

УДК 581.1.581.14

ЭКЗОГЕННЫЕ ИУК И АБК СТИМУЛИРУЮТ ПРОРАСТАНИЕ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ, АКТИВИРУЯ Ca^{2+} -ЗАВИСИМЫЕ K^+ -КАНАЛЫ И МОДУЛИРУЯ АКТИВНОСТЬ H^+ -АТФАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ И АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

© 2016 г. Л. В. Ковалева, А. С. Воронков, Е. В. Захарова*, Ю. В. Минкина, Г. В. Тимофеева, И. М. Андреев

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
127276 Москва, Ботаническая ул., д. 35

* Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева
127550 Москва, Тимирязевская ул., д. 49

E-mail: kovaleva_l@mail.ru

Поступила в редакцию 13.08.2015 г.

Окончательный вариант получен 10.12.2015 г.

Молекулярные механизмы осморегуляции, которые поддерживают водный статус пыльцевых зерен (ПЗ) и позволяют пыльцевым трубкам (ПТ) регулировать концентрации осмолитов и водные потоки, пока не охарактеризованы. Получены данные о включении ИУК и АБК в осморегуляцию прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии. Установлено, что рост-стимулирующий эффект ИУК и АБК обусловлен их действием на внутриклеточный рН (pH_c), мембранный потенциал плазмалеммы (ПМ), активность H^+ -АТФазы ПМ и K^+ -каналов и организацию актинового цитоскелета (АЦ). Выявлены две мишени их действия в ПТ: 1) H^+ -АТФаза ПМ, электрогенный протонный насос, ответственный за ее поляризацию и 2) Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы. Полагаем, что гормон-индуцированный сдвиг pH_c вовлекается в каскад событий, включающих функционирование рН-зависимых K^+ -каналов. Установлено, что гормон-индуцированная гиперполяризация ПМ является результатом стимуляции электрогенной активности H^+ -АТФазы, а гормональные эффекты опосредованы транзиторным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле и генерацией АФК. Полученные результаты о роли ионов K^+ в гормональном контроле движущих сил транспорта воды в ПТ позволили сформулировать гипотезу о том, что АБК и ИУК стимулируют прорастание ПЗ и рост ПТ, активируя K^+ -каналы. Проведенное исследование показало, что АЦ мужского гаметофита петунии чувствителен к действию экзогенных гормонов (в большей степени ИУК), но судя по действию латрункулина Б, он может выступать в роли детерминанта уровня эндогенных фитогормонов, которые, вероятно все-го, участвуют в регуляции полярного роста ПТ, влияя на пул F-актина в апикальной и субапикальной областях.

Ключевые слова: мужской гаметофит, прорастание, ИУК, АБК, H^+ -АТФаза, pH_c , актиновый цитоскелет, K^+ -каналы, АФК.

DOI: 10.7868/S0475145016030034

ВВЕДЕНИЕ

Прорастание пыльцевых зерен (ПЗ) и поддержание полярного роста пыльцевой трубки (ПТ), ключевые процессы прогамной фазы оплодотворения у высших растений, требуют как временной, так и пространственной координации многих клеточных функций, в том числе динамической организации элементов актинового цитоскелета (АЦ), внутриклеточного транспорта везикул, несущих материал для построения клеточной стенки в ходе экзо- и эндоцитоза, и транспорта через ее плазматическую мембрану (ПМ) основных физиологически важных ионов, таких как H^+ , Ca^{2+} , K^+ (Feijo et al.,

1995; Vidali et al., 2001; Holdaway-Clarke and Hepler, 2003). В качестве основных интеграторов сигнальных путей, участвующих в механизме регуляции роста ПТ, в настоящее время рассматривают актин-связывающие белки (АСБ), которые вызывают изменения в структуре актина в ответ на внешние и внутренние сигналы (Staiger et al., 2010; Qu et al., 2015). При этом координация соответствующих процессов, по-видимому, реализуется через активность белка ROP1, который, будучи связанным с RIC3 или RIC4 (ROP-interacting CRIB motif-containing proteins 3 and 4), локализован в апексе ПТ и, через взаимодействие с АЦ и

ионами Ca^{2+} , способен выступать в роли мишени для секреторных везикул (Gu et al., 2005). Кроме Ca^{2+} и ROP GTPases, в пыльце идентифицированы другие сигнальные молекулы-модуляторы апикального роста ПТ (сАМР, фосфоинозитиды, кальмодулин, протеинкиназы, GABA и NO), которые в свою очередь являются мишенями для сигнальных путей, регулирующих этот процесс путем их взаимодействия с ионами Ca^{2+} и/или с цитоскелетом при генерации кальциевого сигнала в цитозоле (Malho et al., 2006).

Об участии фитогормонов в регуляции прорастания и роста мужского гаметофита свидетельствуют данные о том, что прорастание ПЗ *in vitro* и *in vivo* сопровождается заметными изменениями в уровне эндогенных фитогормонов (этилена, ауксина (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК), гиббереллинов и цитокининов) и чувствительно к действию экзогенных (Kovaleva, Zakharova, 2003; Ковалева и др., 2005). О потенциальной возможности функционирования гормонов в этих процессах в качестве сигнальных молекул свидетельствуют недавно полученные данные о том, что их физиологическое действие может включать в себя модуляцию внутриклеточного рН мужского гаметофита, опосредованную, возможно, активностью H^+ -АТФазы плазмалеммы (Андреев и др., 2007), и что АЦ мужского гаметофита может быть интегратором сигнальных путей фитогормонов в процессе полярного роста ПТ (Ковалева и др., 2015).

В настоящее время ключевая роль в тканевой специализации репродуктивных органов отводится ауксину, который, как известно, играет центральную роль в растяжении и делении клеток и контролирует различные процессы развития (Sundberg and Ostergaard, 2009). Ауксин осуществляет свою функцию в цветках через интеграцию процессов биосинтеза, транспорта и сигналинга, а также взаимодействий с сигнальными путями других гормонов. В мужском гаметогенезе ауксин регулирует развитие микроспор через контроль митоза (Feng et al., 2006), а развитие пыльника через регуляцию растяжения филаментов и созревания ПЗ (Cecchetti et al., 2008). Согласно недавно высказанному предположению стресс-индуцированное снижение уровня ауксина в пыльнике может быть причиной мужской стерильности (Sakata et al., 2010). Прорастание и рост мужского гаметофита как *in vitro*, так и *in vivo*, в системе пыльца–пестик, сопровождается постепенным повышением уровня ИУК, а ингибитор транспорта ИУК полностью ингибирует рост ПТ (Kovaleva, Zakharova, 2003; Ковалева и др., 2010).

АБК играет ключевую роль в ответе растений на стресс (Umezawa et al., 2010). Этот гормон накапливается в растительных клетках при водном стрессе, стимулируя закрывание устьиц и регулируя экспрессию многих генов, продукты которых могут защищать вегетативные ткани от дегидра-

тации или высокого осмотического давления. Эти факты позволяют рассматривать АБК как фитогормон, связанный с водным стрессом, который способствует устойчивости клеток к дегидратации и/или обезвоживанию. Накапливаются данные о том, что АБК, активируя ответ растения на стресс, участвует в регуляции углеводного метаболизма в мужских репродуктивных органах при стрессе (Dekkers et al., 2008). У пшеницы, мужская стерильность в чувствительных к засухе пыльниках связана с аккумуляцией АБК, тогда как устойчивые к засухе пыльники содержат более низкий уровень АБК (Ji et al., 2011). В развивающемся пыльнике лилии функционирует особый путь трансдукции сигнала АБК, связанный с дегидратацией ПЗ (Hsu et al., 2010).

В настоящей работе мы попытались выяснить, какие внутриклеточные системы мужского гаметофита петунии включаются в трансдукцию гормональных сигналов, запускаемых ИУК и АБК при действии этих гормонов на прорастание и рост ПЗ и ПТ. С этой целью проведено сравнительное изучение эффектов ИУК и АБК на прорастание ПЗ и рост ПТ, а также на их внутриклеточный рН, мембранный потенциал ПМ, активность в ней H^+ -АТФазы и K^+ -каналов, и организацию АЦ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследований служила пыльца петунии (*Petunia hybrida* L.) самосовместимого клона. Вегетативно размноженные растения были выращены в почвенной культуре при естественном освещении в оранжерее. Черенки выращивали в пробирках на агаризованной среде Мурасиге и Скуга в климатической камере (25°C, 16 ч световой день).

Культивирование пыльцы. Свежесобранную пыльцу культивировали в течение 2 ч в термостате при температуре 26°C на среде, содержащей 0.3 М сахарозу и 1.6 мМ H_3BO_3 или 0.3 М сахарозу, 1.6 мМ H_3BO_3 , 1.3 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.9 мМ KNO_3 и 0.8 мМ MgSO_4 . 2 мг пыльцы и 2 мл среды культивирования помещали в пузырек, добавляя ИУК или АБК в концентрации 1 мкМ, 1 мМ флуридон, 2,3,5-трийодбензойную кислоту (ТИБК) в концентрации 1 мкМ, а также ингибитор K^+ -каналов хлорид тетраэтиламмония (ТЕА-Cl) в концентрации 20 мМ одновременно со средой культивирования.

