

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Брейгина Мария Александровна**

**Активные формы кислорода как регуляторы взаимодействия  
между мужским гаметофитом и спорофитом семенных растений**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва - 2024

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<i>Актуальность темы исследования.....</i>	<i>4</i>
<i>Степень разработанности темы исследования.....</i>	<i>4</i>
<i>Цели и задачи исследования.....</i>	<i>5</i>
<i>Объект исследования.....</i>	<i>6</i>
<i>Научная новизна.....</i>	<i>6</i>
<i>Теоретическая и практическая значимость работы.....</i>	<i>6</i>
<i>Методология диссертационного исследования.....</i>	<i>7</i>
<i>Положения, выносимые на защиту.....</i>	<i>7</i>
<i>Апробация результатов диссертации.....</i>	<i>8</i>
<i>Публикации по теме диссертации.....</i>	<i>8</i>
<i>Благодарности.....</i>	<i>8</i>
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1 НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА.....</b>	<b>9</b>
<i>1.1 Гидратация пыльцевого зерна.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2 Активация и поляризация пыльцевого зерна.....</i>	<i>11</i>
<i>1.3 Протеом пыльцевого зерна.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4 Изменение ионного статуса пыльцевого зерна.....</i>	<i>17</i>
<i>1.5 Значение АФК для прорастания пыльцевого зерна.....</i>	<i>21</i>
<i>1.6 Рыльцевый экссудат покрытосеменных растений.....</i>	<i>23</i>
<i>1.7 Особенности строения пыльцевых зёрен голосеменных растений.....</i>	<i>27</i>
<i>1.8 Особенности опыления у голосеменных растений.....</i>	<i>29</i>
<b>I.2 ПОЛЯРНЫЙ РОСТ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ.....</b>	<b>32</b>
<i>2.1 Цитологические основы полярного роста.....</i>	<i>32</i>
<i>2.2 Физиологические основы полярного роста.....</i>	<i>39</i>
<b>ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>61</b>
<b>1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>61</b>
<b>2. ОКРАШИВАНИЕ РЫЛЕЦ.....</b>	<b>63</b>
<b>3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЫ <i>IN VIVO</i> И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ..</b>	<b>64</b>
<b>4. ПОЛЯРОГРАФИЯ.....</b>	<b>65</b>
<b>5. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ШИРОКОПОЛОСНАЯ МИКРОСКОПИЯ.....</b>	<b>65</b>
<b>6. КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ.....</b>	<b>69</b>
<b>7. ПЭТЧ-КЛАМП.....</b>	<b>70</b>
<b>8. ЭПР СПЕКТРОСКОПИЯ.....</b>	<b>71</b>
<b>9. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ.....</b>	<b>72</b>
<b>10. ЗИМОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ.....</b>	<b>72</b>
<b>11. СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЯ.....</b>	<b>74</b>
<b>12. РЕНТГЕНО-СПЕКТРАЛЬНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ.....</b>	<b>74</b>
<b>13. ПЛАМЕННАЯ ФОТОМЕТРИЯ.....</b>	<b>75</b>
<b>14. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ.....</b>	<b>75</b>
<b>15. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ.....</b>	<b>75</b>
<b>16. ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>77</b>
<b>17. АНАЛИЗ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПЫЛЬЦЫ.....</b>	<b>79</b>
<b>18. РЕАГЕНТЫ, СДВИГАЮЩИЕ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗ.....</b>	<b>80</b>
<b>19. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.....</b>	<b>81</b>
<b>ГЛАВА III. РОЛЬ АФК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА.....</b>	<b>82</b>

III.1. Начальные этапы прорастания у ели.....	82
1.1 Выделение АФК во внеклеточную среду пыльцой ели.....	83
1.2 Значение генерации АФК для прорастания пыльцевых зёрен ели.....	86
1.3 АФК и битубулярное прорастание.....	88
1.4 Влияние экзогенных АФК на прорастание мужского гаметофита.....	95
1.5 АФК и жирнокислотный состав пыльцевых зёрен.....	96
III.2. Начальные этапы прорастания у табака.....	104
III.3. Рост пыльцевой трубки лилии и ели.....	111
3.1 Значение эндогенных и экзогенных АФК для роста пыльцевых трубок.....	111
3.2 Локализация АФК в пыльцевых трубках.....	115
<b>ГЛАВА IV. РОЛЬ ИОННОГО ТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОРАСТАНИЯ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА.....</b>	<b>121</b>
IV.1. Начальные этапы прорастания у цветковых растений.....	121
IV.2. Начальные этапы прорастания у ели.....	131
IV.3. Рост пыльцевой трубки.....	135
<b>ГЛАВА V. ВЛИЯНИЕ АФК НА ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ В МУЖСКОМ ГАМЕТОФИТЕ.....</b>	<b>144</b>
V.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -чувствительные Ca <sup>2+</sup> -проводящие каналы.....	144
V.2 Действие H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> на K <sup>+</sup> -проводящие каналы.....	150
V.3 Действие различных АФК на градиент pH в пыльцевой трубке.....	152
V.4 Действие различных АФК на градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке <i>IN VITRO</i> .....	155
V.6 Действие тяжёлых металлов на ионные токи мужского гаметофита и их возможная связь с АФК.....	160
6.1. Действие Ni <sup>2+</sup> на содержание в пыльцевых зёрнах Ca <sup>2+</sup> , ростовые процессы <i>in vitro</i> и сопутствующие цитологические изменения.....	160
6.2. Действие Ni <sup>2+</sup> на выходящий ток K <sup>+</sup> .....	170
6.3. Активация протонного тока под действием Cu <sup>2+</sup> .....	171
<b>ГЛАВА VI. АФК В РЕЦЕПТИВНЫХ ЖИДКОСТЯХ ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ И ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>175</b>
VI.1 Роль АФК в рыльцевом экссудате в контроле мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака и протопластах из трубок.....	176
VI.2 Образование O <sub>2</sub> <sup>-</sup> и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> на рыльцах табака и лилии.....	178
VI.3. Активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах табака и лилии.....	184
VI.4 Значение СОД для прорастания пыльцы табака <i>IN VIVO</i> .....	189
VI.5 Динамика продукции АФК на рыльцах цветковых растений из разных филогенетических групп.....	191
VI.6. Содержание АФК в опылительных каплях хвойных растений из разных филогенетических групп.....	200
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>212</b>
Выводы.....	214
<b>СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>215</b>

