

АУКСИН СНИМАЕТ ИНГИБИТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ 1-МЕТИЛЦИКЛОПРОПЕНА И АМИНООКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН, РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК И СИНТЕЗ АЦК У ПЕТУНИИ

© 2017 г. Л. В. Ковалева^{a, *}, Е. В. Захарова^b, А. С. Воронков^a, Г. В. Тимофеева^a

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

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

*E-mail: kovaleva_l@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2016 г.

Окончательный вариант получен 26.10.2016 г.

Этилен, как было установлено нами ранее, является регулятором прорастания, развития и роста мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения, однако механизмы регуляции этих процессов остаются неисследованными. Считается, что основным фактором, обеспечивающим многообразие ответов этилена, является его взаимодействие с другими гормонами. Согласно нашей рабочей гипотезе, этилен контролирует прорастание пыльцевых зерен (ПЗ) и рост пыльцевых трубок (ПТ), взаимодействуя с ауксином, который, как показывают имеющиеся данные, возможно, является ключевым регулятором клеточной поляризации и морфогенеза, и одним из факторов, модулирующих биосинтез этилена на уровне экспрессии генов АЦК-синтазы. В настоящей работе на прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и системе пыльца-рыльце петунии (*Petunia hybrida* L.) исследованы эффекты модуляции прорастания ПЗ, роста ПТ и синтеза АЦК с использованием фитогормонов (этилена и ИУК), а также известных блокаторов, подавляющих рецепцию этилена, 1-метилциклопропена (1-МСП), синтез АЦК, аминоксиуксусной кислоты (АОК), и транспорт ИУК, триодбензойной кислоты (ТИБК). Согласно полученным данным экзогенные этилен и ИУК стимулировали прорастание ПЗ и рост ПТ, 1-МСП и ТИБК полностью ингибировали прорастание ПЗ, в то время как ИУК снимала ингибиторное действие на прорастание ПЗ и рост ПТ как 1-МСП, так и АОК, а этрел частично снимал ингибиторный эффект ТИБК. Изучение модуляции синтеза АЦК с помощью АОК показало, что ИУК не влияет на уровень АЦК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и неопыленных рыльцах, тогда как в системе пыльца-рыльце ИУК значительно повышала уровень АЦК и снимала ингибиторный эффект АОК на синтез АЦК. Опыление рылец пылью, предварительно обработанной 1-МСП, приводило к 2.5-кратному снижению скорости роста ПТ и уровня АЦК. Вместе с тем ИУК снимала ингибиторное действие 1-МСП, восстанавливая синтез АЦК и рост ПТ до контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют о взаимодействии путей трансдукции сигналов этилена и ауксина на уровне АЦК в ходе прорастания и роста мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения.

Ключевые слова: *Petunia hybrida*; мужской гаметофит; прорастание; рост; этилен; АЦК-1-МСП; АОК; ИУК

DOI: 10.7868/S0475145017020057

ВВЕДЕНИЕ

Этилен участвует в регуляции репродуктивно-го процесса растений, от закладки цветочных почек до созревания плодов (Woltering et al., 1995; Bleecker, Kende, 2000; Stepanova, Alonso, 2009; Lin et al., 2009; van Doorn, Kamdee, 2014). Получен-

ные к настоящему времени результаты исследований (Hoekstra, Weges, 1986; O'Neill et al., 1993; Singh et al., 1992; Weterings et al., 2002; Holden et al., 2003; Kovaleva et al., 2003, 2011a, 2011b, 2013) дали основание полагать, что индуцированное опылением образование и выделение этилена тканями пестика является фактором, необходимым для прорастания пыльцевых зерен (ПЗ), роста пыльцевых трубок (ПТ) и успешного оплодотворения и обеспечивает координацию процессов, обеспечивающих дальнейшее развитие всех органов

Сокращения: АОК – аминоксиуксусная кислота; 1-МСП – 1-метилциклопропен; ИУК – индолилуксусная кислота; АЦК – 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота; ТИБК – триодбензойная кислота.

цветка. Однако природа сигнальных факторов, инициирующих синтез этилена в рыльце пестика при опылении, до сих пор не установлена.

Синтез этилена из аминокислоты метионина включает в себя образование двух интермедиатов, S-аденозилметионина (SAM) и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) (Adams and Yang, 1979), причем превращение SAM в АЦК катализируется АЦК-синтазой (Yang and Hoffman, 1984). Регуляция транскрипции генов АЦК-синтазы, по-видимому, является ключевым механизмом контроля образования этилена в растениях.

Большая группа внутренних и внешних сигналов (ауксин, цитокинин, брассиностероиды, этилен, озон, патогены) модулирует биосинтез этилена, действуя на уровне экспрессии генов АЦК-синтазы.

На нескольких модельных системах показано, что АЦК-синтаза кодируется семейством генов, регуляция экспрессии которых тканеспецифична и происходит на транскрипционном уровне в процессе роста и развития растений. В частности, на орхидее (*Phalaenopsis* spp.) установлено, что опыление запускает межорганную регуляцию генов биосинтеза этилена, что включает в себя координированную экспрессию трех генов АЦК-синтазы. Один из них (*Phal-ACS1*) регулирует межорганное передвижение сигнала опыления, тогда как экспрессия двух других происходит в рыльце (*Phal-ACS2*) и завязи (*Phal-ACS3*) опыленных цветков (O'Neill et al., 1993; Bui and O'Neill, 1998). Полученные данные позволили авторам предположить, что именно предшественник этилена АЦК, а не сам гормон, передвигается по органам цветка и может функционировать в качестве вторичного сигнала, координирующего последующее развитие органов цветка после опыления.

