

На правах рукописи



ВОРОНКОВ
Александр Сергеевич

УЧАСТИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И H^+ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ В
ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ
РОСТА МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2010

Работа выполнена в лаборатории природных и синтетических регуляторов роста Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук

Ковалева Лидия Валентиновна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор

Шишова Мария Федоровна

доктор биологических наук

Соколов Олег Игоревич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет.

Защита диссертации состоится «27» апреля 2010 г. в 11⁰⁰ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, ул. Ботаническая, 35.
Факс: (495)977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «22» марта 2010 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одна из фундаментальных задач исследования половой репродукции растений состоит в выяснении механизмов гормональной регуляции полярного роста мужского гаметофита (Ковалева и др., 2000, 2005; O'Neill et al., 1993; Kovaleva and Zakharova, 2003; Chen and Zhao, 2008; Wu et al., 2008).

Прорастание пыльцы и поддержание полярного роста пыльцевой трубки требуют как временной, так и пространственной координации многих клеточных функций, в том числе динамической организации элементов цитоскелета, внутриклеточного транспорта везикул, несущих материал для построения клеточной стенки в ходе экзо- и эндоцитоза, трансмембранного транспорта основных физиологически важных ионов (H^+ , Ca^{2+} , K^+), а также транзиторных изменений параметров внутриклеточного ионного гомеостаза, таких как pH и pCa (Franklin-Tong, 1999; Hepler et al., 2001; Camacho and Malho, 2003; Feijo et al., 1995, 2004; Astrom et al., 1991, 1995; Laitinen, 1998; Vidali and Hepler, 2001; Holdaway-Clarke and Hepler, 2003; Ceretal et al., 2008; Cheung and Wu, 2008).

Недавно обнаружено, что в плазматической мембране мужского гаметофита функционируют верапамил-/нифедипин-ингибируемые Ca^{2+} каналы, которые активируются при деполяризации этой мембраны. Эти каналы отвечают за поглощение клетками внеклеточного кальция и тем самым за генерацию в них кальциевого сигнала. Экзогенные фитогормоны способны к транзиторной модуляции цитоплазматического pH (pH_c) пыльцевых зерен петунии (Андреев и др., 2007). Характер гормон-индуцированного сдвига pH_c существенным образом зависит от физиологического состояния мужского гаметофита. Величина pH_c снижается в случае гидратированных пыльцевых зерен, но в заметной степени возрастает при их прорастании, и этот эффект оказался чувствителен к ортованадату – ингибитору H^+ -АТФазы плазмалеммы растительных клеток, что указывает на возможную роль этого фермента в механизме действия фитогормонов.

Кроме того, из литературы известно, что активацию Ca^{2+} каналов в плазмалемме растительных клеток могут вызывать АФК (Murata et al, 2001), которые включаются в механизм действия фитогормонов, в частности АБК (Pei et al., 2000; Jiang and Zhang, 2002, 2003).

Цели и задачи работы. Целью работы являлось исследование участия цитоскелета и ион-транспортирующих систем плазмалеммы в гормональной регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии. Для решения данной проблемы были поставлены следующие задачи:

1. Визуализировать актиновый цитоскелет пыльцевых трубок;
2. Исследовать действие ингибиторов полимеризации F-актина (латрункулина Б и цитохалазина Д) на структуру цитоскелета, прорастание и рост пыльцевых трубок;
3. Исследовать действие латрункулина Б на уровень фитогормонов в растущей пыльцевой трубке;

4. Изучить влияние ИУК, АБК, ГК₃ и кинетина на количество F-актина и его пространственную локализацию в растущей пыльцевой трубке;
5. Изучить влияние ИУК, АБК, ГК₃ и кинетина на мембранный потенциал плазмалеммы мужского гаметофита;
6. Исследовать возможное участие Н⁺-АТФазы, Са²⁺ и АФК в гормональной модуляции мембранного потенциала.

Научная новизна. Впервые установлено, что ИУК-стимулирующий и цитокинин-ингибирующий эффекты на прорастание и рост мужского гаметофита петунии *in vitro* связаны с изменениями в организации актинового цитоскелета. Экзогенная ИУК на 40% увеличивала содержание F-актина в апикальной и субапикальной зонах, тогда как кинетин на 60% снижал количество F-актина по всей длине пыльцевой трубки. Ингибитор полимеризации актина латрункулин Б вызывал дезинтеграцию актинового цитоскелета и снижение содержания эндогенной ИУК и, как следствие – торможение роста пыльцевых трубок.

Установлено, что экзогенные фитогормоны ИУК, АБК и ГК₃ индуцируют гиперполяризацию плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита путем стимуляции электрогенной активности Н⁺-АТФазы, функционирующей в этой мембране. Показано, что фитогормон-индуцированная стимуляция активности Н⁺-АТФазы опосредована поступлением ионов Са²⁺ из внеклеточной среды, а также генерацией активных форм кислорода (АФК) НАДФН-оксидазой плазмалеммы.

Научно-практическое значение. Полученные результаты могут быть использованы в фундаментальных исследованиях регуляторных механизмов репродукции растений, а также в селекционной практике. Материалы диссертации можно использовать в курсе лекций по физиологии и биохимии растений для студентов биологических и сельскохозяйственных ВУЗов.

Апробация работы. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008» (Москва, 2008); FESPВ-2008 «Redox signal integration» (Finland, Tampere, 2008); IX международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008); Годичном собрании общества физиологов растений России «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008); Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009); III Международной школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Саратов, 2009); Международной конференции АСПД-2009 (Prague, 2009).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, объект и методы исследований, результаты, обсуждение

результатов, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста и включает 42 рисунка, список литературы включает 225 наименований, из них 215 – на иностранных языках.

В литературном обзоре обсуждены структурные и функциональные особенности пыльцевых трубок, определяющие их полярный рост, такие как цитоскелет, зональность цитоплазмы, трансмембранный ионный и везикулярный транспорт, сигнальные системы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – мужской гаметофит (пыльца и пыльцевые трубки) петунии (*Petunia hybrida* L.). Растения размножали черенкованием и выращивали в условиях почвенной культуры в оранжерее и вегетационном домике ИФР РАН.

Визуализация актиновых филаментов мужского гаметофита. Жизнеспособность пыльцевых зёрен оценивали по методике Александера (Alexander, 1969).

Свежесобранную пыльцу культивировали 2 часа в термостате при температуре 26°C на среде следующего состава: 0,3 М сахарозы, 1,6 мМ H_3BO_3 , 1,3 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0,9 мМ KNO_3 , 0,8 мМ $MgSO_4$. Затем вносили фитогормон (ИУК, АБК, ГК₃ или кинетин) до конечной концентрации 10^{-12} или 10^{-6} М и продолжали культивирование ещё 2 часа. Проросшую пыльцу фиксировали 4%-раствором формальдегида в актин-стабилизирующем буфере (АСБ), содержащем 100 мМ Pipes, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$ и 75 мМ KCl, pH 6,9. Фиксацию препаратов проводили в течение 1 часа с предварительной инфльтрацией (вакуум в течение 5 минут) (Wang et al., 2005). После фиксации образцы трижды промывали АСБ. С целью увеличения проницаемости мембраны пыльцевых трубок их обрабатывали в течение 1 часа АСБ, содержащем 0,1% тритон X-100 и 1 мМ DTT, затем образцы трижды промывали АСБ. Окрашивание F-актина проводили в течение 20 минут 0,66 мкМ FITC-фаллоидином в фосфатном буфере (0,15 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 1,2 мМ KH_2PO_4 и 6,5 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,2). Окрашенные образцы трижды промывали фосфатным буфером.