Определение внутриклеточного рН. Внутриклеточный рН (pH_c) ПЗ/трубок оценивали после их предварительной нагрузки флуоресцеин диацетатом (Seriva, Германия) или ацетоксиметилловым эфиром 2'7'-бис(2-карбосиэтил)-5(6')-карбокси-флуоресцеина (BCECF-AM) (Sigma, США). По интенсивностям флуоресценции образцов при 530 нм, возбуждаемой при 440 (F_{440}) и 490 (F_{490}) нм,

рассчитывали величину отношения F490/F440 как меру pH_c . Измерения флуоресценции проводили на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi-850 (Япония).

Выявление генерации АФК. О генерации АФК в исследуемых препаратах ПЗ/ПТ судили по изменению флуоресценции 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата ($H_2DCF-DA$), флуоресцентного индикатора, предварительно загруженного в эти растительные объекты. Флуоресценцию регистрировали при 520 нм, возбуждая ее при 450 нм (The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 2010) на флуоресцентном спектрофотометре.

Определение гормон-индуцированных изменений мембранного потенциала на ПМ ПЗ/трубок. Изменения мембранного потенциала регистрировали с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина O, следя за разностью его оптических поглощений при 554 и 524 нм ($\Delta A_{554-524} = A_{554} - A_{524}$) на двухволновом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Согласно контрольным измерениям, количество жизнеспособных ПЗ, инкубируемых в течение 30 мин в присутствии сафранина O, в среднем снижалось примерно на 5%. Все измерения были выполнены при комнатной T в стандартных 1-см кюветах при непрерывном барботировании их содержимого воздухом, чтобы исключить возможность оседания пыльцы. Суспензия ПЗ в среде культивирования, содержащая примерно 0.8 мг пыльцы (40000 зерен), была добавлена к среде измерения, содержащей 0.3 M сахарозу, 25 mM Mes-Трис (pH 6.9) и 10 мкM сафранина O и перед началом измерений была инкубирована в ней в течение примерно 20–30 мин для достижения относительно стационарного уровня абсорбции сафранина O.

Методика иммуноцитохимической идентификации H^+ -АТФазы ПМ. ПТ петунии фиксировали 4% параформальдегидом (ПФА) в 10 mM PBS не менее 3-х ч и промывали однократно в нормальном солевом буфере (НСБ, 10 mM PBS, 0.88% NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20 и 0.8% БСА) (Chen et al., 2010). Затем образцы промывали дважды отмывочным буфером (ОБ) (10 mM PBS и 0.8% БСА) и проводили конъюгацию с первичными антителами против H^+ -АТФазы (Agrisera, AS07260; разведение 1 : 300 в PBS + + 1 мг/мл БСА (0.1%) в течение 1–4 ч при 37°C). После конъюгации образцы несколько раз тщательно промывали в концентрированном солевом буфере (КСБ, 10 mM PBS, 2.9% NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20 и 0.1% БСА), промывали НСБ, с последующей отмывкой ОБ от Tween 20. Далее проводили конъюгирование со вторичными антителами (Agrisera, AS10 831; разведение 1 : 500 в PBS + 0.15 M NaCl + 1 мг/мл БСА) в течение 4 ч при комнатной T во влажной каме-

ре. После этого отмывали препараты в НСБ, накрывали покровными стеклами и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imedger Z2 (возбуждение 475/30 нм, эмиссия 550/100 нм) с модулем Apo Tome и камерой Axio Cam MRm “Carl Zeiss” (Германия). На фотографии представлены реконструкции ПТ из нескольких оптических срезов. Изображение ПТ в программе AxioImager 4.8 делили на 8 равных зон по 10 мкм, начиная с кончика, и затем проводили профиль, отображающий распределение интенсивности свечения по всем зонам трубки. С помощью программы Microsoft Office Excel 2007 оценивали среднее значение интенсивности флуоресценции в каждой зоне трубки.

Визуализация F-актина. ПТ фиксировали 4% ПФА в актин-стабилизирующем буфере, содержащем 100 mM Pipes, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ и 75 mM KCl (pH 6.9) в течение 1 ч с предварительной вакуум-инфильтрацией в течение 5 мин (Wang et al., 2005). После фиксации образцы трехкратно промывали и проводили пермеабиллизацию путем обработки в течение 1 ч буфером, содержащим 0.1% Тритон X-100 и 1 mM ДТТ. Окрашивание F-актина проводили в течение 20 мин с помощью 0.66 мкM FITC-фаллоидина в фосфатном буфере, содержащем 0.15 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 и 6.5 mM Na_2HPO_4 . После окрашивания образцы трехкратно промывали PBS и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imedger D1 (возбуждение 475/40 нм, эмиссия 530/50 нм), снабженном камерой Axio CamMRc. Длину ПТ (не менее 100 образцов) измеряли, используя программу Axio Vizion 4.5. Оборудование и программное обеспечение – “Carl Zeiss” (Германия).

Изображение ПТ делили на 8 равных зон по 10 мкм, начиная от кончика, и затем проводили профиль, отображающий распределение интенсивности свечения по всем зонам трубки. С помощью программы Microsoft Office Excel 2003 оценивали среднее значение интенсивности флуоресценции в каждой зоне трубки.

Определение эндогенного содержания фитогормонов. Содержание фитогормонов ИУК и АБК определяли в одном образце прорастающей пыльцы петунии после 0, 1 и 2 ч культивирования. Пыльцу отделяли от среды культивирования на бумажном фильтре. Для нулевой точки пыльцу погружали в среду культивирования на 3–5 минут. Фиксацию материала проводили согласно методике Скоробогатовой и др. (1999). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ. Хроматографические условия для определения ИУК: детектор флуоресцентный Shimadzu RF-530, возбуждение 280 нм, эмиссия 350 нм, колонка 4 × 250 мм Ultrapac Lichrosorb RP 18, 5 мкм. Элюэнт: 40%-ный водный раствор метанола, скорость элюции – 0.3 мл/мин. Хроматографические усло-

вия для определения АБК: детектор ультрафиолетовый (Shimadzu R-530), длина волны 254 нм, колонка 4 × 250 мм Ultrapac Lichrosorb RP 18, 5 мкм. Элюэнт: 40%-ный водный раствор метанола, скорость элюции – 0.7 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ИУК и АБК стимулируют прорастание in vitro мужского гаметофита петунии, активируя K⁺-каналы в ПМ ПТ

Прорастание ПЗ и рост ПТ зависит от водных и ионных (Ca²⁺, H⁺, K⁺, Cl⁻) потоков (Feijo et al., 1995). Калий, основной осмотически-активный агент в клетках растений, обеспечивает поддержание тургорного давления и его поглощение создает движущую силу для трансмембранных осмотических потоков воды в клетки. Как осмотический регулятор, калий необходим и для прорастания ПЗ, и для роста ПТ, которые используют K⁺, наряду с другими осмотиками, такими как сахароза. Транспорт K⁺ через ПМ пыльцы регулируется K⁺-каналами (Feijo et al., 1995; Becker et al., 2004; Zhao et al., 2013; Sharma et al., 2013; Safiarian et al., 2015). Присутствие этого катиона выявлено в области апертуры зрелой пыльцы и, учитывая синхронизированное появление K⁺ в зрелой пыльце, пыльниках и папиллах, авторы предположили, что K⁺ может регулировать раскрытие пыльника, набухание пыльцы и гидратацию папилл и совместно с ионами Ca²⁺ и H⁺ участвует в регуляции полярного роста ПТ (Rehman and Yan, 2006). Брейгина и др. (2012) установили, что гидратация ПЗ как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* сопровождается выходом из него подвижных ионов K⁺ и Cl⁻. Мы провели исследование, направленное на выяснение механизма включения ИУК и АБК в осморегуляцию прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии. Результаты представлены на рис. 1 и в таблицах 1–3.

Пыльца петунии прорастает на воде, однако длина ПТ остается постоянной в течение 2 ч и составляет 15 мкм (рис. 1а; табл. 1). Внесение гормонов, ИУК или АБК, стимулировало в 2 раза прорастание ПЗ. При культивировании пыльцы на среде, содержащей 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ H₃BO₃, гормоны стимулировали как прорастание ПТ, так и рост ПТ (рис. 1а, 1б; табл. 2). В первые 0.5 ч культивирования, на стадии гидратации ПЗ и инициации прорастания ПТ, % прорастания ПЗ и длина ПТ на среде (без гормонов) были идентичны этим показателям при культивировании ПЗ на воде в присутствии ИУК или АБК, причем АБК в большей степени стимулировала прорастание ПЗ, а ИУК – рост ПТ (рис. 1а, 1б). При последующем культивировании оба гормона (АБК в большей степени) стимулировали и прорастание ПЗ, и рост ПТ (рис. 1а, 1б; табл. 1 и 2).