АЦК занимает ключевую позицию во многих физиологических процессах, поскольку может легко транспортироваться на короткие и длинные расстояния. Ее уровни регулируются образованием АЦК-конъюгатов, малонил-АЦК (МАСС), глутамил-АСС (ГАСС) и жасмонил-АЦК (ЖА-АСС), которые включаются в модуляцию пула АЦК в процессе биосинтеза этилена (van de Poel Bram, van der Straeten, 2014) и тем самым обуславливают сложную регуляцию его формирования. В настоящее время развиваются представления об АЦК, как о сигнальной молекуле в процессах роста и развития растений, и наличии пересечения или взаимодействия сигнальных путей биосинтеза этилена с другими сигнальными путями (van de Poel Bram, van der Straeten, 2014; Yoon, Kieber, 2013; Yoon, 2015). На основе собственных и литературных данных мы предположили, что этилен регулирует прорастание и рост мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения, взаимодействуя на уровне АЦК с ауксином, одним из индукторов, модули-

рующих биосинтез этилена и действующих на уровне экспрессии генов АЦК-синтазы. В настоящей работе мы попытались протестировать справедливость этой гипотезы.

Ранее в ходе исследований гормональной регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии мы показали, что этилен способен выступать в роли регулятора гаметофитно – спорофитных взаимодействий (Ковалева и др., 2013). Установлено, что происходящие в прогамной фазе оплодотворения взаимодействия мужского гаметофита со спорофитными тканями рыльца и столбика сопряжены со значительным ростом содержания предшественника этилена, АЦК, и образования этилена в пестике и установлена связь этой динамики с репродуктивной стратегией клонов петунии (Kovaleva et al., 2011; Ковалева и др., 2014).

Ауксин контролирует различные процессы роста и развития как в спорофитных, так и гаметофитных тканях растений, в том числе принимает участие в регуляции прорастания ПЗ и роста ПТ (Kovaleva, Zakharova, 2003). Недавно установлено, что стимулирующий эффект ИУК на рост мужского гаметофита петунии обусловлен ее действием на ключевые детерминанты поляризации ПТ в ходе этого процесса, а именно электрогенную активность H^+ -АТФазы плазмалеммы (Воронков и др., 2010) и актиновый цитоскелет (Ковалева и др., 2015). В частности показано, что существенное снижение скорости роста ПТ на среде с латрункулином Б обусловлено нарушением функционирования в них актинового цитоскелета и падением уровня эндогенной ИУК. Эти данные послужили основанием для предположения о том, что ИУК включается в регуляцию полярного роста ПТ. Наши данные согласуются с появившимися в последнее время представлениями об ауксине как триггере или ключевом регуляторе клеточной поляризации и морфогенеза (Pan et al., 2015). ИУК (индолил-3-ксусная кислота), преобладающая форма ауксина, является единственным фитогормоном, который характеризуется полярным транспортом от клетки к клетке.

В данной работе на прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и системе пыльца-рыльце петунии (*Petunia hybrida* L.) исследовано модулирующее действие ряда соединений на прорастание ПЗ, рост ПТ и синтез в них АЦК. Эти соединения включали в себя фитогормоны (этилен и ИУК) и блокаторы, подавляющие рецепцию этилена (1-метилциклопропен, 1-МСП), синтез АЦК (аминоксиуксусная кислота, АОК) и транспорт ИУК (трийодбензойная кислота, ТИБК). Полученные результаты позволили сделать заключение, что этилен регулирует прорастание и рост мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения, взаимодействуя с ИУК на уровне АЦК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Вегетативно размноженные растения петунии (*Petunia hybrida* L.) выращивали в почвенной культуре при естественном освещении в оранжерее.

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 . В сосудик объемом 15 мл помещали 2 мг пыльцы, 2 мл среды культивирования, 5 мкМ ИУК, АОК (10 мМ), этрел (конечное разведение 1 : 100000) или ТИБК (1 мкМ). В вариантах АОК + ИУК, ТИБК + этрел, использовали выше названные концентрации.

1-МСП получали по методу Сислера (Sisler, Serek, 1997). В пузырек помещали 2 мг пыльцы и закрывали пробкой, после чего с помощью шприца в пузырек вводили необходимое количество 1-МСП (50 нл/л), а через 1 или 3 ч тем же образом вводили 2 мл среды. Инкубацию проводили в термостате при 25–26°C, отбирая пробы через каждый час.

О степени прорастания ПЗ и роста ПТ судили по количеству ПЗ, произвольно отобранных и наблюдаемых в 10 полях ($n = 200$) микроскопа Axio Imedger D1 с камерой Axio Cam MRC. Морфометрию ПТ выполняли используя программу Axio Vizion 4.5 (Carl Zeiss, Германия).

Определение длины ПТ, растущих в пестиках. Пестики фиксировали 20%-ным спиртовым раствором КОН в течение 20–40 мин, дважды промывали дистиллированной водой и окрашивали 0.01% раствором анилинового голубого. Через 30–40 мин пестики переносили на предметное стекло в каплю 50% глицерина с водой, накрывали покровным стеклом для создания давленого препарата. Готовые препараты наблюдали под микроскопом Zeiss Axio-plan (возбуждение 475/40 нм, эмиссия 530/50).