# Введение

## Актуальность темы исследования

Механизмы взаимодействия между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в прогамной фазе оплодотворения до настоящего времени изучены лишь в малой степени. По определению, прогамная фаза включает в себя разнообразные процессы, предшествующие попаданию мужских гамет в семязачаток и собственно оплодотворению. Именно эти процессы и обеспечивают возможность слияния гамет, и, тем самым, создают условия для успешного полового размножения и образования семян. Если анатомия этих процессов у разных групп растений в значительной мере изучена, то физиология данного этапа представляет собой актуальную проблему, для исследования которой применяются самые современные методические подходы в силу ее комплексного характера и технической сложности. В последние годы статьи с такой тематикой выходят в самых передовых журналах, но почти все они сфокусированы на молекулярно-генетическом и биохимическом аспектах, а значит, на белках и пептидах, участвующих в межклеточной коммуникации (Somoza et al. 2021; Yang et al. 2021b; Xiong et al. 2023). В то же время, известно, что низкомолекулярные вещества являются важными сигнальными агентами (Shah et al. 2019; Zhang et al. 2020; Sankaranarayanan et al. 2020; Scholz et al. 2020). Кроме того, данные, полученные с помощью молекулярно-генетических подходов, относятся главным образом к немногим отдельным видам модельных растений, практически не затрагивая проблему эволюции репродуктивных взаимодействий. При этом эффективное взаимодействие между мужским гаметофитом и спорофитными тканями – одно из важнейших эволюционных приобретений, которое обеспечило растениям широкие репродуктивные возможности. Из низкомолекулярных сигнальных агентов наиболее универсальными считаются активные формы кислорода (АФК) и ассоциированные с ними токи неорганических ионов. На соматических клетках растений экспериментально установлено, что АФК обладают возможностями передачи сигнала между клетками, а одной из основных мишеней для них являются ионные каналы плазмалеммы, которые транслируют сигнал внутрь клетки (Demidchik 2018; Mishra et al. 2022). Вопрос о том, в какой мере эти представления применимы к репродуктивным процессам у растений, ранее не изучали.

Для того, чтобы выявить функции АФК в процессах взаимодействия между пыльцевым зерном и женскими тканями спорофита, необходимо было исследовать с использованием упрощенных модельных систем влияние АФК на мужской гаметофит, ион-транспортные системы, чувствительные к АФК, а также доказать присутствие определенных АФК на рыльце и их значимость для прорастания.

## Степень разработанности темы исследования

Первые опыты выращивания пыльцы *in vitro* были описаны в конце XIX века: сначала пыльцу проращивали в среде, содержащей тростниковый сахар или крахмал (Mangin 1886), но

уже в начале XX века были опубликованы две работы по культивированию пыльцы в искусственной среде, причем пыльцевые трубки достигали значительной длины (Brink 1924). Поскольку культивирование пыльцы – доступная и удобная методика, позволяющая упростить экспериментальную систему и учитывать только контролируемые параметры среды, основной массив данных по физиологии прорастания мужского гаметофита за прошедшие 100 лет был получен *in vitro*.

Однако такое упрощение – одновременно и серьезное органичение, и в последнее время все больше работ посвящено взаимодействию мужского гаметофита с женскими тканями спорофита, то есть, прорастанию пыльцы *in vivo*. При этом регуляторные факторы, обнаруженные *in vitro*, проверяются на эффективность в интактной системе и различных ее модификациях (Hiscock and Allen 2008; Little et al. 2014; Lopes et al. 2019). Поскольку поиск информационных агентов, участвующих в «диалоге полов», интенсивно происходил в последние годы (Mizuta and Higashiyama 2018; Ge et al. 2019), было важно первыми изучить низкомолекулярное общение между спорофитными тканями и пыльцой, сфокусировавшись на АФК и мишенях для них.

К началу нашей работы представления о генерации активных форм кислорода на рыльцах цветковых растений были весьма ограничены. С помощью неспецифического окрашивания исследователи из группы Хисхока показали, что АФК образуются на рыльцах ряда растений в фазе фертильности (McInnis et al. 2006; Hiscock et al. 2007); позже было выявлено их накопление в завязи (Duan et al. 2014), необходимое для успешного разрыва трубки и выхода спермиев. Другие данные касались эндогенной продукции АФК в пыльцевой трубке табака. Подавление экспрессии НАДФН-оксидазы ингибировало ее рост, при этом обработка  $H_2O_2$  восстанавливала скорость роста до контрольного уровня (Potocký et al. 2007). На кафедре изучали более ранние этапы того же процесса и показали, что пероксид водорода в низких концентрациях стимулирует прорастание (Смирнова et al. 2009). Позже этот эффект связали с функционированием оболочки пыльцевого зерна при прорастании: баланс между различными АФК в апертуре и вне их необходим для запуска полярного роста (Smirnova et al. 2013). Из этих данных можно было сделать вывод о том, что АФК синтезируются как в пыльцевом зерне, так и на рыльце пестика, и что они могут влиять на прорастание пыльцевых зёрен. Однако, оставался неизученным баланс, динамика и физиологическое значение продукции АФК на рыльцах, а также наличие или отсутствие аналогичного процесса у голосеменных растений. Кроме того, не был раскрыт механизм восприятия АФК сигнала от женских тканей пыльцой и не установлена роль АФК, синтезируемых самим мужским гаметофитом.

## **Цели и задачи исследования**

**Цель настоящей работы** – установить функциональную роль АФК во взаимодействии пыльцевого зерна и спорофита в прогамной фазе оплодотворения. В связи с этим были поставлены следующие задачи исследования:

1. Исследовать наличие АФК в рецептивных жидкостях растений разных систематических групп, включая экссудаты рыльца покрытосеменных и опылительные капли хвойных растений, выявить закономерности генерации АФК и их взаимопревращения;
2. Определить роль АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна цветковых и хвойных растений *in vitro*; выявить возможное взаимодействие АФК и ион-транспортных белков в модельных системах;
3. Выявить участие АФК в контроле прорастания пыльцы *in vivo* и *semi-in-vivo* на примере *Nicotiana tabacum* L. Изучить регуляторную роль различных АФК у растений эволюционно отдаленных таксонов покрытосеменных растений.