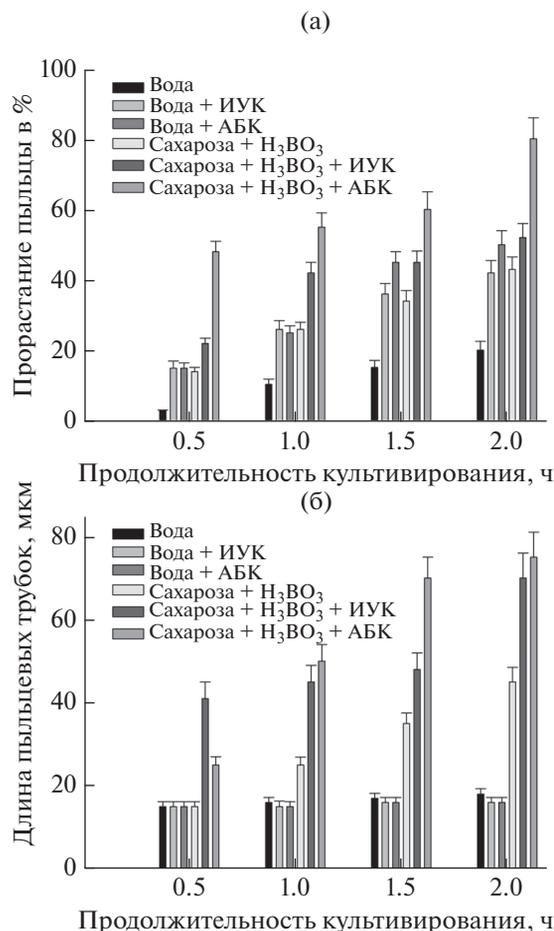


Рис. 1. Эффекты ИУК и АБК на прорастание пыльцевых зерен (ПЗ) (а) и рост пыльцевых трубок (ПТ) (б) петунии на воде и среде, содержащей 0.3 М сахарозу + 1.6 мМ H₃BO₃. Представлены средние арифметические и их стандартные отклонения из 3 независимых опытов, каждый из которых проведен в 2–3 кратной биологической повторности (n = 6–10).

ТИБК, ингибитор транспорта ИУК и флуридон, ингибитор синтеза АБК, тормозили рост ПТ. При этом флуридон полностью ингибировал рост ПТ на воде, в то время как ТИБК снижала в 3 раза рост ПТ на среде (табл. 1 и 2).

В ходе ингибиторного анализа было установлено, что ингибитор K⁺-каналов ТЕА-С1 ингибировал прорастание ПЗ, культивируемых на среде, содержащей 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ H₃BO₃ (табл. 3).

При совместном внесении в среду гормонов с ТЕА-С1 наблюдали снятие ингибиторного эффекта ТЕА-С1 и прорастание ПЗ и рост ПТ. Эффект АБК был более значительный, а именно, ее присутствие в среде культивирования стимулировало прорастание ПЗ в 3 раза, а рост ПТ в 2 раза (по сравнению с контролем), в то время как ИУК стимулировала рост лишь незначительного числа

Таблица 1. Влияние ИУК, АБК, ТИБК и флуридона на рост пыльцевых трубок (в мкм)

Время культивирования	Вода (К)	Вода + ИУК	Вода + ТИБК	Вода + ТИБК + ИУК	Вода + АБК	Вода + флуридон	Вода + АБК + флуридон
1 ч	15 ± 0.9	22.9 ± 1.7	10.41 ± 0.7	10 ± 0.6	13.72 ± 0.7	—	12.5 ± 0.5
2 ч	22.9 ± 1.9	23 ± 2.1	10.5 ± 0.9	27.5 ± 1.9	23.1 ± 2.1	—	27.1 ± 2.2

Таблица 2. Влияние ИУК, АБК, ТИБК и флуридона на рост пыльцевых трубок (в мкм)

Время*	Среда (К)	Среда + ИУК	Среда + ТИБК	Среда + ТИБК + ИУК	Среда + АБК	Среда + флуридон	Среда + АБК + флуридон
1 ч	89.5 ± 5.5	110.4 ± 8.2	37.5 ± 2.8	47.5 ± 2.8	147.5 ± 13.1	18.75 ± 0.9	40 ± 2.2
2 ч	235 ± 12.5	337.5 ± 15.8	78.7 ± 5.1	75.5 ± 4.2	365 ± 23.1	202.1 ± 13.4	282.5 ± 11.7

* Время культивирования.

Таблица 3. Влияние ТЕА-С1, ингибитора K⁺-каналов, на прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок петунии

Вариант	Время культивирования на среде (0.4 М сахара + 1.6 мМ Н ₃ ВО ₃)	% прорастания пыльцевых зерен	Длина пыльцевых трубок, мкм
Контроль	1 ч	5	4.5 ± 0.31
Контроль	2 ч	10	11.83 ± 0.63
ТЕА-С1 20 мМ	1 ч	—	—
ТЕА-С1 20 мМ	2 ч	—	—
ТЕА-С1 + ИУК 5 мкМ	1 ч	ед.	3.5 ± 0.17
ТЕА-С1 + ИУК 5 мкМ	2 ч	ед.	10.85 ± 0.75
ТЕА-С1 + АБК 5 мкМ	1 ч	20	11.66 ± 0.74
ТЕА-С1 + АБК 5 мкМ	2 ч	30	20.16 ± 1.81

ПТ, сравнимых по длине с контрольными ПТ. Полагаем, что АБК снимала действие ТЕА-С1, стимулируя транспорт ионов K⁺ через ПМ прорастающего мужского гаметофита. Полученные результаты о роли ионов K⁺ в гормональном контроле движущих сил транспорта воды в прорастающем мужском гаметофите позволили сформулировать гипотезу, объясняющую возможную роль фитогормонов в этом процессе. Мы полагаем, АБК и ИУК стимулируют прорастание ПЗ и рост ПТ, активируя K⁺-каналы в ПМ ПТ.

Эффекты ИУК и АБК на цитоплазматический рН (рН_c) прорастающего in vitro мужского гаметофита петунии

Величина внутриклеточного рН (рН_c) является существенным фактором, участвующим в контроле таких внутриклеточных процессов, как экспрессия генов и синтез белка, а также организация цитоскелета, причем увеличение рН_c является необходимым условием активации процесса прорастания ПЗ (Матвеева и др., 2002).

Ранее было установлено (Андреев и др., 2007), что внутриклеточный рН прорастающих ПЗ петунии изменяется в ответ на внесение в среду культивирования гормонов. Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют, что эффекты ИУК и АБК на рН_c ПЗ, культивируемых на среде, содержащей 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ Н₃ВО₃, зависели от времени их культивирования (рис. 2). В ПЗ, культивируемых в течение 1 ч, оба гормона индуцировали защелачивание цитоплазмы на 0.4–0.5 ед. рН и в последующие 15 минут этот эффект сохранялся (рис. 2а). Характер гормон-индуцируемой модуляции рН_c ПЗ, культивируемых 2 ч, был иной (рис. 2б), а именно, величина этого параметра монотонно возрастала в присутствии ИУК и падала при внесении АБК.

В целом эти результаты позволяют заключить, что внутриклеточный рН клеток ПЗ петунии чувствителен к действию ИУК и АБК, причем характер их влияния на рН_c зависит как от природы, так и от физиологического состояния мужского гаметофита. В действии экзогенных АБК и ИУК на гидратацию и прорастание ПЗ выявлены различия, которые позволяют считать, что гормон-

индуцированный сдвиг pH_c вовлекается в каскад событий, запускающих процессы прогамной фазы оплодотворения. Достаточно выраженные изменения pH_c ПЗ говорят в пользу того, что эти изменения могут оказывать заметное влияние на метаболические системы мужского гаметофита, которые участвуют в реализации его ответной реакции на гормоны, включая, как мы полагаем, и функционирование pH -зависимых K^+ -каналов.

Выявленные эффекты ИУК и АБК на pH_c прорастающих ПЗ петунии и их блокирование в присутствии ортованадата, ингибитора АТФ-зависимого протонного насоса на ПМ растительных клеток, дали основание предполагать, что гормон-индуцированный сдвиг pH_c обусловлен влиянием гормонов на активность H^+ -АТФазы на ПМ мужского гаметофита.