Обработка системы пыльца-рыльце ИУК и АОК. Рыльца кастрированных накануне цветков (10 бутонов на один вариант) перед опылением обрабатывали с помощью шприца растворами (1) 5 мкМ ИУК, (2) АОК (10 мМ), или (3) АОК + ИУК. Растворы готовили на 0.1% Tween 20. На рыльца наносили по 5 мкл раствора каждого компонента, повторяя каждую обработку дважды (с интервалом в 2 ч). Еще через 2 ч рыльца опыляли пыльцой (2–3 мг на рыльце) из раскрытых цветков того же клона. Опыленные пестики собирали через 0, 0.5, 1, 1.5 и 2 ч, фиксировали в жидком азоте и хранили при –70°C для определения содержания АЦК.

Выделение этилена определяли методом газовой хроматографии (Ракитин, Ракитин, 1986). 20 мг пыльцы + 2 мл питательной среды помещали во флаконы объемом 15 мл, герметично закрывали резиновыми пробками (Septa, Red Rubber,

O.D. 13 мм, Aldrich, США) и инкубировали в темноте при 26°C в термостате ТСН 100 (Laboratori Pristole, Praha) не более 30 мин до начала анализа. Весь воздух из флакона использовали для определения содержания этилена на газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и концентрирующей системой для углеводов, позволяющей в десятки раз повысить чувствительность прибора.

Определение содержания АЦК проводили по методу Лизада и Янга (Lizada, Yang, 1979) с модификациями. Навески образцов (опыленных пестиков или рылец) гомогенизировали с 1.5 мл 0.2 М ТХУ пестиком в фарфоровой ступке, фильтровали через стекломикроволоконный фильтр (Whatman, GF/C, Ø пор ≤ 1 мкм) во флакон объемом 15 мл. Ступку с пестиком омывали 0.6 мл дистиллированной воды, отфильтровывая ее в тот же самый флакон, уже содержащий фильтрат. Далее во флакон добавляли 0.01 М $HgCl_2$, герметично закрывали его резиновой пробкой, через которую шприцем вводили 0.2 мл охлажденной смеси гипохлорита натрия (5.25%) и насыщенного раствора NaOH (2 : 1). Все операции проводили при 4°C. Этилен, образующийся из АЦК, определяли на газовом хроматографе. В прорастающей *in vitro* пыльце АЦК определяли отдельно в пыльце и в среде культивирования. Пыльцу отделяли от среды культивирования фильтрованием через стекломикроволоконный фильтр, собирая последнюю в 15-мл флакон, и определяли в ней АЦК, как описано выше. Оставшуюся после фильтрования пыльцу гомогенизировали вместе с фильтром в 1.5 мл 0.2 М ТХУ пестиком в фарфоровой ступке и далее повторно фильтровали. В полученном фильтрате определяли АЦК, как описано выше.

Определение эндогенного содержания ИУК. Содержание ИУК определяли в прорастающей *in vitro* пыльце петунии. Пыльцу отделяли от среды культивирования на бумажном фильтре. Фиксацию материала проводили согласно методике Скоробогатовой и др. (1999). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ. Хроматографические условия: 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.

Статистика. Опыты проводили в трех–пяти биологических и трех аналитических повторностях. Достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента при степени свободы 0.05. На рисунках приведены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффекты этилена и ИУК на in vitro прорастание и рост мужского гаметофита петунии

Сразу после начала культивирования прорастающая пыльца петунии интенсивно выделяет этилен, причем продукция гормона достигает максимума через 1 ч, после чего наблюдается десятикратное снижение интенсивности этого процесса (рис. 1а). В то же время содержание ИУК в прорастающем мужском гаметофите оставалось на уровне 25–30 нг/г в течение 2 ч культивирования (рис. 1в).

Экзогенные этилен и ИУК стимулировали прорастание ПЗ (рис. 2а) и рост ПТ (рис. 2б). При этом, если прорастание ПЗ этрел стимулировал лишь на 10%, а ИУК на 25%, то гормон-индуцированная стимуляция роста ПТ была более значительная. ИУК стимулировала рост ПТ на 60%, тогда как этрел обнаруживал меньший эффект (длина ПТ увеличивалась на 50%).

Нарушение действия этилена путем обработки пыльцы 1-МСР, ингибитором его функционирования, в течение 1 ч приводило к полному подавлению прорастания ПЗ и роста ПТ (рис. 2а, 2б), тогда как ИУК снимала ингибиторное действие 1-МСР как на прорастание ПЗ (восстанавливая 60% ПЗ), так и на рост ПТ (снижая ингибиторный эффект 1-МСР со 100 до 25%) (рис. 2а, 2б).

АОК, ингибитор синтеза АЦК, внесенную вместе с пыльцой в среду культивирования, ингибировала на 50% прорастание ПЗ (рис. 2а) и на 30% тормозила рост ПТ (рис. 2б). Совместное внесение ИУК с АОК снимало ингибиторный эффект АОК и восстанавливало как интенсивность прорастания ПЗ до 94%, так и рост ПТ (длина ПТ почти достигала уровня длины контрольных трубок).

Присутствие в среде культивирования ТИБК, ингибитора транспорта ИУК, полностью ингибировало прорастание ПЗ. Этот эффект частично снимался в присутствии этрела (прорастание ПЗ и рост ПТ восстанавливались на 20–25% (рис. 2а, 2б).

Таким образом, ИУК снимала ингибиторное действие на прорастание ПЗ и рост ПТ как 1-МСР, блокатора рецепторов этилена, так и АОК, ингибитора синтеза АЦК, в то время как этрел частично снимал ингибиторный эффект ТИБК.