### **Объект исследования**

В работе использовали пестики и пыльцевые зерна лилии (*Lilium longiflorum* Thunb.) и табака (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Petit Havana SR1'). Для исследования экссудата и окрашивания рылец использовали барбарис (*Berberis vulgaris* L.), древовидный пион (*Paeonia × suffruticosa*) и кирказон (*Aristolochia manshuriensis* Kom.). Для сбора опылительных капель использовались растения туи (*Thuja occidentalis* L.), тиса (*Taxus baccata* L.), сосны (*Pinus sylvestris* L.) и ели (*Picea pungens* Engelm.).

### **Научная новизна**

Впервые картированы АФК в растущих пыльцевых трубках голосеменных и покрытосеменных растений, выявлена чувствительность пыльцевых трубок к пероксиду водорода и другим АФК, обнаружены мишени для АФК на плазмалемме вегетативной клетки пыльцевого зерна, комплексом методов продемонстрирована связь редокс-метаболизма и ионного транспорта на пыльцевых трубках и протопластах, полученных из них. Выявлена зависимость прорастания у голосеменных и цветковых растений от ионного транспорта и мембранного потенциала. Впервые с применением комплекса методов, включая ЭПР, изучена динамика продукции АФК на рыльцах растений из разных систематических групп до и после опыления, оценена активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах и выявлено значение взаимопревращения АФК для эффективности опыления. Впервые обнаружена продукция АФК в опылительных каплях хвойных растений. Открыт феномен биполярного прорастания у голосеменных растений и выявлена связь этого явления с генерацией АФК.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Коммуникация между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в прогамной фазе оплодотворения – актуальная проблема, которая имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Разработав концепцию регуляции прорастания пыльцевого зерна

низкомолекулярными веществами, в частности, АФК и неорганическими ионами, мы заложили основу для дальнейшей интеграции знаний о контроле опыления и оплодотворения со стороны женских тканей спорофита. Особое значение имеет обнаружение этой регуляторной системы у хвойных растений и представителей базальных покрытосеменных. Эволюция репродуктивных механизмов у растений – важная проблема для фундаментальной науки. Полученные в работе результаты могут быть использованы при дальнейшем исследовании проблем физиологии и эмбриологии растений в научно-исследовательских учреждениях. Также результаты могут использоваться в учебном процессе в университетах и других ВУЗах, ведущих подготовку биологов широкого профиля.

Полярный рост пыльцевой трубки и ее взаимодействие со спорофитом обеспечивают успешное оплодотворение и получение урожая зерновых и плодовых культур, воспроизводство лесных массивов и насаждений, размножение сельскохозяйственных и декоративных растений. Этот процесс может быть точкой приложения усилий для повышения урожайности и ускорения жизненного цикла в условиях антропогенной нагрузки на экосистемы и агросистемы. Особенно остро стоит проблема воспроизводства редких растений со сниженной семенной продуктивностью, в том числе, хвойных растений, многие из которых относятся к медленно растущим. У многих хвойных растений от опыления до оплодотворения проходят год или более. Отсутствие знаний о механизмах, обеспечивающих репродуктивный успех у таких растений, делает их размножение в искусственных условиях сложной задачей.

### **Методология диссертационного исследования**

Диссертационная работа выполнена с использованием широкого спектра физиолого-биохимических и биофизических методов: для выполнения разных задач применялись количественная и качественная флуоресцентная микроскопия, ЭПР-спектроскопия, электрофорез и зимография, спектрофотометрия и спектрофлуориметрия, проточная цитометрия, пэтч-кламп, протеомный анализ, электронная микроскопия и другие подходы, подробно описанные в разделе «Материалы и методы». Разработан неинвазивный метод сбора экссудата рыльца, позволивший выявить в нём АФК.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Активные формы кислорода и трансмембранный перенос ионов вовлечены в регуляцию прорастания мужского гаметофита семенных растений *in vitro*; у голосеменных и цветковых растений их роль принципиально не различается;
2. В мужском гаметофите цветковых растений системы ионного транспорта являются мишенями для действия АФК;
3. Активные формы кислорода являются значимыми регуляторными факторами в составе экссудата рыльца цветковых растений;

4. Разные виды голо- и покрытосеменных растений различаются системами АФК-регуляции прогамной фазы оплодотворения. Особенности отдельных групп растений обусловлены преобладанием той или иной активной формой кислорода, а также концентрацией АФК в рецептивной жидкости.

### **Апробация результатов диссертации**

Результаты исследований были представлены на многих научных конференциях и форумах: X Съезд Общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 2023), Научно-практическая конференция, посвященная 125-летию открытия двойного оплодотворения (Москва, 2023), Ломоносовские чтения (Москва, 2021), IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), II Международный Симпозиум "Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений" (Уфа, 2017), V Международная школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», посвященная памяти профессора Т.Б. Батыгиной (Санкт-Петербург, 2016), Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology (Прага, Чехия, 2015), XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction (Порту, Португалия, 2014), Международная научная конференция «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), Microscopy Conference (Регенсбург, Германия, 2013), Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, Беларусь, 2013), XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction (Бристоль, Великобритания, 2010).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 24 статьи в журналах из списка ВАК и /или в журналах Web of Science/Scopus.

### **Благодарности**

Благодарю всех соавторов и коллег, принимавших участие в исследованиях. Студенты и аспиранты, которые являлись соавторами представленных данных:

- Максимов Н.М. (2014-2019)
- Щекалева О.И. (2021-н.вр.)
- Подолян А.О. (2018-2021)
- Бабушкина К.О. (2022-н.вр.)
- Евменьева А.А. (2017-2019)
- Шалюхина С.К. (2022-н.вр.)

Финансирование исследований:

- РФФИ 08-04-00746-а (2008 – 2010), 11-04-00605 (2011 – 2013)
- РФФИ 14-04-31431мол\_а (2014 – 2015), 19-04-00282а (2019 – 2021)
- РФФИ 19-74-00036 (2019 – 2021), 21-74-10054 (2021 – 2024).



# Глава I. Обзор литературы

## I.1 Начальные этапы прорастания пыльцевого зерна

Процесс подготовки пыльцевого зерна к прорастанию включается в себя целый комплекс физиологических и цитологических процессов, которые происходят у цветковых растений, как правило, довольно компактно по времени. Этот комплекс можно, во-первых, разделить на два смысловых блока: регидратация пыльцевого зерна и активация метаболизма вегетативной клетки. Первый процесс происходит быстрее и задействует в основном физико-химические механизмы, такие, как пассивный ток воды и сопутствующее ему изменение формы оболочки (гармомегатия). Второй процесс включает в себя как физиологические механизмы активации (клеточное дыхание, изменение ионного состава цитозоля и мембранного потенциала), так и цитологические перестройки (изменение структуры цитоскелета, скопление везикул в области будущего прорастания и т.п.).