Влияние ИУК и АБК на H^+ -АТФазу ПМ прорастающего мужского гаметофита петунии

Гормон-индуцируемая гиперполяризация ПМ

Способность ИУК модулировать активность ион-транспортирующих систем на ПМ мужского гаметофита была показана ранее в опытах, в которых исследовали ее действие на величину мембранного потенциала, отражающего суммарную активность всего комплекса ион-транспортирующих систем, следя за его изменением с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина О (Воронков и др., 2010). Как показано на рис. 3а, кинетика изменений абсорбции сафранина О в присутствии АБК, добавленных в концентрации 2.5 мкМ к суспензии ПЗ, предварительно инкубированных в течение 20–30 мин с красителем в среде измерения, не содержащей ионов калия, была идентичной ранее установленной кинетике для ИУК (Воронков и др., 2010). Добавление АБК немедленно инициировало гиперполяризацию ПМ ПЗ, судя по увеличению абсорбционного сигнала сафранина. Оно достигало насыщения примерно через 10–15 мин, причем гормон-индуцированный сигнал сафранина достаточно быстро снижался после внесения 60 мМ KCl, что, наиболее вероятно, отражает сдвиг мембранного потенциала на ПМ ПЗ. Справедливость этого предположения, основанного на возможном действии гормонов на электрогенную активность H^+ -АТФазы ПМ была подтверждена тем, что гормон-индуцированный сигнал сафранина полностью блокировался в присутствии ортованадата, относительно специфичного ингибитора этого протонного насоса на ПМ растительных клеток (рис. 3б), а также Ca^{2+} -активными соединениями, верапамиллом, блокатором Ca^{2+} -каналов клеточных мембран и хелатором Ca^{2+} – ЭГТА (рис. 3в, 3г). Ингибирующее действие ЭГТА, оче-

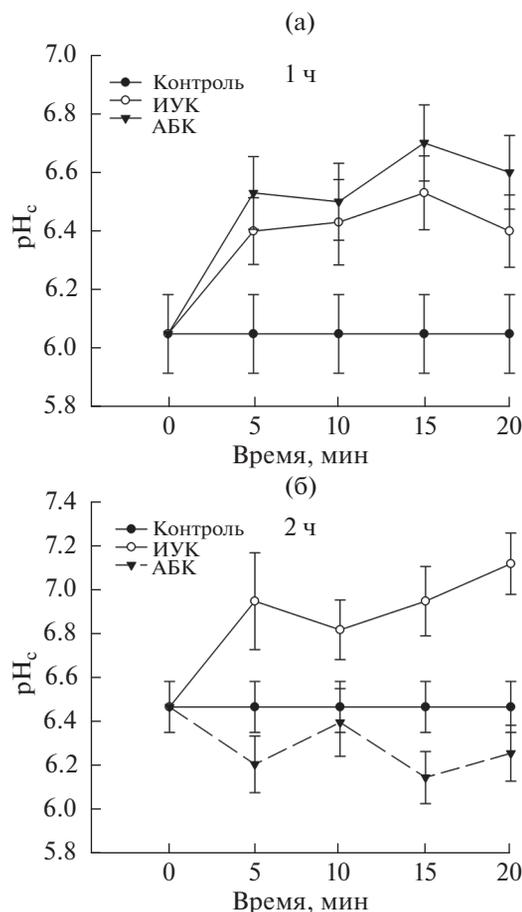


Рис. 2. Действие экзогенных ИУК и АБК на pH_c ПЗ петунии, прорастающих в течение 1 и 2 ч. ИУК и АБК добавляли к суспензии ПЗ до конечной концентрации 10 мкМ за 10 мин до начала измерений. Приведены среднееарифметические и их стандартные отклонения из 4–5 независимых экспериментов. О достоверности судили по t -критерию при $p < 0.05$.

видно, связано с сильным снижением уровня Ca^{2+} во внеклеточной среде и, тем самым, с предотвращением его поступления внутрь ПТ через ПМ. Следовательно, гиперполяризация ПМ мужского гаметофита петунии под действием ИУК и АБК является результатом стимуляции гормонами электрогенной активности H^+ -АТФазы ПМ, а гормональные эффекты опосредованы транзитным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле.

В иммуногистохимических опытах было установлено, что гормон-индуцированная стимуляция электрогенной активности H^+ -АТФазы ПМ растущей ПТ сопровождается латеральным перераспределением в данной мембране локализации этого протонного насоса (рис. 4). Судя по распределению флуоресцентной метки, H^+ -АТФаза ПМ в контрольных ПТ локализована в апикальной зоне ПТ, на расстоянии 10–20 мкм от кончика

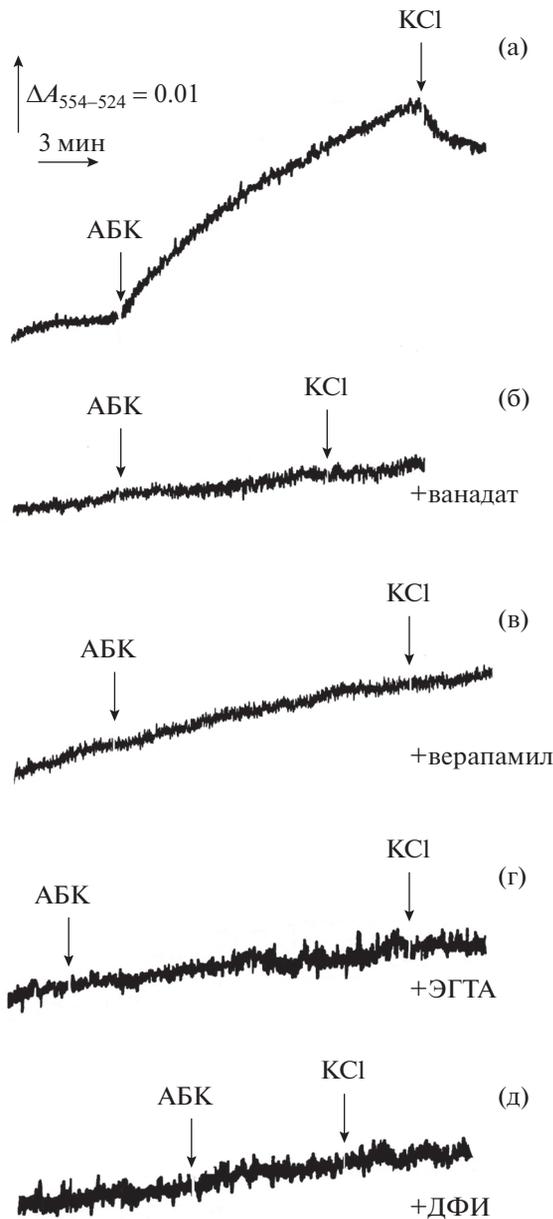


Рис. 3. Гиперполяризация плазмалеммы прорастающего в течение 1 ч мужского гаметофита петунии под действием АБК. К суспензии пыльцевых зерен, содержащую 10 мкМ сафранина О, добавляли, где указано, 2,5 мкМ АБК (а–д), 60 мМ КСl (а–д), 200 мкМ ортованадат (б), 100 мкМ верапамил (в), 0,5 мМ ЭГТА (г) и 1 мМ ДФИ (д). Представлены репрезентативные кинетические кривые из 3–5 независимых экспериментов.

трубки, (рис. 4а, 4г). Иной характер распределения флуоресцентной метки наблюдали в ПМ ПТ, культивируемых в присутствии 1 мкМ ИУК или АБК, а именно H^+ -АТФаза ПМ была преимущественно локализована в субапикальной зоне ПТ, в случае ИУК – на расстоянии 10–30 мкм (рис. 4б), а

в случае АБК – на расстоянии от 20 до 30 мкм от кончика трубки (рис. 4в). При этом эффект АБК, очевидно, был более выраженным.

Полученные данные о том, что K^+ -зависимая диссипация мембранного потенциала на ПМ мужского гаметофита петунии требует наличия в среде культивирования ионов Ca^{2+} и фитогормонов (рис. 3а–3г), свидетельствуют в пользу выдвинутой нами гипотезы об активации ИУК или АБК Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов в прорастающих ПТ, где гормон-индуцируемая стимуляция активности H^+ -АТФазы ПМ может служить способом дополнительной энергизации трансмембранного транспорта ионов K^+ как основного осмотически-активного компонента, участвующего в осморегуляции исследуемой системы.

Гормон-индуцированная генерация АФК

Принимая во внимание установленные факты, что в трансдукцию гормональных сигналов в растительных клетках способны включаться активные формы кислорода (АФК) (Joo et al., 2001), была протестирована возможность участия их в передаче гормональных сигналов, приводящих к гиперполяризации ПМ прорастающего мужского гаметофита петунии.

Известно, что АФК локализованы в апикальной части ПТ и установлено, что они генерируются НАДФН-оксидазой ПМ (Potosky et al., 2007). Обнаружено накопление H_2O_2 в папиллах рыльца и окиси азота (NO) в пыльце, что привело к предположению о сигнальной роли АФК/NO во взаимодействиях ПЗ с клетками рыльца (Bright et al., 2009). Установлено, что главными источниками АФК в цитоплазме вегетативной клетки являются митохондрии (Смирнова и др., 2009).

Мы протестировали возможность участия АФК в передаче гормональных сигналов, приводящих к гиперполяризации ПМ прорастающего мужского гаметофита петунии. Было установлено, что гиперполяризующий эффект ИУК чувствителен к дифенилен иодониуму (ДФИ), ингибитору НАДФН-оксидазы, способной к генерации АФК, и полностью подавлялся этим ингибитором (Воронков и др., 2010). Данные, представленные на рис. 3д, свидетельствуют о том, что гиперполяризующий эффект АБК также чувствителен к ДФИ. Кроме того, выяснилось, что наблюдаемый эффект обоих гормонов может быть имитирован добавлением к суспензии ПЗ перекиси водорода в миллимолярной концентрации, причем выявленное действие H_2O_2 подавлялось в присутствии ортованадата, а также ДФИ и Ca^{2+} -активных агентов – ЭГТА и верапамила в тех же концентрациях, что блокировали гормон-индуцированную гиперполяризацию мембран ПЗ (данные не представлены).