Синтез АЦК в in vitro прорастающем мужском гаметофите не чувствителен к действию ИУК

Как было показано нами ранее, процесс развития фертильного мужского гаметофита петунии сопровождается двумя периодами интенсификации содержания АЦК в тканях развивающегося пыльника: первый происходит во время развития микроспор, второй – при созревании ПЗ (Доброволь-

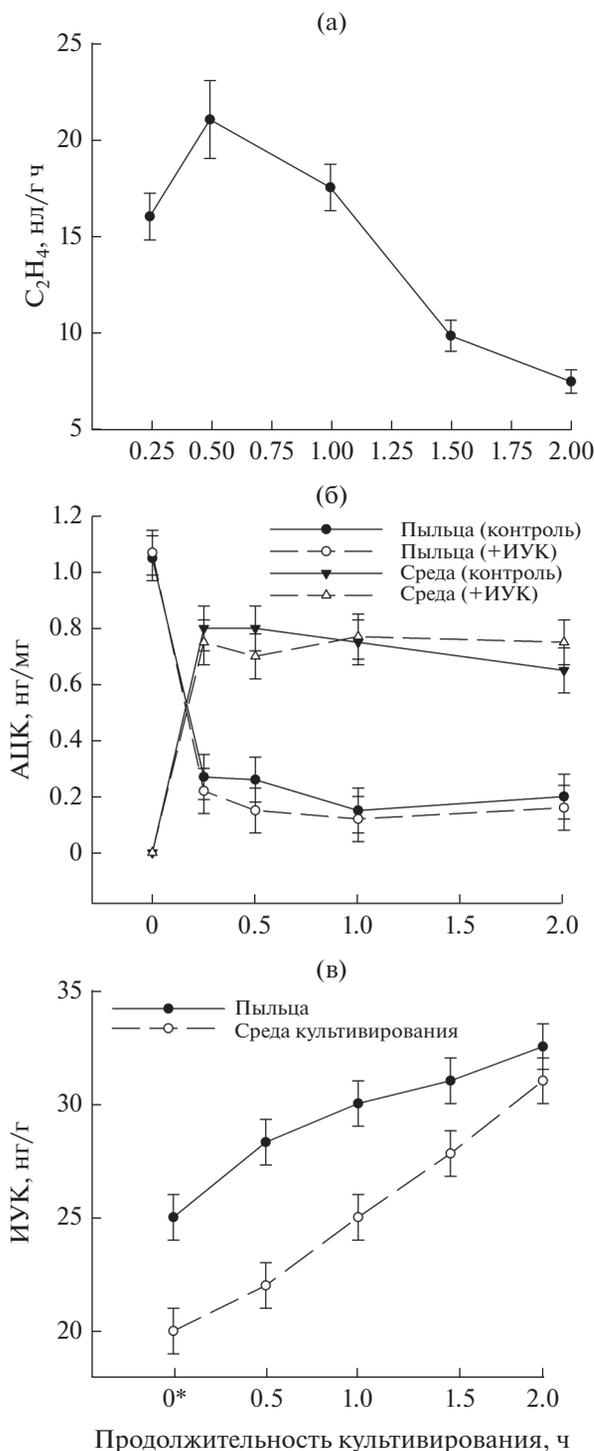


Рис. 1. Динамика выделения этилена (а), содержания АЦК (б) и ИУК (в) *in vitro* прорастающем мужском гаметофите петунии и выделенные пыльцой в среду культивирования. * – точка “0” взята после 3-х минутного смачивания пыльцы средой культивирования.

ская и др., 2009). Зрелая пыльца содержит АЦК от 10 до 20 нг/ мг сырой массы.

Как следует из рис. 1б, в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите петунии содержание АЦК

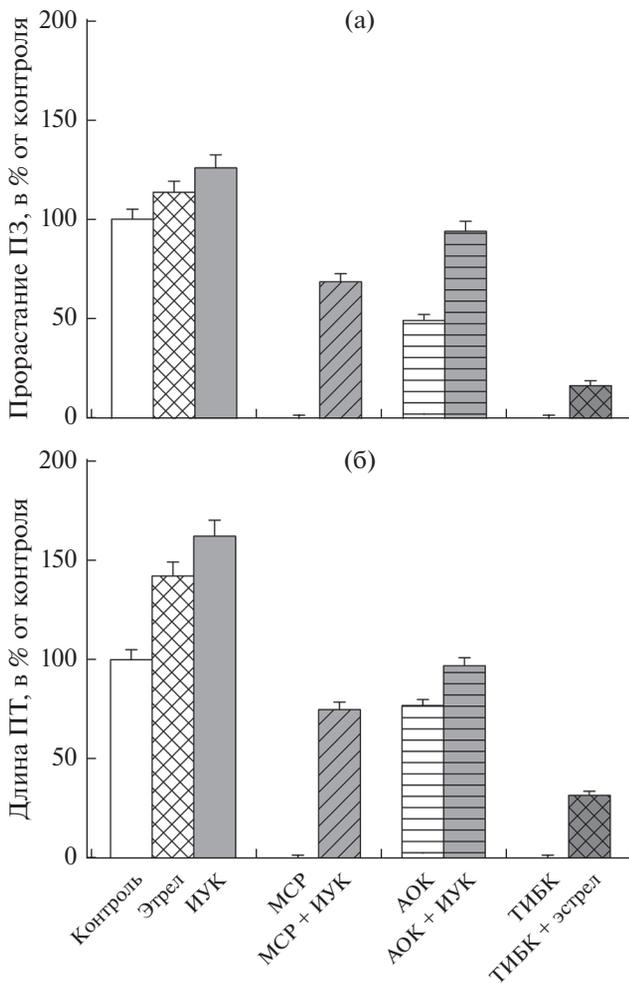


Рис. 2. Эффекты экзогенных фитогормонов (этилена и ИУК), блокатора рецепторов этилена (1-МСР), ингибиторов синтеза АЦК (АОК) и транспорта ИУК (ТИБК) на *in vitro* прорастание (а) и рост (б) мужского гаметофита петунии.

