгина М.А., Смирнова А.В., Масленников М.В. и др. Действие ингибиторов анионных каналов NPPВ и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака // Цитология. 2010. Т. 52. С. 334–341.
- Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Трансмембранный перенос  $Cl^-$  при прорастании пыльцевого зерна табака // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1550–1555.
- 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 // Онтогенез. 2002. Т. 33. С. 436–443.
- Bashe D., Mascarenhas J.P. Changes in potassium ion concentration during pollen dehydration and germination in relation to protein synthesis // Plant Science Let. 1984. V. 35. P. 55–60.
- Bock K.W., Honys D., Ward J.M. et al. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 1151–1168.
- Cheung A.Y., Boavida L.C., Aggarwa M. et al. The pollen tube journey in the pistil and imaging the *in vivo* process by two-photon microscopy // J. Exper. Bot. 2010. V. 61. P. 1907–1915.
- Fan L.M., Wang Y.F., Wang H. et al. *In vitro* Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 1603–1614.
- Fan L.M., Wang Y.F., Wu W.H. Outward  $K^+$  channels in Brassica chinensis pollen protoplasts are regulated by external and internal pH // Protoplasma. 2003. V. 220. P. 143–152.
- Frietsch S., Wang Y.-F., Sladek C. et al. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen // PNAS. 2007. V. 104 P. 14531–14536.
- Griessner M., Obermeyer G. Characterization of whole-cell  $K^+$  currents across the plasma membrane of pollen grain and tube protoplasts of *Lilium longiflorum* // J. Membrane Biol. 2003. V. 193. P. 99–108.
- Hepler P.K., Lovy-Wheeler A., McKenna S. et al. Ions and pollen tube growth // The pollen tube. Ed. Malho R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. P. 47–69.
- Hepler P.K., Winship L.J. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52 P. 147–160.
- Hodson M.J. Ion localization and X-ray microanalysis // Methods in plant cell biology, Part A / Eds. Galbraith D.W., Bohnert H.J., Bourque D.P. San-Diego etc.: Acad. Press. 1995. P. 21–32.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Van Aelst A.C. et al. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited // Plant, Cell and Environment. 1999. V. 22. P. 1121–1131.
- Iwano M., Wada M., Morita Y. et al. X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in Brassica using a variable-pressure scanning electron microscope // J. Electron Microscopy. 1999. V. 48 P. 909–917.
- Iwano M., Entani T., Shiba H. et al. Fine-tuning of the cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration is essential for pollen tube growth // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 1322–1334.
- Lu Y., Chanroj S., Zulkifli L. et al. Pollen tubes lacking a pair of  $K^+$  transporters fail to target ovules in Arabidopsis // The Plant Cell. 2011. V. 23. P. 81–93.
- 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.

- Rehman S., Rha E.S., Ashraf M., et al. Does barley (*Hordeum vulgare* L.) pollen swell in fractions of a second? // *Plant Science*. 2004. V. 167. P. 137–142.
- Stanley R.G. Pollen chemistry and tube growth // *Pollen: development and physiology*. Ed. Heslop-Harrison J. London: Butterworths, 1971. P. 131–156.
- 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.
- 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.
- Yamada Y. The distribution of ions in the pollen grain of *Lilium longiflorum* by scanning electron microscope with X-ray detector system // *J. Plant Research*. 1973. V. 86. P. 229–233.

## Transmembrane Transport of $K^+$ and $Cl^-$ during Pollen Grain Activation *in vivo* and *in vitro*

M. A. Breygina, N. P. Matveyeva, D. S. Andreyuk, and I. P. Yermakov

*Moscow State University, School of Biology, Plant Physiology Department*

*e-mail: Pollen-ions@rambler.ru*

**Abstract**—We studied the possibility of  $K^+$  and  $Cl^-$  efflux from tobacco pollen grains during their activation *in vitro* or on the stigma of a pistil. For this purpose the X-ray microanalysis and spectrofluorometry were applied. We found that the relative content of potassium and chlorine in the microvolume of pollen grain decreases during its hydration and activation on stigma. Efflux of these ions was found both *in vivo* and *in vitro*. In model *in vitro* experiments anion channel inhibitor NPPB ((5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) in the concentration that was blocking pollen germination, reduced  $Cl^-$  efflux; potassium channel inhibitor (tetraethylammonium chloride) partially reduced  $K^+$  efflux and lowered the percent of activated cells. Another blocker of potassium channels  $Ba^{2+}$  caused severe decrease in cell volume and blocked the activation. In general, the obtained data demonstrates that the initiation of pollen germination both *in vivo* and *in vitro* involves the activation of  $K^+$  and  $Cl^-$  release. An important role in these processes is played by NPPB-, TEA- and  $Ba^{2+}$ -sensitive plasmalemma ion channels.

**Keywords:** male gametophyte, pollen grain, pollen germination on stigma, chloride, potassium, X-ray microanalysis.