В сравнении с ростом пыльцевой трубки, который можно наблюдать в системе *in vitro* в течение довольно продолжительного времени, процесс активации – короткий этап, который имеет разную длительность у разных видов растений и, соответственно, менее удобен для изучения. Кроме того, пыльцевое зерно покрыто массивной оболочкой, которая затрудняет изучение физиологии и цитологии вегетативной клетки. В связи с этим объем данных, полученных на непроросших пыльцевых зёрнах несравнимо меньше, чем тот, что относится к полярному росту пыльцевых трубок.

### 1.1 Гидратация пыльцевого зерна.

Одним из важнейших параметров, меняющихся в процессе развития и прорастания пыльцевого зерна, является степень оводненности (Firon et al. 2012). Пыльца большинства видов растений покидает пыльники/шишки в дегидратированном состоянии. Снижение метаболической активности, во-первых, повышает устойчивость мужского гаметофита к различным воздействиям со стороны окружающей среды, во-вторых, продлевает срок распространения и хранения пыльцы до её прорастания, а в-третьих, позволяет ей экономить ограниченные энергетические ресурсы, что особенно актуально для голосеменных (Stanley 1971; Hafidh et al. 2016). Когда сухое, находящееся в покое пыльцевое зерно попадает на рыльце пестика или на чешуи женской шишки, оно регидратируется, после чего начинается активация всех метаболических процессов, таким образом, начало активации зависит от (ре)гидратации.

Регидратация, в свою очередь, зависит от притока воды из рыльца после адгезии пыльцевого зерна. Скорость, с которой достигается соответствующий водный баланс, будет зависеть как от способности рыльца обеспечивать направленное движение воды, так и от особенностей пыльцевого зерна. Для зрелой прорастающей пыльцы период от адгезии до

появления трубки зависит от степени гидратации зерен в момент захвата (Firon et al. 2012). В частности, для ряда злаков характерна стремительная гидратация, и пыльцевая трубка у них появляется уже через несколько минут (Heslop-Harrison 1979). Гидратация включает в себя сопутствующие повышению оводненности изменения объема вегетативной клетки и структуры пыльцевой оболочки. Для последней характерно явление гармомегатии – термин был введен Водхаусом для обозначения связи между объемом и функциональным состоянием спор папоротников и пыльцевых зёрен (Wodehouse 1936). Гармомегатные изменения заключаются в «складывании» пыльцевых зёрен при высыхании и их расправлении при гидратации (Heslop-Harrison 1975), важную роль в этом процессе играют апертуры, которых может быть разное количество (см. атласы, содержащие иллюстрации разных вариантов) (Hesse et al. 2009; Halbritter et al. 2018). Считается, что наиболее древний вариант – одноапертурные зёрна, характерные для палеозойских Кордаитовых. Апертура, служащая для выхода трубки, у папоротников уже использовалась для складывания при гармомегатных изменениях объема. Такая многофункциональность апертуры характерна для беннититовых, саговников и гинкго (Wodehouse 1936; Sowunmi 1968).

В гидратации пыльцевого зерна на рыльце важную роль играет также самый верхний слой оболочки пыльцевого зерна – трифина. Нарушения отложения трифины у Brassicacea откладывают или блокируют гидратацию (Shi et al. 2015). Так, было показано, что мутации по ферментам синтеза длинноцепочечных жирных кислот нарушают отложение трифины, что приводит к низкой эффективности гидратации пыльцевых зёрен и, соответственно, к мужской стерильности (Firon et al. 2012). Гидравлический контакт может быть восстановлен в этих мутантных зернах путем добавления очищенных триацилглицеридов (Wolters-Arts et al. 1998).

С точки зрения ультраструктуры зрелое (т.е. покоящееся) пыльцевое зерно изучено у многих видов растений (Pierson and Cresti 1992). В немногих исследованиях, однако, проводилось сравнение сухой и гидратированной пыльцы – например, это было сделано для *Arabidopsis*: в сухой пыльце компоненты цитоплазмы вегетативной клетки распределены равномерно, за исключением липидных тел, которые концентрируются вокруг мужских гамет (Van Aelst et al. 1993). В процессе регидратации в ультраструктуре вегетативной клетки происходят изменения. Липидные тельца распределяются в цитоплазме и формируют ассоциации с ЭПР. Крахмальные зёрна в пластидах растворяются. Формируются два типа везикул (крупные и мелкие) и вакуоли с осмиофильным содержимым, цистерны ЭПР содержат электронно-плотный субстрат (Van Aelst et al. 1993). Эти изменения маркируют подготовку к запуску синтетических процессов.

## 1.2 Активация и поляризация пыльцевого зерна.

После гидратации в пыльцевом зерне с физиологической точки зрения происходит масштабная перестройка метаболизма: активация синтезов, дыхания и ионного транспорта, а с цитологической – структурная реорганизация цитоплазмы, связанная со становлением оси полярности. Так, у петунии и табака были обнаружены следующие изменения ультраструктуры цитоплазмы вегетативной клетки, отражающие активацию ее метаболизма: появление полисом, изменение структуры и распределения диктиосом, распад массивных стопок цистерн гранулярного ЭПР, которые в зрелом пыльцевом зерне занимали центральную часть цитоплазмы вегетативной клетки, соседствуя с генеративной клеткой и вегетативным ядром, на отдельные цистерны (Herrero and Dickinson 1981; Cresti et al. 1985). Выходу трубки предшествовали процессы миграции ядерного комплекса, а также везикул Гольджи и других органелл по направлению к функциональной поре, что, по сути, являлось цитологической стороной поляризации (Herrero and Dickinson 1981; Cresti et al. 1985). Позже было установлено, что процесс поляризации запускается ещё до полной активации метаболизма (по крайней мере, *in vivo*), причем первые проявления наблюдаются в поверхностных структурах: у табака в области функциональной поры выявлялся дополнительный внутренний слой интины и резко увеличивалась поверхность плазмалеммы за счет формирования глубоких впячиваний (Мазина et al. 2002). В области цитоплазмы, прилежащей к функциональной поре, проявлялось зональное распределение органелл (везикул, митохондрий и ЭПР) – набор, необходимый для синтеза новой клеточной стенки для будущей пыльцевой трубки.