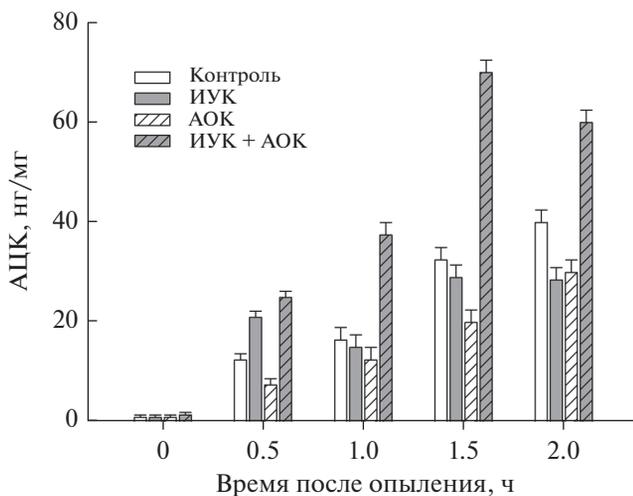


Рис. 3. Влияние предварительной обработки рылец перед опылением: ИУК, АОК, АОК + ИУК на динамику содержания АЦК в системе пыльца-рыльце петунии.

падало от 10 до 3 нг/мг через 15 мин культивирования, тогда как в среде культивирования из 1 мг пыльцы выделялось 7.0 нг АЦК. Внесение ИУК в среду культивирования не влияло на уровень АЦК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите.

ИУК снимает ингибиторное действие АОК на синтез АЦК в системе пыльца-рыльце

Прорастание пыльцы и рост мужского гаметофита *in vivo* в тканях пестика в ходе прогамной фазы оплодотворения происходит при высоком уровне АЦК в тканях рыльца, достигающем максимума через 2 ч после опыления (Ковалева и др., 2011).

С целью тестирования справедливости гипотезы о взаимодействии этилена с ИУК в ходе прорастания ПЗ и роста ПТ мы исследовали влияние экзогенной ИУК на динамику содержания АЦК в системе пыльца-рыльце петунии в процессе модуляции синтеза АЦК с помощью ингибитора ее синтеза, АОК, и блокатора рецепторов этилена, 1-МСР.

В первой серии этих экспериментов исследовано влияние ИУК на синтез АЦК на опыленных рыльцах, предварительно, перед опылением, обработанных ИУК, АОК или АОК + ИУК (рис. 3).

Содержание АЦК в системе пыльца-пестик в момент опыления (точка 0) было низким во всех вариантах опыта, включая контрольный вариант и все обработки, хотя ИУК, АОК, АОК + ИУК находились на рыльце в течение 6 ч до опыления. Это говорит о том, что эффекты предварительной обработки рылец указанными соединениями выявляются только при опылении, т.е. при попадании пыльцы на его поверхность.

В контрольном варианте (без обработок) содержание АЦК в рыльцах в течение 2 ч постепенно повышалось до 40 нг/мг.

Нанесение ИУК на рыльце перед опылением отражалось на динамике содержания АЦК в рыльцах после опыления, в отличие от прорастающего *in vitro* мужского гаметофита, причем действие этого гормона сопровождалось увеличением уровня АЦК.

Действие АОК приводило к двукратному снижению уровня АЦК в рыльцах. При совместной обработке рылец перед опылением АОК и ИУК гормон полностью снимал ингибиторный эффект АОК на синтез АЦК в системе пыльца-рыльце. Максимальное, 2-кратное повышение уровня АЦК наблюдали через 1.5 ч после опыления.

Таким образом, обработка рылец ИУК перед опылением оказывала действие на динамику содержания АЦК в системе пыльца-рыльце, а именно незначительно повышала уровень АЦК и снимала ингибиторный эффект АОК на синтез АЦК при совместной обработке (АОК + ИУК).

Во второй серии экспериментов исследовали влияние ИУК на синтез АЦК на рыльцах, предварительно, перед опылением, обработанных 1-МСП.

В случае, когда 1-МСП и среду вносили шприцем во флакон одновременно с ПЗ, ингибирование прорастания ПЗ не наблюдалось.

Опыление рылец пыльцой, обработанной 1-МСП в течение 1 ч, сопровождалось снижением уровня АЦК, но ИУК его не восстанавливала (данные не представлены).

Результаты опытов с пыльцой, предварительно обработанной 1-МСП в течение 3 ч, представлены в таблице.

Опыление рылец пыльцой, предварительно обработанной 1-МСП в течение 3 ч, приводило к снижению (в 2.5 раза) скорости роста ПТ и уровня АЦК с 27 до 20 нг/пестик. ИУК снимала ингибиторное действие 1-МСП на синтез АЦК и рост ПТ, восстанавливая уровень АЦК и рост ПТ до значений контрольных трубок.