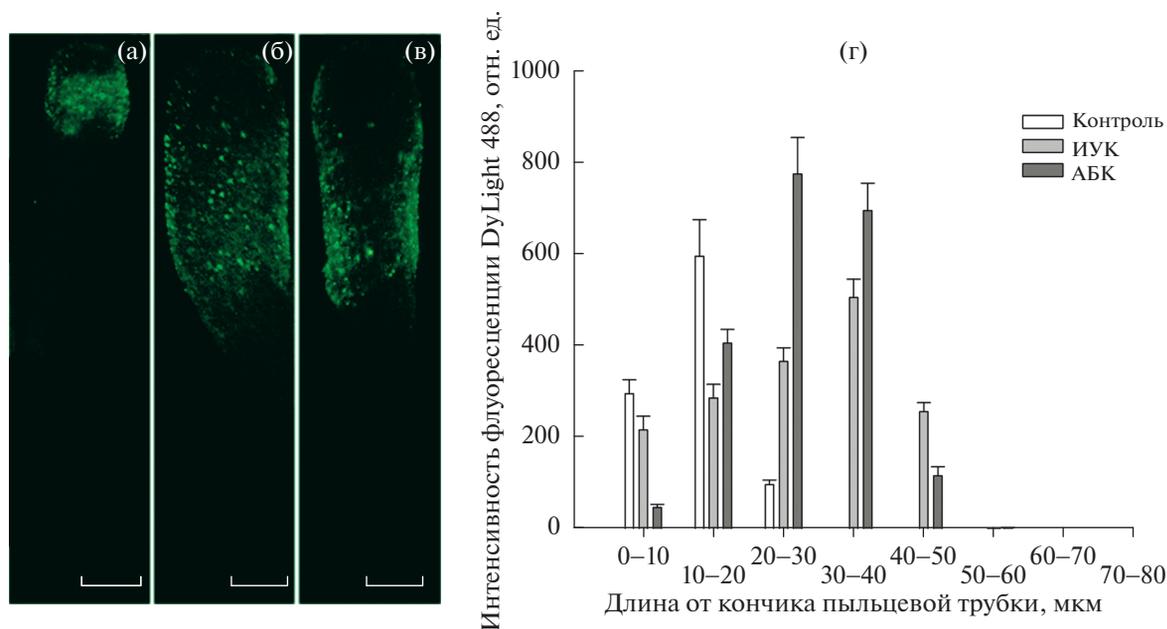


Рис. 4. Влияние 1 мкМ ИУК и АБК на локализацию Н⁺-АТФазы на ПМ ПТ петунии. (а) Контроль. ИУК (б) и АБК (в) добавляли в среду культивирования после 2-часового культивирования ПЗ. Не менее 50 ПТ использовали в каждом из 5 независимых опытов. Бар = 10 мкм.

Полученные факты дали основание полагать, что наряду с кальцием в трансдукции гормональных сигналов, приводящих к стимуляции электрогенной активности Н⁺-АТФазы на ПМ прорастающего мужского гаметофита петунии, включаются и АФК. С использованием 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) динамика образования АФК была прослежена (рис. 5а). Максимум образования АФК наблюдали после 1 ч культивирования ПЗ, при дальнейшем культивировании ПЗ их уровень снижался. Полученные результаты свидетельствуют, что процесс гидратации ПЗ и инициации прорастания ПТ включает образование АФК. Установлено, что эффекты ИУК и АБК на динамику образования АФК зависят от концентрации и времени действия гормона, а также от стадии прорастания мужского гаметофита. Оба гормона стимулировали продукцию АФК в ПЗ, культивируемых в течение 30 мин, причем более быстрая стимуляция этого процесса наблюдалась в присутствии АБК и сохранялась в течение 20 мин. В то же время ИУК-индуцируемая генерация активного кислорода обнаруживалась не сразу, а только в течение последних 10 минут его действия (рис. 5б). Следовательно, процесс прорастания мужского гаметофита петунии сопровождается образованием АФК, с максимумом на стадии гидратации и инициации прорастания ПЗ. Полученные результаты дают основание предполагать возможность взаимодействия АФК и фитогормонов в процессе прорастания ПЗ.

Таким образом, в ходе исследований, направленных на выяснение механизмов возможного включения ИУК и АБК в осморегуляцию прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии, были получены данные в пользу этой гипотезы. Выявлены две возможные мишени действия фитогормонов, предположительно участвующие в гормон-индуцируемой осморегуляции ПТ: 1) Н⁺-АТФаза ПМ, электрогенный протонный насос, ответственный за ее поляризацию, т.е. генерацию на ней мембранного потенциала и 2) Са²⁺-зависимые К⁺-каналы, а гормональные эффекты опосредованы транзитным увеличением уровня Са²⁺ в цитозоле и генерацией АФК. Высказано предположение о функционировании в ПТ рН-зависимых К⁺-каналов.

Влияние ИУК и АБК на плотность актиновых филаментов (АФ) в прорастающем мужском гаметофите

АЦ обеспечивает доставку мембранных везикул в апикальную зону ПТ благодаря активности АФ в ходе их полярного роста (Staiger et al., 2010), поэтому нельзя исключить, что эффекты экзогенных гормонов на рост ПТ связаны с их влиянием на АЦ. Справедливость этой гипотезы была подтверждена в опытах, направленных на выяснение характера действия экзогенных фитогормонов на организацию F-актина как ключевого

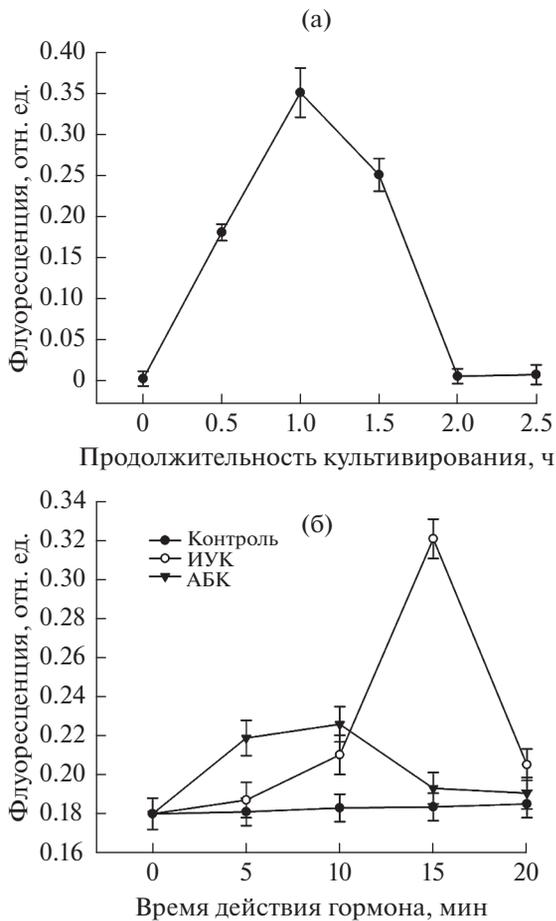


Рис. 5. Эффекты ИУК и АБК на динамику образования АФК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите петунии: (а) динамика образования АФК, (б) эффекты ИУК и АБК на образование АФК в прорастающих *in vitro* ПЗ в течение 0.5 ч. Приведены среднеарифметические и их стандартные отклонения из 5 независимых экспериментов. О достоверности судили по *t*-критерию при $p < 0.05$.

компонента, непосредственно ответственного за доставку материала для построения клеточной стенки к ПМ апекса ПТ (Ковалева и др., 2015). В продолжение этих исследований были исследованы эффекты ИУК и АБК, стимулирующих рост ПТ, на организацию F-актина (рис. 6). Судя по степени флуоресценции нитей F-актина, ИУК вызывала усиление интенсивности флуоресценции на 37% по сравнению с контролем, что свидетельствовало об увеличении общего количества АФ в ПТ (рис. 6а). Максимальное количество АФ локализовано в апикальной и субапикальной зоне ПТ, наиболее существенных для поддержания ее полярного роста (рис. 6б). АБК привела к менее значительному (10%) повышению общего содержания и 15%-перераспределению АФ в апикальную зону (рис. 6а, 6б). Плотность АФ достигала максимума в субапикальной и апикальной

областях ПТ (рис. 6б). Таким образом, именно ИУК стимулировала полимеризацию нитей АЦ как ключевых его компонентов, непосредственно ответственных за доставку материала для построения клеточной стенки к ПМ.