Очевидно, что все перестройки, которые происходят в цитоплазме, требуют затрат энергии, а в состоянии покоя пыльцевое зерно образует очень мало АТФ, если такой синтез вообще возможен. Поэтому понятно, что одним из ранних процессов, которые активируются в процессе выхода пыльцевого зерна из физиологического покоя, является дыхание. В литературе широко обсуждается дыхательная цепь митохондрий и образующийся в результате АТФ как основной источник энергии во время прорастания пыльцы (Selinski and Scheibe 2014). Действительно, пыльца содержит примерно в 20 раз больше митохондрий на клетку, чем соматические клетки (у кукурузы), и дышит в 10 раз быстрее, чем нормальные вегетативные ткани (у лилии и табака) (Dickinson 1965, 1968; Selinski and Scheibe 2014). Традиционно отслеживают скорость поглощения кислорода и/или выделения  $\text{CO}_2$ , и у табака, например, она возрастает в течение первых 10 минут, а к 20 минутам выходит на плато, поскольку активация метаболизма заканчивается и пыльцевое зерно готовится к выходу трубки (Матвеева et al. 2002). У лилии динамику дыхательной активности можно разделить на 3 фазы (Dickinson 1965). В фазе 1 (до появления пыльцевой трубки) дыхание быстро возрастает в течение примерно 30 минут (у лилии). После этого, когда запускается полярный рост (фаза 2), частота дыхания

снижается примерно до 40% от начальной. Заключительная фаза представляет собой стадию наиболее интенсивного дыхания. Во время этой фазы рост пыльцевой трубки продолжается, а уровень дыхания в два раза превышает таковой для фазы 2 (Selinski and Scheibe 2014). У томата график дыхания близок по форме к логарифмической функции, быстро возрастая в первые минуты и замедляя свой подъем после появления пыльцевых трубок, однако при оптимальной температуре (25°C) выхода на плато не наблюдалось, в течение 7 часов измерения активное выделение CO<sub>2</sub> продолжалось (Karanos et al. 2010).

Следует отметить, что в трёхклеточной пыльце скорость активации дыхания значительно выше, чем в двухклеточной, что соответствует различной скорости их прорастания (Hoekstra 1979). Так, уровень дыхания трехклеточной пыльцы триполиума (*Aster tripolium*) пыльцы после регидратации во влажной атмосфере был в 3-4 раза выше, чем двухклеточной пыльцы рогоза (*Typha latifolia*), но пыльца рогоза поддерживала стабильный уровень дыхания вдвое дольше, чем пыльца триполиума (Hoekstra and Bruinsma 1975). Последующий перенос пыльцы в жидкую среду приводит к дальнейшей интенсификации дыхания.

У голосеменных процесс активации отличается, во-первых, в связи со скоростью прорастания, а во-вторых, в связи с присутствием запаса углеводов – крахмала, который может накапливаться и растворяться в зависимости от потребностей мужского гаметофита и наличия сахаров в среде прорастания. Так, дыхание в суспензии пыльцевых зёрен горной сосны (*Pinus mugo*) не делится на три фазы, а возрастает линейно, начиная с 2 часов. До этого момента, сразу после гидратации, наблюдается короткая лаг-фаза, во время которой дыхание постепенно возрастает (Nygaard 1969). Анализ содержания АТФ показал, что в этот период наблюдается истощение запасов АТФ, по-видимому, сформированных в пыльцевом зерне до созревания. Когда начинается поглощение кислорода, уровень АТФ восстанавливается, а затем постепенно увеличивается до момента появления пыльцевой трубки (около 16 часов) (Nygaard 1973). Следует отметить, что пыльцу инкубировали в среде с углеводным компонентом, и она могла синтезировать крахмал.

Позже фазы всё-таки условно были выделены для удобства, причем фаза I охватывала первые 12 часов, вторая – следующие 12 часов. Условно можно сказать, что первая фаза – непроросшие зёрна, а вторая – растущие трубки. Изучая влияние доступности углеводов на дыхание, авторы выяснили, что в присутствии оптимальных углеводов – сахарозы либо фруктозы – дыхание во II фазе примерно в два раза выше, чем в I, при этом происходит не только синтез АТФ, но и интенсивный синтез крахмала, что является характерной особенностью пыльцевых зёрен хвойных растений (Nygaard 1977).

У псевдотсуги тисолистной прорастание происходит медленнее, чем у сосны (Muren et al. 1979). Уровень дыхания оставался высокой и постоянным в течение первых 36 часов, а затем

резко увеличивался (по-видимому, в связи с появлением трубок), в то время как содержание АТФ быстро увеличивалось уже в течение первых 8 часов и оставалось высоким до конца периода наблюдения (Muren et al. 1979). В течение первых 24 ч в культуре содержание АТФ увеличилось на 86%, в то время как содержание АДФ и АМФ уменьшилось. Следует отметить, что, в отличие от сосны, псевдотсуга способна поддерживать рост трубок без добавления сахаров в среду (Muren et al. 1979). Возможно, с этим связан относительно постоянный уровень дыхания в суспензии. Другими авторами было установлено, что у этого дерева существует прямая корреляция между уровнем дыхания пыльцы и её фертильностью, в связи с чем они предлагали использовать именно дыхание (а не прорастание, которое занимает длительное время и требует стерильных условий) для быстрой оценки качества пыльцы псевдотсуги в лесных насаждениях (Binder and Ballantyne 1975).

Помимо измерения активности дыхания, о важности получения энергии свидетельствуют и системные исследования – протеомные и транскриптомные данные, полученные для различных стадий созревания и прорастания пыльцевых зёрен (Holmes-Davis et al. 2005; Ischebeck et al. 2014; Rutley and Twell 2015). Все авторы отмечают значительную долю белков, связанных с энергетическим метаболизмом, что указывает на важное значение получения энергии при прорастании пыльцы и быстром росте пыльцевых трубок. Однако, есть и противоречивые моменты. Так, протеомные данные предполагают, что в пыльце отсутствует белок альтернативной оксидазы (АОХ) (Zou et al. 2009; Rafinska et al. 2010). Эта группа данных предполагает, что шунт, в котором участвует альтернативная оксидаза, не требуется во время развития пыльцы и роста трубок, а вместо этого необходимо полноценное дыхание, генерирующее максимум АТФ (Selinski and Scheibe 2014). Эта гипотеза противоречит тому факту, что транскрипты АОХ1А и АОХ1В были обнаружены в пыльце *Arabidopsis thaliana* (Wang et al. 2008), а физиологические исследования на табаке с применением ингибиторного анализа указывают на то, что она в пыльце есть и влияет на цитоплазматический рН в вегетативной клетке (Матвеева et al. 2002).