Образцы прорастающего мужского гаметофита исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imedger D1 (возбуждение 546 ± 6 нм, эмиссия 590 нм) с цифровой камерой Axio Cam MRc. Измерения выполняли в программе Axio Vizion 4.5.

Определение содержания фитогормонов.

Содержание фитогормонов (АБК – абсцизовая кислота, ЦК – цитокинины, ИУК – индолилуксусная кислота) определяли в одном образце прорастающей пыльцы петунии. Фиксацию материала проводили согласно методике Скоробогатовой и др. (1999). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ.

Определение цитокинина (зеатина). Хроматографические условия для определения зеатина: детектор ультрафиолетовый Shimadzu R-530, длина волны 268 нм, колонка 4x250 мм Ultrapac Lichrosorb RP 18, 5 мкм. Элюэнт: ацетонитрил–вода–уксусная кислота (55:44:1), скорость элюции – 0,5 мл/мин.

Хроматографические условия для *определения ИУК*: детектор флуоресцентный Shimadzu RF-530, возбуждение 280 нм, эмиссия 350 нм, колонка 4x250 мм Ultrapac Lichrosorb RP 18, 5 мкм. Элюэнт: 40%-ный водный раствор метанола, скорость элюции – 0,3 мл/мин.

Хроматографические условия для *определения АБК*: детектор ультрафиолетовый (Shimadzu R-530), длина волны 254 нм, колонка 4x250 мм Ultrapac Lichrosorb RP 18, 5 мкм. Элюэнт: 40%-ный водный раствор метанола, скорость элюции – 0,7 мл/мин.

Гиббереллины определяли биотестированием (Frankland and Wareing, 1960) по изменению скорости роста салата сорта Берлинский.

Регистрация изменений мембранного потенциала мужского гаметофита.

Свежесобранную пыльцу (16 мг) проращивали в течение одного часа в 4 мл среды, содержащей 0,3 М сахарозы и 1,6 мМ H_3BO_3 . Затем центрифугировали при 64 g и осадок ресуспензировали в 2 мл инкубационного буфера, содержащего 0,3 М сахарозы, 25 мМ MES-Tris (pH 6.9).

Все измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Перед выполнением измерений 50 мкл суспензии проросшей пыльцы (~ 40000 пыльцевых зерен) инкубировали в течение 30-40 минут в 2 мл инкубационного буфера в присутствии 1 мкМ DiS-C₃-(5) или 10 мкМ сафранина O для достижения стационарного уровня флуоресценции или абсорбции индикатора мембранного потенциала, а затем добавляли фитогормон (ИУК, АБК, ГК₃ или кинетин) до концентрации 2,5 мкМ и следили за изменением мембранного потенциала мужского гаметофита.

Измерения мембранного потенциала регистрировали при температуре 20±1°C, следя за изменением интенсивности потенциал-чувствительного катионного красителя DiS-C₃-(5) (возбуждение 620 нм, эмиссия 670 нм) на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi-850 (Япония) либо за изменением разности оптических поглощений катионного красителя сафранина O при 554 и 524 нм ($\Delta A_{554-524} = A_{554} - A_{524}$) на спектрофотометре Hitachi-557 в двухволновом режиме работы прибора. Суспензию пыльцевых зёрен непрерывно перемешивали для предотвращения оседания.

Статистический анализ. На диаграммах по содержанию эндогенных гормонов в прорастающем мужском гаметофите представлены средние арифметические из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки.

Полученные микрофотографии актинового цитокелета обрабатывали с помощью программы Axio Vision 4.5. Изображение трубки делили на 8 равных зон по 10 мкм. Начиная от кончика, проводили профиль, отображающий интенсивность свечения и оценивали среднее значение флуоресценции в каждой зоне трубки. Опыты проводили в трёх-пяти биологических и трёх аналитических повторностях. Достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента при степени свободы 0,05. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки.

Опыты по влиянию фитогормонов на мембранный потенциал мужского гаметофита проводили в 4-5 повторностях, на рисунках представлены репрезентативные кинетические кривые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

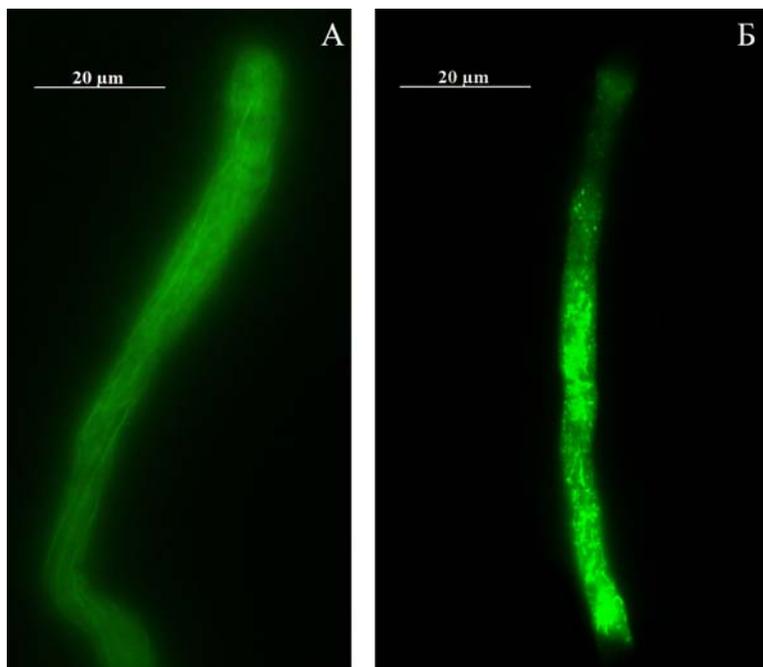
Влияние ингибиторов полимеризации актина на цитоскелет, прорастание и рост мужского гаметофита

Пыльцевая трубка – апикально растущая клетка с поляризованной цитоплазмой. Развитие и поддержание ее полярного роста обеспечивает актиновый цитоскелет, который является местом пересечения множества сигнальных путей, ему принадлежит центральная роль в поддержании полярного тока цитоплазмы и апикально-направленного везикулярного транспорта (Hepler et al., 2001; Li et al., 2001; Vidali and Hepler, 2001; de Graaf et al., 2005; Ren and Niang., 2007; Cai and Cresti, 2009).

Согласно организации актиновых нитей, пыльцевая трубка может быть разделена на три основных зоны: базальную, субапикальную и апикальную (Geitmann and Emons, 2000; Vidali and Hepler, 2001).