Влияние латрункулина Б на динамику эндогенных ИУК и АБК

Представленные выше данные о влиянии экзогенных фитогормонов на организацию АЦ как одного из ключевых детерминантов роста ПТ ставят вопрос о том, способно ли нарушение этой структуры и тем самым данного процесса отражаться на интенсивности продукции или биосинтеза эндогенных фитогормонов. В этой связи в описанных ниже экспериментах с использованием латрункулина Б мы попытались дать ответ на этот вопрос.

Ингибитор полимеризации актина, латрункулин Б, в концентрации 100 нМ ингибирует прорастание ПЗ, тогда как при концентрации ингибитора 0.2 нМ прорастание ПЗ не ингибируется, но рост ПТ значительно замедляется. Культивирование пыльцы в течение 4 ч на среде в присутствии 0.2 нМ латрункулина приводило к нарушению citoархитектуры АЦ мужского гаметофита и, как следствие, к ингибированию его роста. Как показано на рис. 7, торможение роста ПТ сопровождалось резким снижением практически до нуля содержания ИУК в отличие от контрольного варианта, где рост ПТ сопровождался постепенным подъемом уровня этого гормона. Динамика содержания АБК была иной (рис. 7). В ПТ, растущих на обеих средах, концентрация АБК снижалась до нуля через 1 ч культивирования, а при последующем культивировании ее уровень постепенно повышался и через 4 ч был идентичен в обоих вариантах.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что изменения структуры и функционирования АЦ мужского гаметофита, вызываемые латрункулином Б, определенным образом коррелируют с модуляцией уровня эндогенных фитогормонов. Существенное снижение скорости роста ПТ на среде с ингибитором, очевидно, обусловлено нарушением функционирования АЦ и снижением содержания эндогенной ИУК, играющей ключевую роль в поляризованном росте ПТ.

Таким образом, проведенное исследование показало, что АЦ мужского гаметофита петунии чувствителен к действию экзогенных гормонов, но судя по действию латрункулина Б, он может выступать в роли важного детерминанта уровня эндогенных фитогормонов, которые, вероятно всего, участвуют в регуляции полярного роста ПТ, влияя на пул F-актина в апикальной и субапикальной областях.

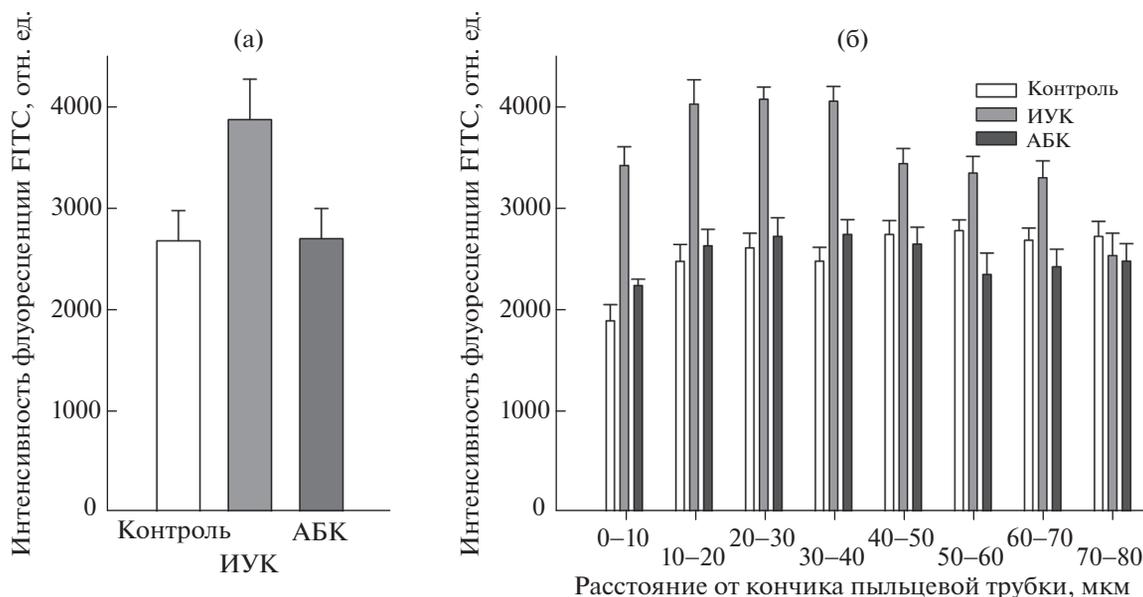


Рис. 6. Эффекты 1 мкМ ИУК и АБК на организацию F-актина в ПТ петунии: (а) образование АФ и (б) общее содержание F-актина. Не менее 50 ПТ использовали в каждом опыте. Опыты проводили в 3–5 повторностях. О достоверности судили по *t*-критерию при $p \leq 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие мужского гаметофита сопровождается значительными изменениями в его водном статусе (Figon et al., 2012). Во время последнего периода созревания в пыльнике пыльца подвергается быстрой дегидратации. Зрелая, дегидратированная пыльца может сохранять жизнеспособность в сухом состоянии в течение длительного времени и адаптироваться к изменениям влажности окружающей среды. Реактивация пыльцы осуществляется на поверхности рыльца в ходе ее гидратации. В гидратированном ПЗ активизируются дыхание, синтез белка и ионные потоки. Гидратация является пусковым механизмом прорастания ПЗ пыльцы, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, и стимулирует рост ПТ, который начинают сразу после набухания и включает образование новой ПМ, клеточной стенки и начало вакуолизации. Наиболее существенным регуляторным фактором процесса является транспорт воды в вегетативную клетку. Пыльца сохраняет жизнеспособность благодаря способности приспосабливать тургорное давление к изменениям внешней среды и наличию молекулярных механизмов, которые помогают поддерживать водный статус пыльцы. Однако существование таких гомеостатических механизмов, которые позволили бы ПЗ регулировать их тургорное давление, концентрации осмолитов и тем самым трансмембранные потоки воды, пока не установлено.

Попытки выяснить структурные и молекулярные механизмы осморегуляции мужского гамето-

фита в последнее время активизировались. Так, над порой ПЗ обнаружена временная структура, состоящая из полисахаридов и белков, регулирующая, по мнению авторов, вход воды в ПЗ на начальном этапе гидратации (Danti et al., 2011). У *Arabidopsis thaliana* во время гидратации ПЗ идентифицирована интиноподобная структура, обес-

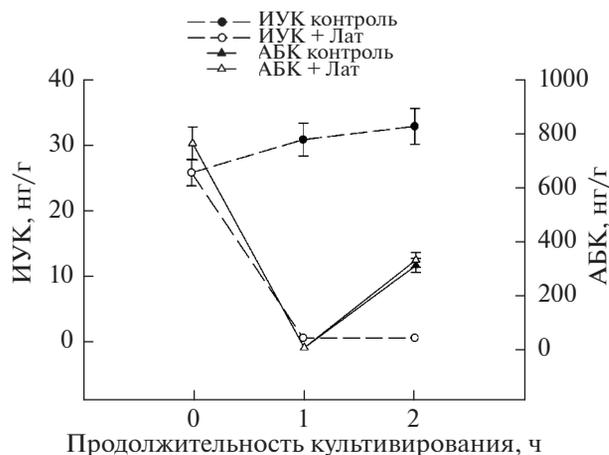


Рис. 7. Динамика содержания ИУК и АБК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите петунии на двух средах: 0.3 М сахара + 1.6 мМ Н₃ВО₃ (–Лат); 0.3 М сахара + 1.6 мМ Н₃ВО₃ + 0.2 нМ латрункуллин В (+Лат). Опыты проводили в трех–пяти биологических и трех аналитических повторностях. Данные представляют средние арифметические и их стандартные отклонения из 3 независимых опытов.

печивающая продвижение цитоплазмы в формирующуюся ПТ и ген *BURSTING POLLEN (BUP)*, контролирующей выход кончика ПТ (Hoedemaekers et al., 2014).

В данной работе изучали потенциальную роль в гидратации ПЗ и прорастании ПТ петунии двух гормонов, АБК, тесно связанной с водным стрессом, и ауксина (ИУК), которому отводится центральная роль в развитии репродуктивных органов и который осуществляет свою функцию через интеграцию процессов биосинтеза, транспорта и сигналинга, а также взаимодействий с сигнальными путями других гормонов.

В ходе исследований, направленных на выяснение механизмов гормональной регуляции прорастания мужского гаметофита, установлено, что фитогормоны стимулируют транспорт ионов H^+ и K^+ через ПМ прорастающего ПЗ и что в трансдукцию гормональных сигналов в этой системе способны включаться АФК. Выявлены две возможные мишени действия фитогормонов, предположительно участвующие в гормон-индуцируемой осморегуляции ПТ: K^+ -каналы и H^+ -АТФаза ПМ, протонный насос, ответственный за генерацию на ней мембранного потенциала.