Одним из основных «потребителей» энергии, которая высвобождается за счет дыхания, является синтез белка. Часть белков хранится в зрелых пыльцевых зёрнах, но гораздо больше запасенных мРНК, с которых в пыльце начинается активная трансляция. При этом есть и транскрипция, то есть, синтез *de novo*, особенно у голосеменных растений (Fernando et al. 2001).

В пыльцевых зёрнах цветковых растений активный синтез белка начинается очень рано, что было обнаружено в серии классических работ на традесканции и кукурузе. В пыльце традесканции отдельные рибосомы, мРНК, рибосомы и тРНК агрегируются в полисомы в течение 2 минут, что коррелирует с её быстрым прорастанием *in vitro* (Mascarenhas 1971). Если в покоящемся пыльцевом зерне в полисомы собрано 38% рибосом, то в процессе активации

доля полисом резко возрастает, через 5 минут она составляет 55%, после чего замедляется и в момент прорастания (10 мин) перестает меняться (60-62%) (Mascarenhas and Bell 1969). Синтетическую активность рибосом проверяли с помощью радиоактивной метки, максимальную активность показали полисомные комплексы на всех стадиях. Следует отметить, что количество полисом в зрелой пыльце уже само по себе указывает на высокую степень готовности белок-синтезирующего аппарата к прорастанию. Авторы предположили, что большую часть мРНК пыльца сохраняет до входа в покой, чтобы быстрее начать синтез, и это предположение подтвердилось – полипептиды на основании поли-А-РНК из пыльцы кукурузы были синтезированы в бесклеточной трансляционной системе. Оказалось, что одно пыльцевое зерно содержит 352-705 пг общей РНК и 8.9-17.8 пг поли-А-РНК (Mascarenhas et al. 1984).

Позже многие виды цветковых растений изучались на предмет зависимости прорастания от транскрипции и трансляции. Основываясь на большинстве изученных на тот момент цветковых растений, Маскаренас (1993) пришел к выводу, что мРНК, необходимые для прорастания и раннего удлинения трубок, уже присутствуют в пыльцевых зернах при раскрытии пыльников (Mascarenhas 1993). То же самое верно и для белков, которые необходимы для прорастания пыльцы. Так, у бальзамина циклогексимид не подавляет прорастание пыльцы и не блокирует рост трубок, но препятствует образованию мужских гамет, по-видимому, за счёт отсутствия достаточного количества белков для построения веретена деления (Shivanna et al. 1974b). У пажитника наблюдалась похожая ситуация, хотя пыльцевые зёрна прорастали несколько хуже, а трубки были короче в присутствии ингибитора, но всё же самым ярким эффектом был именно блок митоза (Shivanna et al. 1974a). Похожие данные были получены для капусты: на прорастание пыльцы и начальный рост трубок *in vitro* циклогексимид существенно не влиял, хотя он блокировал систему самонесовместимости в случае аппликации на рыльце (Roberts et al. 1984). Похоже, что в большинстве случаев у цветковых растений синтез новых белков необходим только для роста пыльцевых трубок, но белки для прорастания запасены в период созревания гаметофита в пыльнике.

У хвойных растений ситуация кардинально отличается: ещё в 60х годах XX века выяснили, что ядра генеративной клетки и клетки трубки активно синтезируют РНК на ранних стадиях прорастания пыльцы *Pinus ponderosa* (Young and Stanley 1963). Этот вывод был позже подтвержден на других видах сосны. Так, Фернандо с соавторами анализировал синтез РНК и белков у калифорнийской горной сосны (*Pinus monticola*), а также других хвойных растений: четырёх видов сосны, двух видов ели, гималайского кедра и тихоокеанской серебристой пихты (Fernando et al. 2001). Такой синтез происходит активно в пыльце всех исследованных растений, на что указывают эффекты ингибиторов, таких как актиномицин D и циклогексимид, соответственно. Пыльцевые зерна прорастают в присутствии актиномицина D, но дальнейшее

удлинение трубки подавляется. Это говорит о том, что РНК, необходимые для прорастания, уже доступны в зрелой пыльце, но удлинения трубки зависит от синтеза новых РНК (Fernando et al. 2001). Последнее подтверждают эксперименты с ингибиторами деацетилазы гистонов, которая поддерживает отдельные участки хроматина в неактивном состоянии (Wolffe 1996) – изменения активности фермента вызывали многочисленные ростовые аномалии, начиная от нарушенного градиента  $Ca^{2+}$  и заканчивая измененным отложением компонентов клеточной стенки (Cui et al. 2015). Эти опыты продемонстрировали важность состояния хроматина для роста пыльцевой трубки ели Вильсона (Cui et al. 2015), что указывает на его активное использование.

Что касается трансляции, то с использованием циклогексимида для белой западной сосны (*Pinus monticola*) было показано, что многие белки, необходимые для прорастания и удлинения трубок, еще не доступны в зрелой непроросшей пыльце. У *P. monticola* эти белки, по-видимому, синтезируются в начале прорастания пыльцы и во время удлинения трубки. Эффекты ингибирования транскрипции и трансляции у восьми других хвойных растений такие же, как у *P. monticola*, что указывает на общую тенденцию (Fernando et al. 2001).

Итак, в пыльце цветковых растений сначала используются запасенные белки, параллельно, по-видимому, транслируются подготовленные в процессе созревания мРНК, а затем запускается транскрипция. У голосеменных растений транскрипция и трансляция начинаются параллельно с активацией метаболизма. Интересным был вопрос, какие именно белки транслируются и используются в первую очередь, и на этот вопрос помогли ответить протеомные исследования.

### 1.3 Протеом пыльцевого зерна

Какие же белки присутствуют в зрелой пыльце с тем, чтобы остаться там и использоваться на начальных этапах прорастания? Для ответа на этот вопрос изучали протеомные профили зрелой пыльцы различных видов.

Так, в зрелой пыльце *Arabidopsis* половина идентифицированных белков участвует в метаболизме (20%), выработке энергии (17%) или построении клеточных структур (12%) (Holmes-Davis et al. 2005); эти проценты аналогичны тем, которые определены для транскриптома пыльцы, и это сходство согласуется с идеей о том, что в дополнение к мРНК зрелое пыльцевое зерно содержит белки, необходимые для прорастания и быстрого роста пыльцевой трубки.