В базальной части цитоскелет пыльцевой трубки петунии представляет собой сеть толстых актиновых тяжей, которые постепенно переходят в густую сеть тончайших актиновых нитей в субапикальной и апикальной зонах (Рис. 1А).

Ингибиторы полимеризации актина, связываясь с актиновыми филаментами, вызывают их деполимеризацию: цитохалазин Д – до коротких олигомеров, а латрункулин В – до мономерного актина. Внесение цитохалазина Д в концентрации 2 мкМ в среду культивирования пыльцевых зерен петунии приводило к сильному



разрушению актиновых филаментов, образованию глыбок актина по всей пыльцевой трубке. Особенно сильному разрушению подвергался цитоскелет в апексе, где актин полностью распадался на олигомеры, что отражалось в ослаблении флуоресценции в апикальной зоне (данные не приведены). Латрункулин В в концентрации 100 нМ после 20 минут воздействия приводил к деполимеризации нитей актина (Рис. 1Б). Латрункулин действовал на нити актина

Рис. 1. Актиновый цитоскелет пыльцевой трубки: (А) сахароза + H_3BO_3 , (Б) сахароза + H_3BO_3 + 100 нМ латрункулина.

подобно цитохалазину, но в меньших концентрациях, так как является более специфическим агентом к актину и приводит к его полному разрушению до мономеров, о чем свидетельствует отсутствие окраски в апексе трубки.

Длина пыльцевых трубок петунии через 4 часа культивирования достигает 300 мкм (Рис. 2А). При внесении в среду латрункулина, который разрушает актиновые филаменты и блокирует дальнейшую полимеризацию актина, пыльцевые зёрна теряли способность к прорастанию (Рис. 2Б, В). В концентрации 2 нМ латрункулин тормозил рост пыльцевой трубки, она была очень короткой и теряла униполярность (Рис. 2Б), а в концентрации 100 нМ полностью ингибировал прорастание пыльцевых зерен (Рис. 2В).

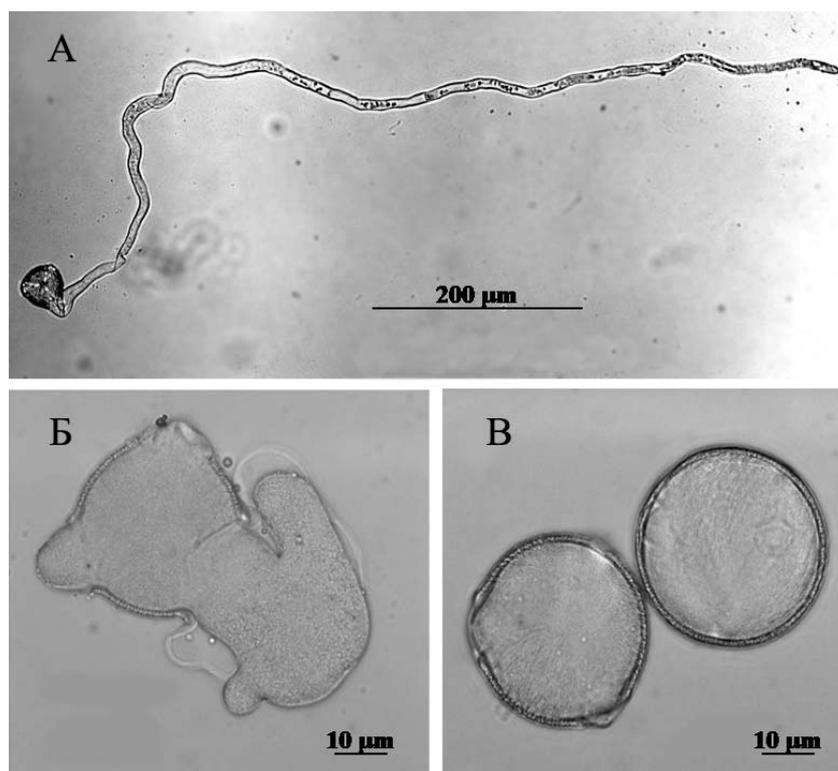


Рис. 2. Мужской гаметофит петунии после 4-х часов культивирования на среде, содержащей (А) 0,4 М сахарозу и 1,6 мМ H_3BO_3 ; (Б) 0,4 М сахарозу, 1,6 мМ H_3BO_3 и 2 нМ латрункулина; (В) 0,4 М сахарозу, 1,6 мМ H_3BO_3 и 100 нМ латрункулина.

Влияние латрункулина Б на уровень фитогормонов в прорастающем мужском гаметофите

Латрункулин Б в концентрации 0,2 нМ замедлял рост пыльцевых трубок (Рис. 3) и вызывал изменения в содержании эндогенных фитогормонов в прорастающих пыльцевых трубках (Рис. 4).

Культивирование пыльцы в течение одного часа на среде в присутствии латрункулина приводило к нарушению пространственной организации актинового цитоскелета мужского гаметофита и, как следствие, к последующему ингибированию его роста (Рис. 3). Торможение роста мужского гаметофита сопровождалось резким (ниже уровня чувствительности прибора) падением содержания ИУК, в то время как рост пыльцевых трубок на среде без латрункулина сопровождался повышением уровня ИУК (Рис. 4). Уровень гиббереллинов незначительно снижался в пыльцевых трубках, культивируемых на среде с латрункулином. Концентрация АБК (через час

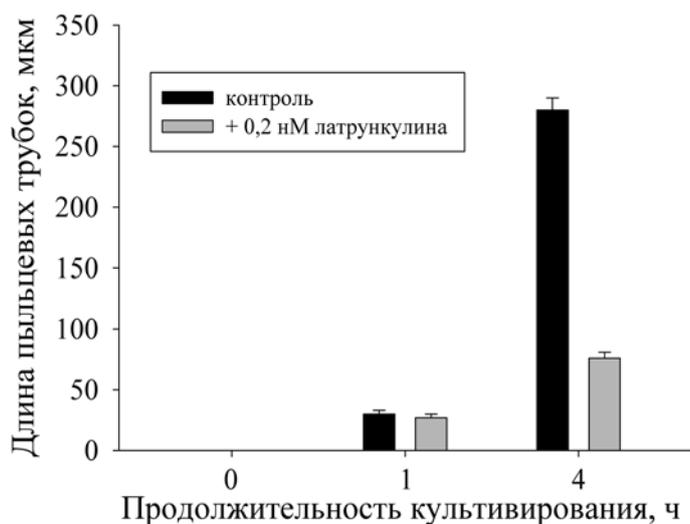


Рис. 3. Влияние 0,2 нМ латрункулина на рост пыльцевых трубок петунии.

культивирования ниже уровня чувствительности прибора) и зеатина в прорастающей пыльце контрольного и опытного вариантов была одинаковой.