В целом, результаты искусственной модуляции синтеза АЦК свидетельствуют о взаимодействии путей трансдукции сигналов этилена и ауксина в ходе прорастания и роста мужского гаметофита петунии. Экзогенная ИУК не влияла на уровень АЦК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и неопыленных рыльцах. В то же время в системе пыльца-рыльце ИУК незначительно повышала уровень АЦК и снимала ингибиторные эффекты АОК и 1-МСП на ее синтез, восстанавливая ее уровень и рост ПТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Этилен играет решающую роль в координации и регуляции широкого спектра ключевых процессов роста и развития высших растений, включая эмбриогенез, прорастание ПЗ и семян, старение цветков, созревание и опадение плодов. Очевидно, что для реализации всех этих функций этиленовый ответ должен четко регулироваться на различных уровнях, от синтеза гормона до трансдукции гормонального сигнала и регуляции транскрипции (de la Torre et al., 2006). АЦК-синтаза и АЦК-оксидаза кодируются мультигенными семействами, члены которых дифференцированно регулируются на уровне транскрипции программами развития, гормональными сигналами и различными индукторами синтеза этилена (Lin et al., 2009). Полагают, что основным фактором, обеспечивающим многообразие ответных реакций этилена, является взаимодействие его сигнального пути с путями трансдукции сигналов других фитогормонов.

Это взаимодействие может происходить на уровне взаимной регуляции процессов их биосинтеза, транспорта и катаболизма таких соединений. Ключевой стадией в этом сигнальном интеграционном процессе, как полагают, является

Влияние ИУК на синтез АЦК в системе пыльца-рыльце (опыление пыльцой, предварительно обработанной 1-МСП)

Вариант	Длина ПТ (мкм) через 1 ч после опыления	Содержание АЦК, нг/пестик
Контроль	500 ± 24	27.674 ± 0.65
1-МСП	200 ± 12	20.907 ± 1.12
1-МСП + ИУК	500 ± 28	27.876 ± 1.08

ткане-специфическая регуляция биосинтеза и транспорта ауксина и ответа этилена (Stepanova, Alonso, 2009). Взаимодействия этилена и ауксина могут носить как синергетический, так и антагонистический характер и, включаются, как выяснилось, в регуляцию различных процессов в корнях растений, включая растяжение, гравитропизм, формирование боковых корней (Chilley et al., 2006; Ross et al., 2011). При этом показано, что ауксин регулирует синтез этилена, а этилен регулирует синтез и транспорт ауксина (Strader et al., 2010). Считается, что оба гормона регулируют экспрессию целевых генов через различные сигнальные пути. Получены экспериментальные доказательства связи между экспрессией гена PLS арабидопсиса, трансдукцией этиленового сигнала и гомеостазом ауксина (Swarup et al., 2007). В этом случае экспрессия гена PLS подавлялась этиленом и индуцировалась ауксином. Недавно установлено, что ауксин и этилен регулируют биосинтез флавонолов через сигнальные пути, включающие TIR1 и EIN2/ETR1 (Lewis et al., 2011). Полученные ранее данные о динамике флавонолов в системах пыльник – мужской гаметофит и пыльца-пестик петунии (Kovaleva et al., 2009) позволяют нам предположить действие подобного механизма и в прогамной фазе оплодотворения у петунии.

Полученные ранее данные показали, что этилен является регулятором развития и прорастания мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения. Согласно нашей рабочей гипотезе этилен, участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита, взаимодействуя с другими гормонами (в том числе и с ИУК) и тем самым контролирует гаметофитно-спорофитные взаимодействия.

Наши результаты показали, что регуляция прорастания ПЗ и роста ПТ происходит при участии и взаимодействии сигнальных путей этилена и ИУК. Прорастание ПЗ и рост ПТ петунии в разной степени чувствительны к действию этилена (этрела) и ИУК, а полное или частичное нарушение функционирования любого из рассматриваемых эндогенных фитогормонов ингибиторами их действия, транспорта или синтеза приводит

к полному или частичному ингибированию рассматриваемых ростовых процессов. Ингибиторный анализ показал, что этилен и ИУК, ключевые регуляторы роста и развития растений, играют основную роль в гормональной регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии и что возможное взаимодействие их сигнальных путей инициирует запуск прорастания ПЗ. Согласно полученным данным ингибитор действия этилена, 1-МСП, и ингибитор транспорта ИУК, ТИБК, полностью блокируют прорастание *in vitro* ПЗ петунии, в то время как ИУК снимает ингибиторный эффект 1-МСП, а этрел в свою очередь частично снимает ингибиторный эффект ТИБК.

О характере взаимодействий между двумя гормонами в прогамной фазе оплодотворения говорить преждевременно, можно лишь предположить их синергетический характер в регуляции прорастания ПЗ и полярного роста ПТ петунии. Прорастание пыльцы, как *in vitro* (рис. 1б), так и *in vivo* (Kovaleva, Zakharova, 2003), сопровождалось постоянным, но незначительным ростом уровня ИУК, которая при этом выделялась в среде культивирования, что свидетельствует о ее синтезе. Экзогенная ИУК снимала ингибиторное действие 1-МСП и АОК как на прорастание ПЗ и рост ПТ, так и на синтез АЦК, восстанавливая уровень АЦК и рост ПТ до их значений в контрольных трубках (рис. 2 и 3, таблица).

Хотя каждый из исследуемых гормонов необходим для процесса формирования и растяжения ПТ (ингибиторы их действия и биосинтеза ингибировали процесс роста), они различаются по своим особенностям действия, реализуемого, очевидно, в определенных локусах общей сигнальной сети прорастающего мужского гаметофита. В то же время АЦК может быть точкой пересечения биосинтеза этилена с сигнальными путями других фитогормонов, участвующих в регуляции прогамной фазы оплодотворения у петунии.