В зрелой пыльце риса большинство белков из обнаруженных 322 связано с передачей сигнала (10%), с ремоделированием оболочки (11%), с синтезом, сборкой и деградацией белков (14%), а также с углеводным и энергетическим метаболизмом (25%) (Dai et al. 2006). Авторы также выявили несколько новых важных белков, в основном участвующих в передаче сигнала

(таких как протеинкиназы, белки, взаимодействующие с рецепторными киназами, ингибиторы диссоциации гуанозин-5'-дифосфата, белки, содержащие домен С2, циклофилины), синтезе, сборка и деградации белков, а также ремоделировании и метаболизме клеточной стенки (Dai et al. 2006).

Белки, чей синтез активируется при прорастании пыльцы, можно идентифицировать, сравнивая протеомные профили зрелой пыльцы и прорастающей пыльцы. Такие сравнения были проведены для нескольких видов. Так, у риса, по сравнению с покоящейся пыльцой, в прорастающей пыльце широко представлены белки, задействованные в метаболизме углеводов, метаболизме белков и ремоделировании клеточной стенки (Sheoran et al. 2009). Другие, участвующие в динамике цитоскелета, метаболизме нуклеотидов и аминокислот, передаче сигнала и ответе на стресс, также показали более высокую экспрессию в прорастающей пыльце. Белки, отвечающие за регуляцию транскрипции и ионный транспорт, не отличались в двух состояниях пыльцы, а каталаза и LEA белки присутствовали в меньшем количестве. Ряд белков, включая олеозин, круциферин и енолазу, выделялись в среду при прорастании пыльцы, что указывает на их потенциальную роль во взаимодействии пыльца-рыльца (Sheoran et al. 2009).

Похожие результаты были получены и для *Arabidopsis* (Zou et al. 2009). Воспроизводимые значимые различия между зрелой пыльцой и пыльцевыми трубками были показаны для 40 белков. Анализ функциональных категорий показал, что эти дифференциально экспрессируемые белки в основном участвуют в передаче сигналов, построении клеточных компонентов, транспорте, стрессовых ответах, транскрипции, метаболизме и производстве энергии. Паттерны изменений на уровне белков предполагают важную роль белков, связанных с энергетическим метаболизмом, в росте пыльцевых трубок, сопровождаемом активацией пути стрессовой реакции и модификациями клеточной стенки (Zou et al. 2009).

У риса в ходе такого же сравнения (но проведенного с более высокой точностью) было идентифицировано 160 дифференциально экспрессируемых белковых пятен, которые соответствуют 120 различным видам белков. Эти белки участвуют в различных клеточных и метаболических процессах с очевидным функциональным уклоном в сторону метаболизма клеточной стенки, синтеза и деградации белка, динамики цитоскелета и энергетического метаболизма (Dai et al. 2007a). При этом у злаков отличия между зрелой и прорастающей пыльцой по мРНК генов минимальны. Так, у риса профиль транскриптома проросшей пыльцы достоверно и положительно коррелировал с профилем зрелой пыльцы (Wei et al. 2010b), на основании чего считается, что гены, экспрессируемые в пыльце позднего созревания, транслируются для использования во время прорастания пыльцы и роста трубок, в большей степени, чем у *Arabidopsis* и, возможно, других двудольных растений, у которых большое



количество генов транскрибируется *de novo* во время гидратации и активации пыльцы (Kim et al. 2019).

Что касается голосеменных, исследования, сравнивающие белковые профили зрелой и проросшей пыльцы, проводились на разных видах сосны (*Pinus taeda*, *P. monticola* и *P. bungeana*) в 1990-е – начале 2000х на методическом уровне того времени. Оказалось, что они по большому счёту сходны, как и в случае цветковых растений (Frankis Jr. 1990; Fernando et al. 2001, 2005; Nao et al. 2005). Пыльца и пыльцевые трубки белой восточной сосны (*P. strobus*) имеют примерно 94% сходства по белкам (Fernando 2005) – 57 дифференциально представленных белка. Это показывает, что большинство белков пыльцевой трубки уже присутствует в пыльце, когда пыльца рассеивается из шишек. Надо сказать, что, несмотря на обилие работ по протеомике пыльцевого зерна и трубки, а также большому числу обзорных работ (Chen et al. 2007b; Dai et al. 2007b; Rafinska et al. 2010; Chaturvedi et al. 2016), голосеменные растения в этом отношении всё ещё мало изучены.

В пыльце сосны ладанной (*Pinus taeda*) синтез РНК активно происходит с самых ранних стадий прорастания пыльцы. Однако, в отличие от большинства других видов, эта недавно синтезированная РНК включает рРНК. Имеются доказательства важности этой недавно синтезированной РНК в процессе непрерывного роста пыльцевой трубки (Frankis Jr. 1990). Одно- и двумерный гель-электрофоретический анализ выявляет ряд качественных и количественных различий между белками, синтезируемыми на ранних стадиях прорастания и более поздних стадиях роста пыльцевых трубок.

#### **1.4 Изменение ионного статуса пыльцевого зерна**

Важнейшие изменения на раннем этапе активации и на протяжении всего периода подготовки к прорастанию касаются изменений ионного статуса вегетативной клетки пыльцевого зерна. С помощью неселективных микроэлектродов (*vibrating probe*) в классической работе Вайсензель на лилии было обнаружено, что в процессе активации пыльцевого зерна возникают ионные токи, причем в области будущего прорастания локализован максимально интенсивный входной ток, а выходной сосредоточен на противоположном полюсе (Weisenseel et al. 1975). На основании экспериментов по изменению состава наружного раствора Weisenseel и Jaffe пришли к заключению, что основной вклад в обнаруженный входной ионный ток вносит  $K^+$ , а выходной ассоциирован с протонами (Weisenseel and Jaffe 1976).