Таким образом, проведенные исследования выявили взаимосвязь между функционированием актинового цитоскелета и гормональной регуляцией прорастания и полярного роста мужского гаметофита. Резкое снижение темпов роста пыльцевых трубок на среде с латрункулином, очевидно, обусловлено нарушением

полимеризации актинового цитоскелета и падением содержания эндогенной ИУК, играющей центральную роль в поддержании апикально-направленного роста пыльцевых трубок.

Эффекты экзогенных фитогормонов на актиновый цитоскелет мужского гаметофита петунии

Экзогенные фитогормоны оказывают значительное действие на прорастание и рост мужского гаметофита петунии (Ковалева и др., 2005). ИУК в концентрации 10^{-12} - 10^{-6} М стимулировала, а в концентрации 10^{-3} М ингибировала прорастание и рост пыльцевых трубок; АБК и ГК₃ стимулировали прорастание и рост в концентрациях от 10^{-12} до 10^{-3} М, а кинетин в тех же концентрациях ингибировал эти процессы.

Мы предположили, что эффекты фитогормонов на прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок могут быть связаны с изменениями в архитектуре и пространственной локализации актинового цитоскелета в ходе полимеризации/деполимеризации его нитей, обеспечивающих передвижение везикул, транспортирующих материал для построения клеточной стенки к плазмалемме апекса пыльцевой трубки.

ИУК в концентрации 10^{-12} и 10^{-6} М вызывала увеличение на 37% общего количества актиновых филаментов, что выражалось в увеличении степени флуоресценции окрашенных FITC-фаллоидином нитей актина (Рис. 5). Наибольшее увеличение количества актиновых филаментов происходило в апикальной и субапикальной зонах пыльцевой трубки, тогда как с продвижением к базальной части, ближе к пыльцевому зерну, эти изменения становились менее выраженными (Рис. 6А).

Таким образом, ИУК, внесённая в среду культивирования, приводила к ускорению роста пыльцевых трубок растяжением, увеличивая количество

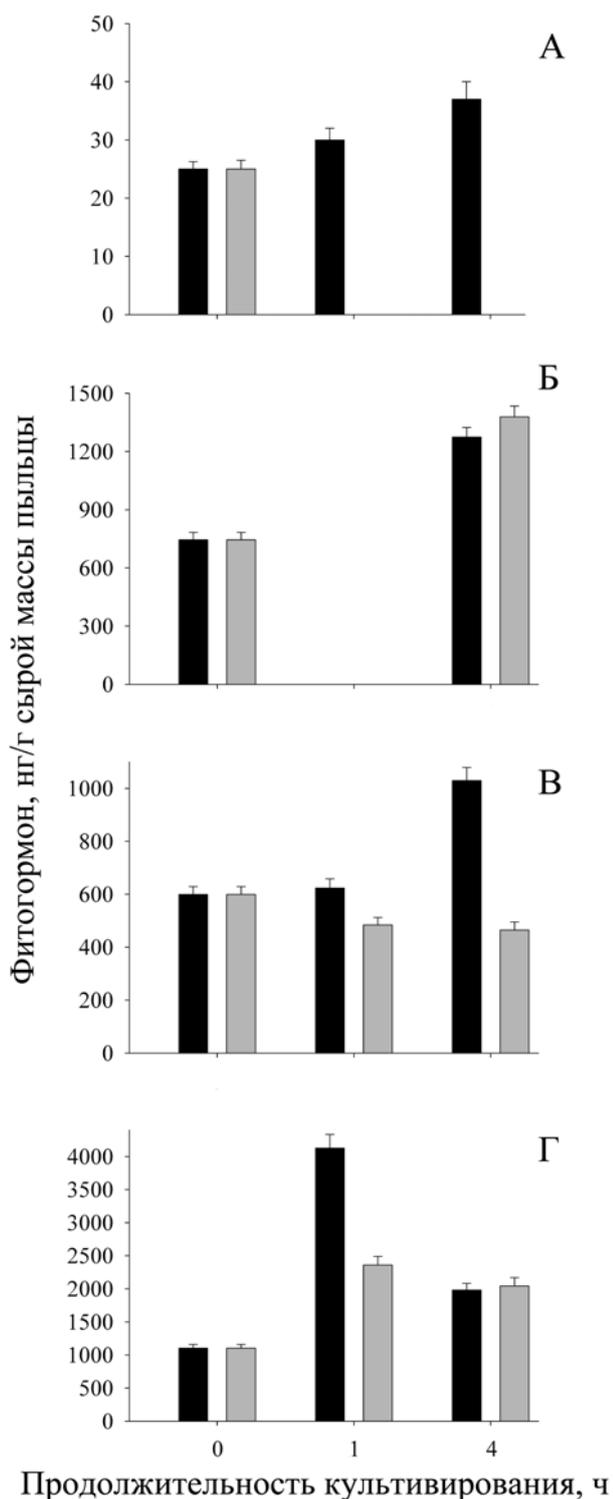


Рис. 4. Динамика содержания фитогормонов (А – ИУК; Б – АБК; В – ГК₃; Г – зеатин) в мужском гаметофите петунии, прорастающем на среде культивирования 0,3 М сахара + 1,6 мМ Н₃ВО₃ (чёрные столбики) и с 0,2 нМ латрункулина (серые столбики).

полимерного актина в их апикальной и субапикальной зонах, имеющих наибольшее значение для поддержания полярного роста.

При добавлении в среду культивирования АБК до концентрации 10⁻¹² и 10⁻⁶ М общее количество полимерного актина в пыльцевой трубке не менялось (Рис. 5). Стимулирующее действие АБК на рост пыльцевой трубки сопровождалось увеличением количества F-актина на 15% в апексе пыльцевой трубки (Рис. 6Б).

Культивирование пыльцевых трубок петунии на среде с ГК₃ приводило к незначительному изменению общего количества актиновых филаментов (Рис. 5). ГК₃ в обеих использованных концентрациях слабо влияла на распределение актиновых филаментов по зонам трубки. В апексе количество F-актина увеличивалось на 20%, тогда как в базальной части происходило снижение количества нитей актина на 5-10% (Рис. 6В).

Таким образом, стимулирующее действие экзогенной ГК₃ на полярный рост пыльцевой трубки связано не с изменением общего количества полимерного актина, а с перераспределением F-актина по её зонам. **Кинетин**, в отличие от ИУК, АБК и ГК₃, подавлял полимеризацию актина в пыльцевых трубках. Культивирование пыльцы на среде с кинетином приводило к снижению до 40% общего количества актиновых филаментов (Рис. 5). Кинетин вызывал снижение плотности актиновых филаментов по всей длине пыльцевой трубки. Наибольшее снижение количества полимерного актина при концентрации

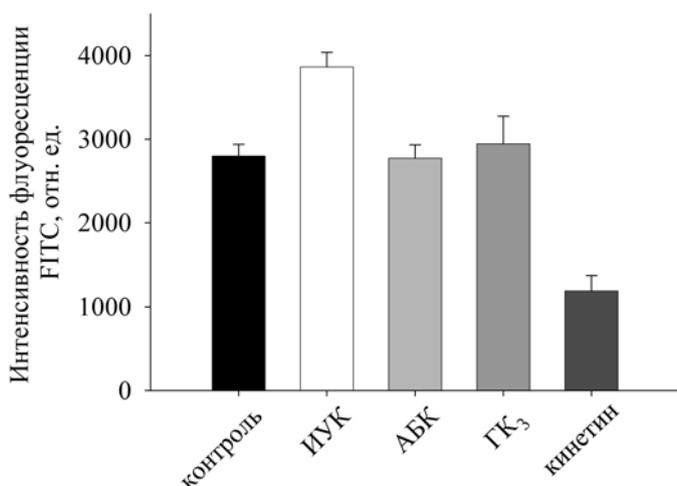


Рис. 5. Влияние фитогормонов (10^{-6} М) на общее количество полимерного актина в пыльцевой трубке петунии.