Полагаем, что взаимодействие этилена и ауксина в прорастающем мужском гаметофите может происходить на уровне АЦК-синтазы, ключевого фермента образования этилена, так как экзогенная ИУК полностью снимала ингибиторный эффект АОК на прорастание ПЗ и на рост ПТ как *in vitro*, так и *in vivo*. Из литературы известно, что сложные взаимодействия между этиленом и ауксином отражаются на синтезе, трансдукции сигналов и транспорте этих фитогормонов. Ауксин индуцирует биосинтез этилена на уровне АЦК-синтазы, ключевого фермента его образования, и, следовательно, стимулирует синтез этого гормона (Yang, Hoffman, 1984). Подобным образом этилен может влиять на уровень ауксина, индуцируя его синтез и повышая тем самым его уровень (Strader et al., 2010) в кончике корня. У

многих видов растений ауксин индуцирует подгруппу генов АЦК-синтазы (Tsuchisaka et al., 2009). Так, например, у *Arabidopsis* – из шести генов, кодирующих АЦК-синтазу, *AtACS4*, *AtACS5* и *AtACS7* индуцируются ауксином, цитокинином и озоном, соответственно (Wang et al., 2005).

И, наконец, еще одно предположение можно сделать в связи с недавно полученными данными о том, что рост-стимулирующий эффект ИУК обусловлен ее действием на электрогенную активность H^+ -АТФазы плазмалеммы (Воронков и др., 2010) и актиновый цитоскелет ПТ (Ковалева и др., 2015). Представленные здесь данные свидетельствуют о том, что активация ауксином протонного насоса опосредована поступлением ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды внутрь растущих ПТ. Поэтому нельзя исключить возможность того, что ИУК-индуцированная стимуляция транспорта H^+ и Ca^{2+} через плазмалемму ПТ тесно сопряжена с соответствующей реорганизацией актинового цитоскелета. При этом известная чувствительность АСБ к параметрам ионного гомеостаза цитозоля ПТ может лежать в основе механизма такого сопряжения. Эта гипотеза представляется привлекательной в свете недавно проведенных исследований, которые расширили арсенал активностей ауксина как ключевого регулятора клеточной поляризации и морфогенеза (Pan et al., 2015). Реализация этих активностей, как выяснилось, требует нетранскрипционных ответных реакций, таких, как изменения в цитоскелете и трафике мембранных везикул, то есть в факторах, обычно регулируемых при участии ROP/Rac-GTPаз-зависимых сигнальных путей. На основе литературных данных и результатов настоящей работы предполагается, что этилен участвует в процессах прорастания, роста и развития мужского гаметофита взаимодействуя с другими фитогормонами, включающими, прежде всего, ИУК, на уровне трансдукции соответствующих сигналов, тем самым активируя ключевые детерминанты поляризации ПТ, такие как ROP1 GTPазу, основной регулятор роста ПТ, а также H^+ -АТФазу плазмалеммы и их актиновый цитоскелет.

Работа выполнялась при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 13-04-00592).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронков А.С., Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Ковалева Л.В. Стимуляция электрогенной активности H^+ -АТФазы плазмалеммы в прорастающем мужском гаметофите петунии экзогенным ауксином: медиаторная роль кальция и активных форм кислорода // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 435–432.
- Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Воронков А.С., Ковалева Л.В. Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник – мужской гаметофит