Полученные результаты о роли ионов K^+ в гормональном контроле движущих сил транспорта воды в прорастающем мужском гаметофите позволили нам сформулировать гипотезу, объясняющую возможную роль фитогормонов в этом процессе, основанную на активации ими K^+ -каналов, функционирующих, как известно, в ПМ ПТ. В частности, показано, что активность SPIK канала, основного K^+ -канала в пыльце, усиливается при падении внешнего рН, AtTRK4 модулируется Ca^{2+} , а активность АКТ6 (SPIK1) чувствительна к изменениям внешнего рН, но не к изменениям уровня Ca^{2+} (Becker et al., 2004). У арабидопсиса две Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (СРК11 и СРК24) включаются в Ca^{2+} -зависимое ингибирование K^+ -каналов в ПТ (Zhao et al., 2013). На основе полученных нами и литературных данных мы полагаем, что в ПТ петунии могут функционировать как Ca^{2+} -зависимые, так и рН-зависимые K^+ -каналы.

Вывод о том, что гормон-индуцируемая стимуляция активности H^+ -АТФазы ПМ, транспортирующей H^+ из цитозоля во внеклеточное пространство, включается в стимуляцию прорастания ПТ, подтверждается ортованадат-чувствительной гиперполяризацией ПМ в присутствии ИУК и АБК. Полученные данные находятся в полном соответствии с гипотезой Ланга (Lang et al., 2014) о центральной роли H^+ -АТФазы в регуляции роста ПТ. Второй выявленный нами эффект фитогормонов, связанный с латеральным перераспределением локализации H^+ -АТФазы в ПМ, очевидно

должен вносить существенный вклад в поляризацию растущей ПТ (Cortal et al., 2008).

В настоящее время трудно ответить на вопрос, как связаны между собой все гормональные эффекты, можно только предположить, что Ca^{2+} как вторичный мессенджер в сигнальных путях гормонов, может быть центральным модулятором функционирования этих путей. Согласно последним исследованиям, Ca^{2+} является основным организатором клеточной поляриности в растениях (Himschoot et al., 2015). Полагаем, что в растущих ПТ Ca^{2+} может медиировать эффекты гормонов, связанные с интенсификацией активности ПМ H^+ -АТФазы, ее полярной локализацией в ПМ ПТ и организацией АЦ. Эта возможность согласуется с включением ионов Ca^{2+} как вторичного мессенджера в различные гормон-зависимые процессы, включая активацию H^+ -АТФазы ПМ путем фосфорилирования, катализируемого Са-зависимой протеинкиназой (Yu et al., 2006). Кроме того, известно, что Ca^{2+} включается в различные аспекты функционирования АЦ. В частности, градиент кальция в цитозоле необходим для регуляции экзоцитоза в растущей ПТ, а ионы Ca^{2+} включаются в модуляцию активности ROP1 ГТФазы (Yan et al., 2009). Сборка актинового цитоскелета и аккумуляция кальция в цитозоле способны выступать в роли факторов, способствующих регуляции ROP1 через позитивную и негативную обратные связи, соответственно. АФ локализованы в ПТ по градиенту, пересекающемуся с градиентом Ca^{2+} (Fan et al., 2004), что может быть обусловлено Ca^{2+} -зависимостью АСБ, которые контролируют растяжение и других типов клеток (Wei Huang et al., 2015). Обращает на себя то обстоятельство, что только в случае ауксина все наблюдаемые гормон-индуцируемые ответы ПТ могут быть интегрированы в общий механизм, в котором ионы Ca^{2+} могут выступать в роли координирующего и интегрирующего сигнала. Следовательно, можно полагать, что ауксин играет ключевую роль в поддержании полярного роста ПТ.

Транспорт ауксина зависит от градиентов переносчиков, которые постоянно циркулируют между ПМ и внутриклеточными компартментами. Этот процесс, как полагают, зависит от АФ, в то время как организация актина находится под контролем ауксина (Nick et al., 2009). Ингибирование транспорта ауксина повреждает организацию актина в зиготах у *Fucus* (Sun et al., 2004). Полярный транспорт ауксина представляет существенный фактор для развития зиготы и эмбриона и связан с активностью АВР1 и H^+ -АТФазы ПМ (Chen et al., 2010). Недавно было показано, что трансмембранная рецептор-подобная киназа (ТМК), может взаимодействовать с АВР1, тем самым преобразовывая ауксиновый сигнал

для активации ROPs на ПМ. Эта цепь событий приводит к изменениям в цитоскелете и форме клеток листа *Arabidopsis* (Xu et al., 2014). Кроме того, получены данные о координации ROP-сигналинга и PIN-транспортёров ауксина в клетках корня и листа (Chen and Friml, 2014). Экспрессия в мужском гаметофите PIN8 и включение его в регуляцию внутриклеточного гомеостаза ауксина также подтверждает участие ауксина в регуляции полярного роста ПТ (Dal Bosco et al., 2012).

По-видимому, ауксин совместно с цитокинином участвуют в регуляции АЦ в растущей ПТ, влияя на полимеризацию актина (Ковалева и др., 2015). Полученные в данной работе результаты дают основание полагать, что ауксин включается в поддержание полярного роста ПТ, взаимодействуя с АБК. Эти взаимодействия могут быть реализованы согласно гипотезе (Hsu et al., 2010) о функционировании в пыльнике лилии особого, связанного с дегидратацией, сигнального пути АБК, через который регулируется ген *LLP-Rop1* в процессе дегидратации пыльцы. Показано, что продукт гена *LLP-ROP1* локализован в цитоплазме ПТ и является позитивным (Tao et al., 2005) и негативным (Xin et al., 2005) регулятором сигнальных путей ауксина и АБК, соответственно. При этом в прорастающих ПТ наблюдали снижение эндогенной АБК и повышение активности Rop. Недавно сообщили (Nibau et al., 2013), что у *Arabidopsis* малая ГТФаза *AtRAC7/ROP9* (*Arabidopsis* RAC/ROP) функционирует как модулятор сигналинга ауксина и АБК. Принимая во внимание роль H^+ -АТФазы на стадии дегидратации, когда ПЗ приспосабливают свое тургорное давление к водному потенциалу поверхности рыльца (Pertl et al., 2010), и наши данные об аллокации H^+ -АТФазы ПМ и динамике эндогенной АБК (повышении уровня при созревании ПЗ и снижении в растущей ПТ), мы полагаем, что АБК, совместно с ИУК, участвует в поддержании водного статуса в ПТ. Выявленные различия в действии экзогенных АБК и ИУК на прорастание ПТ и выявленные гормон-индуцированные сдвиги pH_c (АБК-индуцированное закисление) являются основанием для предположения о функционировании в ПТ петунии pH -зависимого K^+ -канала. По данным Ли (Li et al., 2011), градиент pH_c может играть роль в модуляции интенсивности сигнала АБК. Вилкинс с соавторами (Wilkins et al., 2015) показали, что закисление pH_c в ПТ играет важную роль, создавая оптимальные условия для стимуляции активности каспаз 3-подобной DEVDазы, а также для сборки F-актина, меняя локализацию и активность, по крайней мере, двух АСБ—ADF и CAP.

Работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 10-04-00356 и № 13-04-00592).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Минкина Ю.В. и др. Изменения внутриклеточного pH пыльцевых зерен *Petunia hybrida* под действием экзогенных фитогормонов // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 707–714.
- Брейгина М.А., Матвеева Н.П., Андреюк Д.С. и др. Трансмембранный перенос K^+ и Cl^- в процессе активации пыльцевого зерна *in vivo* и *in vitro* // Онтогенез. 2012. Т. 43. С. 103–112.
- Воронков А.С., Андреев И.М., Тимофеева Г.В. и др. Стимуляция электрогенной активности H^+ -АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита петунии экзогенным ауксином: медиаторная роль кальция и активных форм кислорода // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 425–432.
- Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Минкина Ю.В. и др. Прорастание и рост *in vitro* мужского гаметофита петунии чувствительны к действию экзогенных гормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 584–590.
- Ковалева Л.В., Воронков А.С., Захарова Е.В. Роль ауксина и цитокинина в регуляции актинового цитоскелета в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите петунии // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 195–203.
- Матвеева Н.П., Войцек О.О., Андреюк Д.С. и др. Роль H^+ -АТФазы и альтернативной величины внутриклеточного pH на разных стадиях развития мужского гаметофита табака // Онтогенез. 2002. Т. 33. С. 436–443.
- Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П. и др. Изменения содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // Агробиохимия. 1999. Т. 8. С. 49–53.
- Смирнова А.В., Матвеева Н.П., Полесская О.Г. и др. Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна // Онтогенез 2009. Т. 40. С. 425–434.
- Becker D., Geiger D., Dunkel M. et al. AtTRPK4, an Arabidopsis tandem-pore K^+ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH - and Ca^{2+} -dependent manner // PNAS. 2004. V. 101. P. 15621–15626.
- Bright J., Hiscock S.J., James P.E. et al. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 49–55.
- Cecchetti V., Altamura M.M., Falasca G. et al. Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 1760–1774.
- Certal A.C., Almeida R.B., Carvalho L.M. et al. Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 614–634.
- Chen D., Ren Y., Deng Y. et al. Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H^+ -ATPase activities // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 1853–1867.