кинетина 10^{-6} М происходило в базальной части (Рис. 6Г). Следовательно, кинетин ингибировал рост пыльцевых трубок петунии, значительно снижая количество полимерного актина во всех зонах трубки.

Представленные данные свидетельствуют о том, что актиновый цитоскелет прорастающего мужского гаметофита петунии чувствителен к действию экзогенных фитогормонов. ИУК, АБК и ГК₃ увеличивали, а кинетин уменьшал количество полимерного актина. Наиболее четкие

эффекты вызывали ИУК и кинетин: если в присутствии ИУК наблюдали стимуляцию роста пыльцевых трубок и повышение содержания полимерного актина в апикальной и субапикальной зонах, то в присутствии кинетина происходило ингибирование роста и снижение содержания полимерного актина во всех зонах пыльцевых трубок.

Влияние экзогенных фитогормонов на поляризацию плазмалеммы прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии

Стимуляция фитогормонами электрогенной активности H^+ -АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита

Координация целого ряда процессов в ходе прорастания мужского гаметофита и роста пыльцевой трубки связана с транспортом основных физиологически важных ионов (H^+ , Ca^{2+} и K^+) через плазмалемму. Мы предположили, что стимулирующее действие экзогенных фитогормонов на рост пыльцевых трубок обусловлено их влиянием на активность ион-транспортирующих систем плазмалеммы. В этом ряду особое внимание привлекает H^+ -АТФаза, которая изменяет свою активность под действием фитогормонов, что отражается в сдвиге цитоплазматического рН в щелочную сторону (Андреев и др., 2007). Поскольку изменение рН_c под влиянием фитогормонов является результатом стимуляции H^+ -транслоцирующей активности H^+ -АТФазы, то при этом может происходить стимуляция электрогенной активности данного фермента, что должно вызывать гиперполяризацию плазмалеммы. В настоящей работе мы проверили это предположение, исследуя гормон-индуцируемые изменения поляризации плазмалеммы прорастающих пыльцевых зерен петунии с помощью потенциал-чувствительных катионных красителей, Dis-C₃-(5) и сафранина О.

После внесения ИУК, АБК или ГК₃ в суспензию прораставшей в течение 1 часа пыльцы (до конечной концентрации 2,5 мкМ) наблюдали быстрое увеличение

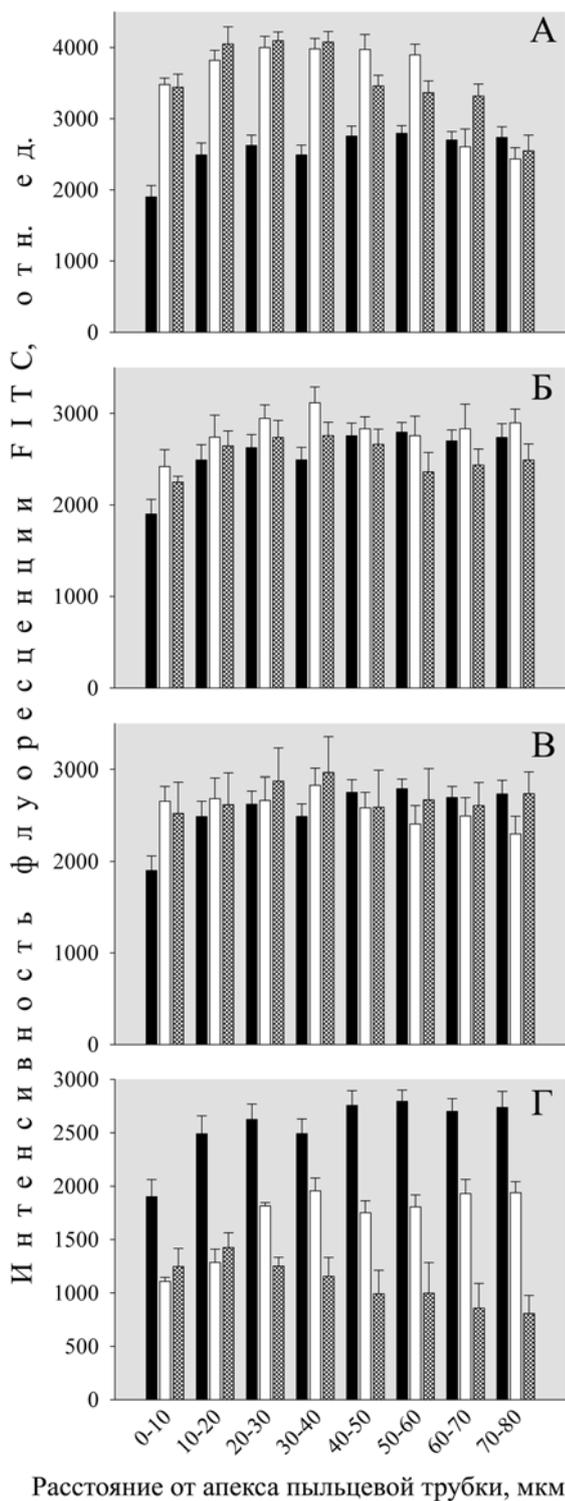


Рис. 6. Влияние фитогормонов (А – ИУК; Б – АБК; В – ГК₃; Г – кинетин) на распределение актиновых филаментов в прорастающем мужском гаметофите петунии. Черные столбики – контроль, белые столбики – фитогормон (10^{-12} М), штрихованные столбики – фитогормон (10^{-6} М).