- у петунии // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 437–444.
- Ковалева Л.В., Тимофеева Г.В., Захарова Е.В., Воронков А.С., Ракитин В.Ю. Синтез этилена в тканях рыльца петунии контролирует рост пыльцевых трубок в прогамной фазе оплодотворения // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 338–344.
- Ковалева Л.В., Тимофеева Г.В., Родионова Г.Б., Захарова Е.В., Ракитин В.Ю. Роль этилена в регуляции гаметофитно-спорофитных взаимодействий в прогамной фазе оплодотворения у петунии (*Petunia hybrida* L.) // Онтогенез. 2013. Т. 44. С. 91–100.
- Ковалева Л.В., Воронков А.С., Захарова Е.В. Роль ауксина и цитокинина в регуляции актинового цитоскелета прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 179–186.
- Ракитин В.Ю., Ракитин Л.В. Определение газообмена и содержание этилена, двуокиси и кислорода в тканях растений. 1986. Т. 33. С. 403–413.
- Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // Агрехимия. 1999. № 8. С. 49–53.
- Adams D.O., Yang S.F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979. V. 76. P. 170.
- Bleecker A.B., Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2000. V. 16. P. 1–18.
- Bui A.Q., O'Neill S.D. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 419–428.
- Chilley P.M., Casson S.A., Tarkowski P., Wang K.L.C., Hawkins N., Hussey P.J., Beale M., Ecker J.R., Sandberg G.K., Lindsey K. The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 3058–3072.
- De la Torre F., Del Carmen Rodríguez-Gacio M., Matilla A.J. How ethylene works in the reproductive organs of higher plants: a signaling update from the third millennium // Plant Signal Behav. 2006. V. 1. P. 231–242.
- Hoekstra A.F., Weges R. Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of *Petunia hybrida* flowers // Plant Physiol. 1986. V. 80. P. 403–408.
- Holden M.J., Marty J.A., Singh-Cundy A. Pollination-induced ethylene promotes the early phase of pollen tube growth in *Petunia inflata* // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 261–269.
- 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.
- Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Minkina Yu.V., Voronkov A.S. Effects of flavonols and phytohormones on germination and growth of *petunia* male gametophyte // Allelopath. J. 2009. V. 29. P. 51–62.
- Kovaleva L.V., Dobrovolskaya A., Voronkov A., Rakitin V. Ethylene is involved in the control of male gametophyte development and germination in *Petunia* // J. Plant Growth Regul. 2011. V. 30. P. 64–73.
- Lewis D.R., Ramirez M.V., Miller N.D., Vallabhaneni P., Ray W.K., Helm R.F., Winkel B.S., Muday G.K. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 144–164.
- Lin Z., Zhon S., Grierson D. Recent advances in ethylene research // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3311–3336.
- Lizada M.C., Yang S. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Anal. Biochem. 1979. V. 100. P. 140–145.
- O'Neill S.D., Nadeau J.A., Zhang X.S. et al. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 419–432.
- Pan X., Chen J., Yang Z. Auxin regulation of cell polarity in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 28. P. 144–153.
- Ross J.J., Weston D.E., Davidson S.E., Reid J.B. Plant hormone interactions: how complex are they? // Physiologia Plantarum. 2011. V. 141. P. 299–309.
- Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Friml J., Benkova E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2197–2212.
- Singh A., Evensen K.B., Kao T.-H. Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata* // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 38–45.
- Sisler E.C., Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments // Physiol. Plant. 1997. V. 100. P. 577–582.
- Stepanova A.N., Alonso J.M. Ethylene signaling and response pathway: A unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs // Physiol. Plant. 2009. V. 123. P. 195–206.
- Strader L.C., Chen G.L., Bartel B. Ethylene directs auxin to control root cell expansion // Plant J. 2010. V. 64. P. 874–884.
- Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten, Beemster G.T.S., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M.J. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2186–2196.
- Tsuchisaka A., Yu G., Jin H., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang X., Gao S., Theologis A. A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane – 1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2009. V. 183. P. 979–1003.
- van Doorn W.G., Kamdee C. Flower opening and closure: an update // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 5749–5757.
- Wang N.N., Shin M.-C., Li N. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of *Arabidopsis* ACC synthase genes *AtACS4*, *AtACS5*, and *AtAC7* induced by hormones and stresses // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 909–920.
- Weterings K., Pezzotti M., Cornelissen M. et al. Dynamic 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthase and -oxidase transcript accumulation patterns during pollen tube growth in tobacco styles // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1190–1200.

- Woltering E.J., Somhorst D., van der Veer P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1219–1225.
- Yang S.E., Hoffman N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984. V. 35. P. 155–189.
- Yoon G.M., Kieber J.J. 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in Arabidopsis // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 1016–1028.
- Yoon G.M. New Insights into the protein turnover regulation in ethylene biosynthesis // *Mol. Cells.* 2015. V. 38. P. 597–603.

Auxin Abolishes Inhibitory Effects of Methylcyclopropene and Amino Oxycetic Acid on Pollen Grain Germination, Pollen Tube Growth, and the Synthesis of ACC in *Petunia*

L. V. Kovaleva^{1, *}, E. V. Zakharova², A. S. Voronkov¹, and G. V. Timofeeva¹

¹*Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

²*Russian State Agrarian University, Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127550 Russia*

e-mail: kovaleva_l@mail.ru

Received May 13, 2016; in final form, October 26, 2016

As established by us earlier, ethylene behaves as a regulator of germination, development, and growth of male gametophyte during the progamic phase of fertilization. However, the mechanisms of the regulation of these processes remain so far unstudied. It is believed that the main factor providing variety of the ethylene responses is its interaction with other phytohormones. According to our working hypothesis, ethylene controls germination of pollen grains (PGs) and growth of pollen tubes (PTs) by interacting with auxin, which, as the available data indicate, is likely a key regulator of plant cell polarization and morphogenesis and one of the factors modulating the biosynthesis of ethylene at the level of ACC-synthase gene expression. In the present work, on germinating *in vitro* male gametophyte and the pollen-stigma system for *petunia* (*Petunia hybrida* L.) effects of phytohormones (ethylene and IAA) and known blockers repressing ethylene reception (1-methylcyclopropene, 1-MCP), the synthesis of ACC (amino oxycetic acid, AOA) and transport IAA (tryiodbenzoynaya acid, TYBA) on PGs germination, PTs growth and the synthesis of ACC were investigated. According to the data obtained, exogenous ethylene and IAA stimulated both PGs germination and PTs growth. 1-MCP and TYBA completely inhibited the first process, whereas IAA abolished the inhibitory action of 1-MCP and AOA on both the above processes. EtreI only partially weakened the inhibitory effect of TYBA. Examination of ACC synthesis modulation with AOA showed that IAA does not affect the level of ACC in germinating *in vitro* male gametophyte and nonpollinated stigmas, while this phytohormone insignificantly raised the level of ACC and abolished the inhibitory effect of AOA on its synthesis in the pollen-stigma system. Pollination of stigmas with the pollen preliminarily treated with 1-MCP led to 2.5-fold decline in both the rate of PT growth and the level of ACC. At the same time, IAA abolished the inhibitory action of 1-MCP recovering the synthesis of ACC and growth of PTs to the control values. All these results, taken together, provide evidence for the interaction of the signal transduction pathways of ethylene and auxin at the level of ACC biosynthesis in the course of germination and growth of *petunia* male gametophyte during the progamic phase of fertilization.

Keywords: *Petunia hybrida*, male gametophyte, germination, growth, ethylene, ACC, 1-MCP, AOA, IAA