- Chen X., Friml J. Rho-GTPase-regulated vesicle trafficking in plant cell polarity // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. P. 212–218.
- Danti R., Della Rocca G., Calamassi R. et al. Insights into a hydration regulating system in Cupressus pollen grains // *Ann. Botany.* 2011. V. 108. P. 299–306.
- Dal Bosco C., Dovzhenko A., Palme K. Intracellular auxin transport in pollen: PIN8, PIN5 and PILS5 // *Plant Signal Behav.* 2012. V. 7. P. 1504–1505.
- Dekkers B.J., Schuurmans J.A., Smeekens S.C. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis // *Plant Mol. Biol.* 2008. V. 67. P. 151–167.
- Fan X., Hou J., Chen X. Identification and characterization of a Ca²⁺-dependent actin filament-severing protein from lily pollen // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 3979–3989.
- Feijo J.A., Malho R., Obermeyer G. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth // *Protoplasma.* 1995. V. 187. P. 155–167.
- Feng X.L., Ni W.M., Elge S. et al. Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 61. P. 215–226.
- Firon N., Nepi M., Pacini E. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning // *Ann. Botany.* 2012. V. 109. P. 1201–12014.
- Gu Y., Fu Y., Dowd P. et al. A Rho family GTPase control actin dynamics and tip growth via counteracting downstream pathways in pollen tubes // *J. Cell Biol.* 2005. V. 169. P. 127–138.
- Himschoot E., Beeckman T., Friml J. et al. Calcium is an organizer of cell polarity in plants // *Biochemica et Biophysica Acta.* 2015. (in press).
- Hoedemaekers K., Derksen J., Hoogstrate S.W. et al. BURSTING POLLEN is required to organize the pollen germination plaque and pollen tube tip in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* 2014. doi: 10.1111/nph.13200
- Hsu S.W., Cheng C.L., Tzen T.C. et al. Rop GTPase and its target Cdc42/Rac-interactive-binding motif-containing protein genes respond to desiccation during pollen maturation // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 1197–1209.
- Ji X., Dong B., Shiran B. et al. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 647–662.
- Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. // *Sex Plant Reprod.* 2003. V. 16. P. 191–196.
- Lang V., Pertl-Obermeyer H., Safirarian M.J. et al. Pump up the volume – a central role for the plasma membrane H(+) pump in pollen germination and tube growth // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 477–488.
- Li B., Feng Z., Xie M. et al. Modulation of the root-sourced ABA signal along its way to the shoot in *Vitis riparia* × *Vitis labrusca* under water deficit // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 1731–1741.
- Malhó R., Liu Q., Monteiro D. Signalling pathways in pollen germination and tube growth // *Protoplasma.* 2006. V. 228. P. 21–30.
- Nibau C., Tao L., Levasseur K. The Arabidopsis small GTPase AtRAC7/ROP9 is a modulator of auxin and abscisic acid signaling // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 3425–3437.
- Nick P., Han M.-J., An G. Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 155–167.
- Joo J.H., Bae Y.S., Lee J.S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 1055–1060.
- Pertl H., Pockl M., Blaschke C. et al. Osmoregulation in Lilium pollen grains occurs via modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity by 14-3-3 proteins // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. P. 1921–1928.
- Potocký M., Jones M.A., Bezvoda R. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth // *New Phytol.* 2007. V. 174. P. 742–751.
- Qu X., Jiang Y., Chang M. et al. Organization and regulation of the actin cytoskeleton in the pollen tube // *Front Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 786.
- Rehman S., Yun S.J. Developmental regulation of K accumulation in pollen, anthers, and papillae: are anther dehiscence, papillae hydration, and pollen swelling leading to pollination and fertilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) regulated by changes in K concentration? // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1315–1321.
- Safirarian M.J., Pertl-Obermeyer H., Lughofer P. et al. Lost in traffic? The K⁺ channel of lily pollen, LilKT1, is detected at the endomembranes inside yeast cells, tobacco leaves, and lily pollen // *Front Plant Sci.* 2015. 6: Article 47. doi: 10.3389/fpls.2015.00047
- Sakata T., Oshino T., Miura S. et al. Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 8569–8574.
- Sharma T., Dreyer I., Riedelsberger J. The role of K⁺-channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana* // *Front Plant Sci.* 2013. 4: Article 224. doi: 10.3389/fpls.2013.00224
- Staiger C.J., Poulter N.S., Henty J.L. et al. Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 1969–1986.
- Sun H., Basu S., Brady S.R. et al. Interactions between auxin transport and actin cytoskeleton in developmental polarity of *Fucus distichus* embryos in response to light and gravity // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 266–278.
- Sundberg E., Østergaard L. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2009. V. 1 (6). a001628. Epub 2009 Oct 14. doi: 10.1101/cshperspect.a001628
- Tao L.Z., Cheung A.Y., Nibau C. et al. RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 2369–2383.
- The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies / Eds. Johnson I., Spence M.T.Z. USA: Life Technology Corporation, 2010. 1090 p.
- Vidali L., McKenna S.T., Hepler P.K. Actin polymerization is essential for pollen tube growth // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 2534–2545.

- Wang L., Liu Y.-M. Comparison of F-actin fluorescent labeling method in pollen tubes of *Lilium davidii* // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. P. 266–270.
- Weihuang Y., Chang S.J., Harn H.I. et al. Mechanosensitive store-operated calcium entry regulates the formation of cell polarity // J. Cell Physiol. 2015. doi: 10.1002/jcp.24936
- Wilkins K.A., Bosch M., Haque T. et al. Self-incompatibility-induced programmed cell death in field poppy pollen involves dramatic acidification of the incompatible pollen tube cytosol // Plant Physiol. 2015. V. 167. P. 766–779.
- Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T. et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport // Plant Cell Physiol. 2010. V. 51. P. 1821–1839.
- Xin Z., Zhao Y., Zheng Z.L. Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in Arabidopsis // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 1350–1365.
- Xu T., Dai N., Chen J. et al. Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling // Science. 2014. V. 343. P. 1025–1028.
- Yan A., Xu G., Yang Z.B. Calcium participates in feedback regulation of the oscillating ROP1 Rho GTPase in pollen tubes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 22002–22007.
- Yu X.C., Li M.J., Gao G.F. et al. Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 558–579.
- Zhao L.-N., Shen L.-K., Zhang W.-Z. et al. Ca²⁺-dependent protein kinase 11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in Arabidopsis pollen tube // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 649–661.

Exogenous IAA and ABA Stimulate Germination of Petunia Male Gametophyte by Activating Ca²⁺-dependent K⁺-channels and by Modulating the Activity of Plasmalemma H⁺-atpase and Actin Cytoskeleton

L. V. Kovaleva, A. S. Voronkov, E. V. Zakharova, Yu. V. Minkina, G. V. Timofeeva, and I. M. Andreev

*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya st., 35, Moscow-127276*

*Russian State Agrarian University—Moscow Agricultural Academy named by Timiryazev,
Timiryazev st. 49, Moscow-127550*

e-mail: kovaleva_l@mail.ru

Received August 13, 2015; in final form, December 10, 2015

Abstract—To date, the molecular mechanisms underlying the osmoregulation of pollen grains (PGs) related to the maintenance of their water status and allowing pollen tubes (PTs) to regulate concentrations in them of osmolytes and transmembrane water transport remain to be not so far characterized. In the present work, the data on the participation of IAA and ABA in the osmoregulation of germinating *in vitro* petunia male gametophyte were obtained. It has been established that the growth-stimulating effect of these phytohormones is due to their action on intracellular pH (pH_c), the membrane potential of plasmalemma (PM), the activity of PM H⁺-ATPase, K⁺-channels in the same membrane and organization of actin cytoskeleton (AC). Two possible targets of the action of these compounds are revealed. These are represented by (1) PM H⁺-ATPase, electrogenic proton pump responsible for polarization of this membrane, and (2) Ca²⁺-dependent K⁺-channels. The findings of the present work suggest that the hormone-induced pH_c shift is involved in cascade of the events including the functioning of pH-dependent K⁺-channels. It was shown that the hormone-induced hyperpolarization of the PM is a result of stimulation of electrogenic activity of PM H⁺-ATPase and the hormonal effects are mediated by transient elevation in the level of free Ca²⁺ in the cytosol and generation of reactive oxygen species (ROS). The results on the role of K⁺ ions in the control of water-driving forces for transmembrane water transport allowed us to formulate the hypothesis that IAA and ABA stimulate germination of PGs and growth of PTs by activating K⁺-channels. In addition, the studies performed showed that the AC of male gametophyte is sensitive to the action of exogenous phytohormones, with to more extent to the action of IAA. As judged by the action of latrunculin B (LB) the AC may serve as the determinant of the level of endogenous phytohormones that most likely participate in the regulation of the polar growth of PTs impacting on the pool of F-actin in their apical and subapical zones.

Keywords: male gametophyte, germination, IAA, ABA, H⁺-ATPase, pH_c, actin cytoskeleton, K⁺-channels, ROS