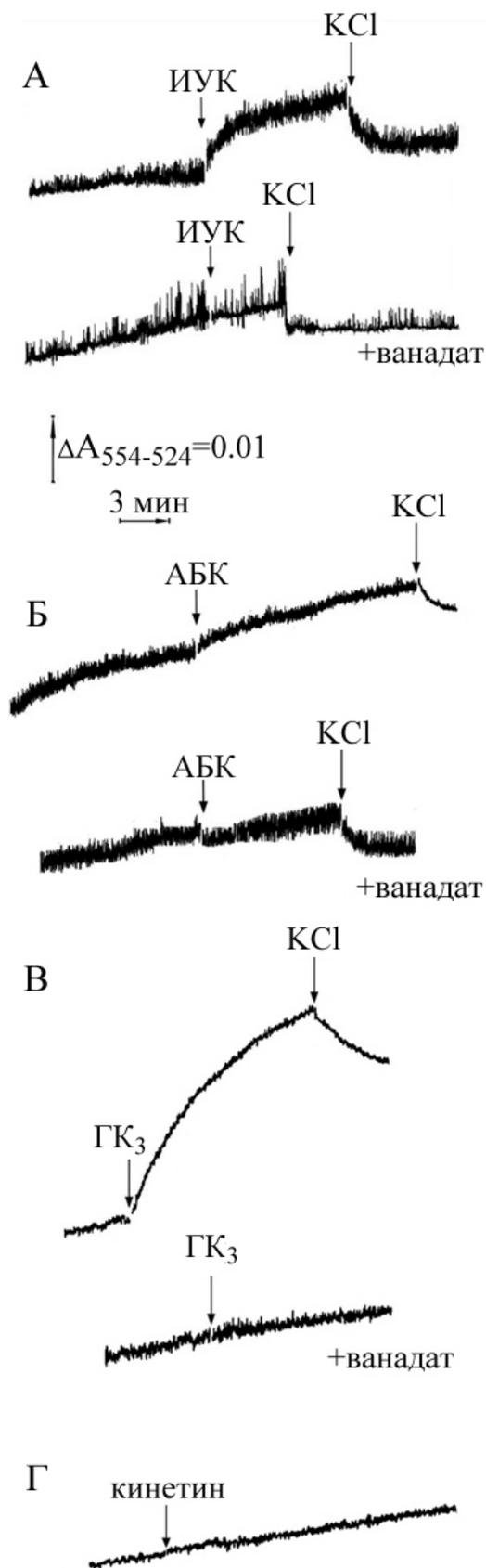


Рис. 7. Влияние фитогормонов на мембранный потенциал мужского гаметофита петунии.

регистрируемого сигнала сафранина О ($\Delta A_{554-524}$) (Рис. 7) или увеличение степени флуоресценции потенциал-чувствительного красителя Dis-C₃-(5) (данные не приведены).

Как показано на рис. 7 (А, Б и В), наблюдаемые эффекты фитогормонов полностью подавлялись в присутствии в среде инкубации пыльцевых зерен ортованадата (200 мкМ) – блокатора Н⁺-АТФазы плазмалеммы растительных клеток. Это наблюдение не только подтверждает наше предположение о том, что фитогормон-индуцируемое увеличение мембранного потенциала происходит именно на плазмалемме мужского гаметофита, но и указывает на стимуляцию электрогенной активности данного протонного насоса под действием фитогормонов. Быстрое обращение сигнала сафранина после добавления к суспензии пыльцевых зерен КС1 (60 мМ) (Рис. 7) дает дополнительное подтверждение тому, что наблюдаемые изменения абсорбционного сигнала сафранина обусловлены изменениями в электрической поляризации плазмалеммы мужского гаметофита.

Другое важное свидетельство в пользу включения Н⁺-АТФазы в фитогормон-индуцированную гиперполяризацию плазмалеммы состоит в том, что она отчетливо имитируется синтетическим ауксином 2,4-Д и быстро снимается проникающим катионом тетрафенилфосфонием (ТФФ⁺).

Подобное действие оказывал также и фузикоцин – стимулятор активности данного протонного насоса на плазмалемме растительных клеток. Важно отметить, что вызываемый фузикоцином сдвиг мембранного потенциала оставался неизменным после добавления к суспензии прорастающей пыльцы ИУК, АБК или ГК₃, что указывает на общую мишень действия этих соединений.

Проведённые эксперименты показали, что экзогенные фитогормоны ИУК, АБК и ГК₃ вызывают стимуляцию электрогенной активности Н⁺-АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита петунии и тем самым приводят к её гиперполяризации.

Внесение **кинетина** в суспензию прорастающей пыльцы до концентрации 2,5 мкМ не вызывало каких-либо изменений в мембранном потенциале мужского гаметофита (Рис. 7Г).

Таким образом ИУК, АБК и ГК₃ стимулировали электрогенную активность Н⁺-АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита петунии, приводя к гиперполяризации данной мембраны, в то время как цитокинин такого действия не оказывал.

Зависимость гормон-индуцированной гиперполяризации плазмалеммы мужского гаметофита от наличия ионов Ca²⁺ во внеклеточной среде

Гиперполяризация плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита петунии под действием **ИУК**, **АБК** или **ГК₃** полностью подавлялась в присутствии в среде культивирования Ca²⁺-хелатора ЭГТА (500 мкМ) (Рис. 8). Подавление фитогормон-индуцированной гиперполяризации плазмалеммы наблюдали и в присутствии блокатора Ca²⁺ каналов верапамила (5 мкМ) (Рис. 8). Полученные данные показывают, что индуцируемая ИУК, АБК и ГК₃ стимуляция протонной АТФазы

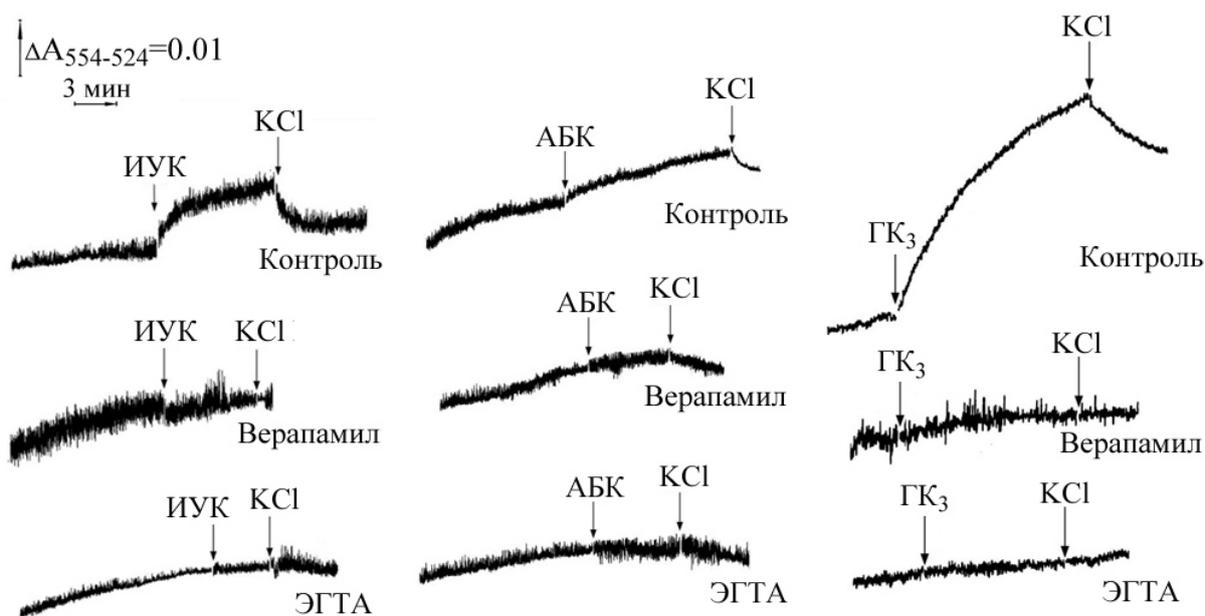


Рис. 8. Зависимость ИУК-, АБК-, ГК₃- индуцированной гиперполяризации плазмалеммы мужского гаметофита от концентрации ионов Ca²⁺ во внеклеточной среде.

плазмалеммы мужского гаметофита петунии опосредована поступлением из инкубационной среды ионов Ca²⁺.

Возможная медиаторная роль НАДФН-оксидазы в гормон-индуцированной стимуляции H⁺-АТФазы плазмалеммы

Гиперполяризация плазмалеммы мужского гаметофита под действием ИУК, АБК или ГК₃ полностью блокировалась ингибитором НАДФН-оксидазы плазмалеммы дифенилен иодониумом (10 мкМ ДФИ) (Рис. 9). Следовательно, можно полагать, что увеличение содержания АФК, как и кальция, при действии фитогормонов приводит к стимуляции электрогенной активности H⁺-АТФазы на плазмалемме мужского гаметофита. АФК, возможно, продуцируются за счёт активности НАДФН-оксидазы, функционирующей в плазмалемме.

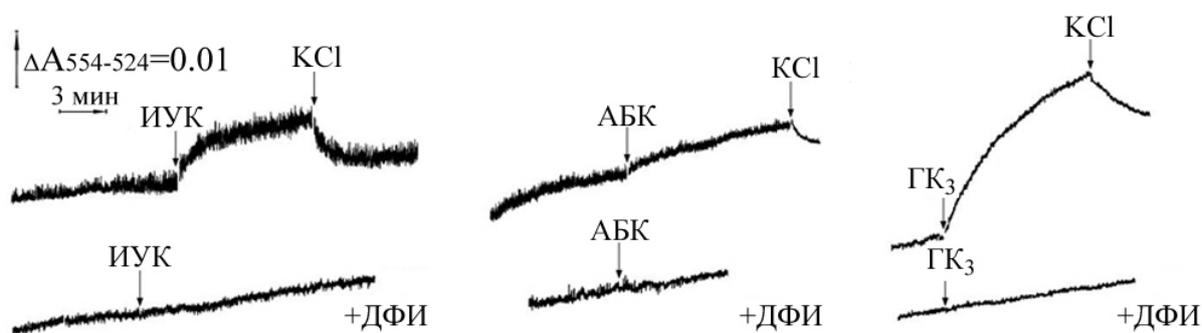


Рис. 9. Ингибирование фитогормон-индуцированной гиперполяризации плазмалеммы мужского гаметофита в присутствии блокатора НАДФН-оксидазы ДФИ.

Влияние H_2O_2 на поляризацию плазмалеммы

Перекись водорода, также как ИУК, АБК и ГК₃, приводила к гиперполяризации плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита (Рис. 10). Гиперполяризация плазмалеммы, вызванная действием H_2O_2 (4 мМ), оказалась чувствительна к тем же агентам, что и гиперполяризация, вызываемая гормонами. Блокатор H^+ -АТФазы ванадат (200 мкМ) полностью снимал эффект гиперполяризации плазмалеммы, вызванный перекисью водорода (Рис. 10). Присутствие в среде инкубации хелатора Ca^{2+} ЭГТА (500 мкМ), блокатора Ca^{2+} каналов верапамила (5 мкМ), а также конкурирующего с Ca^{2+} La^{3+} (100 мкМ) и блокатора НАДФН-оксидазы ДФИ (10 мкМ) приводило к снятию эффекта гиперполяризации мембраны под действием H_2O_2 (Рис. 10).

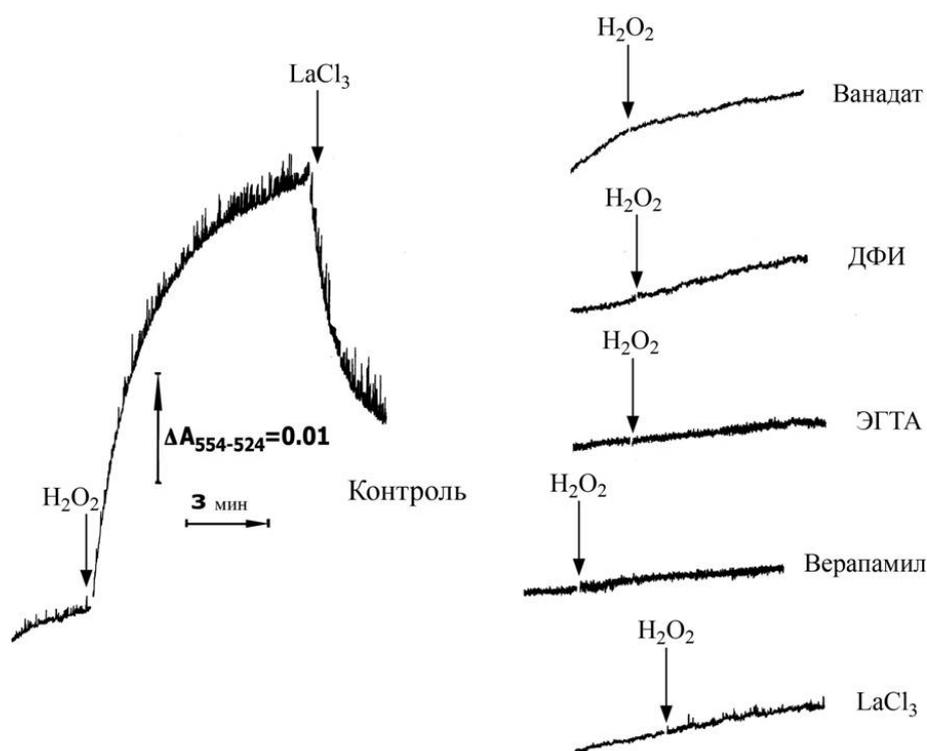


Рис. 10. Гиперполяризация плазмалеммы мужского гаметофита петунии под действием H_2O_2 и её блокирование в присутствии ортованадата, ДФИ, ЭГТА, верапамила а и $LaCl_3$.

Полученные данные подтверждают представления о медиаторной роли АФК в механизме действия АБК (Trouverie et al., 2008). АФК в клетках растений способны вызывать открытие ионных, в том числе Ca^{2+} каналов и тем самым приводить к генерации в них кальциевых сигналов, то есть к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле (Foreman et al., 2003). В свою очередь, это может служить фактором, обуславливающим активацию H^+ -АТФазы плазмалеммы за счет ее Ca -зависимого фосфорилирования с участием Ca -зависимых протеинкиназ (Palmgren, 2001), как это, например, происходит в случае АБК-индуцируемой стимуляции активности H^+ -

АТФазы в плодах винограда (Yu et al., 2006). Мы полагаем, что НАДФН-оксидаза в плазмалемме мужского гаметофита выступает в роли усилителя кальциевого сигнала, поскольку начального увеличения уровня Ca^{2+} в цитозоле, по-видимому, еще не достаточно для последующего запуска каскада событий, приводящих к стимуляции АТФ-зависимого протонного насоса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что экзогенные фитогормоны регулируют прорастание и полярный рост мужского гаметофита, влияя на пространственную организацию актинового цитоскелета и на транспорт ионов через плазмалемму.

ИУК стимулирует прорастание и полярный рост пыльцевых трубок, повышая содержание полимерного актина в их апикальной и субапикальной зонах. АБК и ГК₃ стимулируют прорастание и рост, перераспределяя актин в апикальную зону. Увеличение количества полимерного актина в апексе пыльцевой трубки ускоряет полярный рост за счёт интенсификации тока цитоплазмы и апикально-направленного везикулярного транспорта. С другой стороны, кинетин снижает количество полимерного актина по всей длине пыльцевой трубки, что тормозит её рост. Было показано, что разрушение актинового цитоскелета под влиянием латрункулина, ингибитора полимеризации актина, приводит к снижению содержания эндогенной ИУК и ингибированию роста мужского гаметофита.

Установлено, что в первые минуты воздействия ИУК, АБК и ГК₃, ускоряющих полярный рост, происходит гиперполяризация плазмалеммы, обусловленная стимуляцией электрогенной активности H^+ -АТФазы. Увеличение рН цитоплазмы мужского гаметофита, а именно её защелачивание, можно объяснить активацией H^+ -АТФазы, транспортирующей H^+ во внеклеточную среду (Андреев и др., 2007). Кинетин, тормозящий прорастание и рост, не вызывал изменений мембранного потенциала мужского гаметофита.

Связывание Ca^{2+} хелатором ЭГТА и блокирование кальциевых каналов верапамилем позволило продемонстрировать, что стимуляция электрогенной активности H^+ -АТФазы под влиянием фитогормонов зависит от поступления ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитоплазму. Фактором, обеспечивающим открытие Са-каналов плазмалеммы, вероятно, являются продуцируемые НАДФН-оксидазой АФК, которые таким образом могут включаться в механизм действия гормонов у растений.

ВЫВОДЫ

1. Фитогормоны регулируют прорастание и полярный рост мужского гаметофита, изменяя пространственную организацию актинового цитоскелета:
 - ИУК стимулирует рост пыльцевой трубки, повышая общее содержание полимерного актина. Основное увеличение происходит в апикальной и субапикальной зонах трубки;
 - АБК и ГК₃ стимулируют рост пыльцевой трубки, перераспределяя актин в апикальную зону;
 - кинетин ингибирует рост пыльцевой трубки, снижая содержание актина во всех её зонах.
2. Ингибитор полимеризации актина латрункулин Б вызывает нарушения пространственной организации цитоскелета, снижает содержание эндогенной ИУК и, как следствие, тормозит прорастание и блокирует полярный рост мужского гаметофита.
3. ИУК, АБК и ГК₃, стимулирующие прорастание и рост мужского гаметофита, вызывают гиперполяризацию его плазмалеммы. Цитокинин, ингибирующий эти процессы, не вызывает изменения мембранного потенциала плазмалеммы.
4. Фитогормон-индуцируемая гиперполяризация плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита обусловлена стимуляцией электрогенной активности Н⁺-АТФазы, функционирующей в этой мембране.
5. Стимуляция электрогенной активности Н⁺-АТФазы на плазмалемме мужского гаметофита под действием фитогормонов опосредована поступлением ионов Са²⁺ из внеклеточной среды и генерацией АФК, вероятно, обусловленной активностью НАДФН-оксидазы, также функционирующей в этой мембране.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Воронков А.С.** (2008) Факторы прорастания мужского гаметофита. В сб.: *Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых ЛОМОНОСОВ-2008*. Москва, с. 183–184.
2. **Андреев И.М., Воронков А.С., Тимофеева Г.В., Ковалева Л.В.** (2008) Стимуляция протон-транслоцирующей активности Н⁺-АТФазы плазмалеммы прорастающих пыльцевых зерен *Petunia hybrida* L. под действием экзогенных фитогормонов. В сб.: *Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений*. Годичное собрание ОФРР, Екатеринбург, с. 51–52.
3. **Ковалёва Л.В., Тимофеева Г.В., Воронков А.С., Захарова Е.В., Андреев И.М.** (2008) Факторы прорастания и роста *IN VITRO* мужского гаметофита петунии. В

сб.: XII Делегатский съезд Русского Ботанического Общества, Всерос. конф. «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века». Петрозаводск, т. Структурная биология, с. 272–275.

4. **Kovaleva L., Dobrovolskaya A., Timofeeva G., Voronkov A., Rakitin V.** (2008) Ethylene controls gametophytic-sporophytic interactions in progamic phase of Fertilization. *Physiol. Plant.*, Special Issue: Redox Signal Integration, p. 10-032.
5. **Andreev I.M., Voronkov A.S., Timofeeva G.V., Kovaleva L.V., Zakharova E.V.** (2008) Plasmalemma H^+ -pumping ATPase in germinating petunia pollen grains is sensitive to exogenous IAA and ABA. *Physiol. Plant.*, Special Issue: Redox Signal Integration, p. 10-058.
6. **Ковалёва Л.В., Тимофеева Г.В., Воронков А.С., Андреев И.М.** (2008) *In vitro* прорастающие пыльцевые трубки петунии как модель для изучения гормональной регуляции полярного роста. В сб.: IX Международная конференция “Биология клеток растений и биотехнология”, Звенигород, с. 184–185.
7. **Воронков А.С., Андреев И.М., Ковалёва Л.В.** (2009) Влияние ИУК на активность H^+ -АТФазы прорастающего мужского гаметофита петунии (*Petunia hybrida* L.). В сб.: Материалы III Международной школы молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», изд-во Саратов. ун-та, с. 32–34.
8. Воронков А.С., Андреев И.М., Ковалева Л.В. (2009) Гиперполяризация плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита петунии (*Petunia hybrida*) под действием ауксина: участие H^+ -АТФазы в трансдукции гормонального сигнала. В сб.: Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», ПНЦ РАН, т. 2, с. 653–657.
9. **Kovaleva L., Voronkov A., Timofeeva G., Andreev I.** (2009) Induced activation of plasmalemma H^+ -pumping ATPase underlines the hormone effects on germinating petunia male gametophyte. *Int. Symp. Auxins and Cytokinins in Plant Development*, Prague, p. 42
10. **Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Minkina Yu.V., Voronkov A.S.** (2009) Effects of flavonols and phytohormones on germination and growth of petunia male gametophyte. *Allelopathy J.*, **23(1)**, 51–62.
11. **Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Воронков А.С., Ковалева Л.В.** (2009) Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник-мужской гаметофит у петунии. *Физиология растений*, **56**, 437–114.
12. **Воронков А.С., Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Ковалева Л.В.** (2010) Стимуляция электрогенной активности H^+ -АТФазы плазмалеммы в прорастающем мужском гаметофите петунии экзогенным ауксином: медиаторная роль кальция и активных форм кислорода. *Физиология растений*, **57**, 435–432.