Значительно позже Fan с сотрудниками (2001) теми же методами изучали входные ионные токи на протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен *Arabidopsis*. Природу входящего катиона авторы определяли по величине обращенного потенциала: он оказался близок к равновесному калиевому потенциалу. Подтверждение того, что ток проходит через

калий-проводящие каналы, было получено с помощью ингибиторного анализа: ток блокировался ингибиторами калиевых каналов  $Ba^{2+}$  и  $TEA^+$  (тетраэтил аммония). На интенсивность тока влиял также состав среды: чем выше была концентрация калия в наружном растворе, тем больше положительно заряженных частиц входило в пыльцевое зерно (Fan et al. 2001). Здесь надо отметить, что суммарная концентрация  $K^+$  в пыльцевом зерне, судя по всему, не повышается, по крайней мере, в период регидратации. С помощью атомной абсорбционной спектроскопии и последующего пересчёта на объём пыльцевого зерна было показано, что в процессе гидратации пыльцевого зерна *Tradescantia paludosa* концентрация  $K^+$  в нём снижается (Bashe and Mascarenhas 1984). Одновременно с этим происходит сборка рибосом в полисомы и запускается синтез белка (следует отметить, что у традесканции прорастание начинается очень быстро) (Bashe and Mascarenhas 1984; Mascarenhas et al. 1984). Влияние концентрации  $K^+$  на сборку рибосом и трансляцию эти авторы показали в бесклеточной системе. Они выяснили, что оптимальная концентрация для синтеза белка составляет 100-130 мМ  $K^+$ , а добавление этого катиона до 220 мМ и выше препятствуют связыванию РНК с рибосомами. В дегидратированном пыльцевом зерне концентрация калия превышает 280 мМ, а после гидратации она приближается к оптимальной (тут нужно учитывать и изменения объёма, и возможный выход калия из зёрен). Поскольку чувствительность разных мРНК к высоким концентрациям  $K^+$  может отличаться, она может рассматриваться как фактор избирательного поощрения трансляции определенных матриц (Bashe and Mascarenhas 1984).

Позже было высказано предположение, что калий может участвовать в создании осмотического градиента, приводящего к быстрому поглощению воды и, в конечном итоге, к быстрому набуханию пыльцы ячменя (Rehman et al. 2004). С помощью гистохимического окрашивания пыльцевых зёрен было показано, что  $K$  концентрируется в области апертуры, причем как в стенке, так и в части цитоплазмы, прилегающей к ней. Рентгеноспектральный микроанализ и конфокальная микроскопия с использованием калий-чувствительного флуоресцентного красителя подтвердили результаты гистохимии (Rehman and Yun 2006). Эти результаты предполагают возможную роль  $K$ , расположенного в апертурной области, в быстром набухании пыльцы за счет создания осмотического градиента на мембране, что является предпосылкой для быстрого выпячивания пыльцевой трубки, которое характерно для злаков (Rehman et al. 2004).

В отличие от входного тока, обнаруженного с помощью неселективных микроэлектродов (Weisenseel and Jaffe 1976), выходной ток образован протонами, которые выкачиваются из цитоплазмы вегетативной клетки. Этот процесс обеспечивается  $H^+$ -АТФазой, которая гидролизует АТФ, перемещая  $H^+$  из цитоплазмы в апопласт, создавая как электрический, так и протонный градиенты на плазматической мембране (Матвеева et al. 2002;

Lang et al. 2014; Falhof et al. 2016). Важная роль  $H^+$ -АТФазы в фазе раннего прорастания пыльцы покрытосеменных была убедительно показана с помощью различных методических подходов: измерения внутриклеточного рН (Матвеева et al. 2003а), ингибиторного анализа (Lang et al. 2014), иммунолокализации (Obermeyer and Blatt 1995), микроэлектродной техники patch-clamp (Gehwolf et al. 2002), мутагенеза (Hoffmann et al. 2020) и локализации белка путём слияния с GFP (Certal et al. 2008; Hoffmann et al. 2020). Динамику внутриклеточного рН в процессе активации изучали в нашей лаборатории на пыльцевых зёрнах табака: в первые минуты наблюдалось защелачивание цитоплазмы, которое достигало плато чуть раньше момента выхода трубки (20 мин) (Матвеева et al. 2002). Этот процесс проявлял чувствительность к ортованадату, что указывало на  $H^+$ -АТФазу Р-типа. Фузикоцин, наоборот, стимулировал выкачивание протонов и сдвигал внутриклеточный рН в щелочную сторону, а внеклеточный – в кислую (Rodriguez-Rosales et al. 1989; Матвеева et al. 2003а).

У разных видов покрытосеменных антагонисты  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны подавляли прорастание пыльцы и рост трубок, тогда как стимулятор фермента повышал эффективность прорастания у лилии, оливы и табака (Rodriguez-Rosales et al. 1989; Fricker et al. 1997; Матвеева et al. 2003а; Certal et al. 2008). Так, стимуляция прорастания на 20% была достигнута с помощью фузикоцина, который способствует связыванию белков 14-3-3 с  $H^+$ -АТФазой Р-типа (Pertl et al. 2001). В связи с этим на данный момент укрепились представления о том, что  $H^+$ -АТФаза является ключевым ферментом, управляющим сдвигом рН в пыльце покрытосеменных, тем самым обеспечивая ионную основу для активации метаболизма (Pertl et al. 2001, 2010; Gehwolf et al. 2002). Для голосеменных никакой информации о роли данного фермента в прорастании не было.

К тому времени, когда начали изучать электрические токи в пыльце, уже было установлено, что для пыльцы всех изученных на тот момент видов цветковых растений присутствие  $Ca^{2+}$  в среде необходимо для эффективного прорастания *in vitro* (Brewbaker and Kwack 1963). Учёные предполагали, что и концентрация кальция в цитоплазме вегетативной клетки изменяется в ходе подготовке к полярному росту, однако это было показано позже различными методами. Позже польский биолог Елизавета Беднарска с использованием ауторадиографии обнаружила активное включение метки в пыльцевые зерна, прорастающие *in vitro* и *in vivo*.  $^{45}Ca^{2+}$  попадал в пыльцу непосредственно из питательной среды или из папилл рыльца у иглицы и первоцвета (Bednarska 1989b, 1991). В пыльцевых зёрнах гемантуса и ослинника, готовящихся к прорастанию *in vitro*, был обнаружен градиент кальция, маркирующий место будущего выхода пыльцевой трубки (Bednarska 1989a). В принципе, кальций может поступать как извне, так и из внутриклеточных депо, а также какое-то его количество может содержаться в оболочке. Благодаря таким запасам пыльцевые зерна

некоторых растений могут прорасти на среде без  $\text{Ca}^{2+}$ : некоторое количество  $\text{Ca}^{2+}$ , хранящегося в стенке, высвобождается в среду во время гидратации пыльцы. Например, пыльцевые зерна риса содержат много  $\text{Ca}^{2+}$  в оболочке до прорастания (Tian et al. 1998). Позже динамика  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  при прорастании пыльцевого зерна *Arabidopsis* были изучены с применением белковый сенсора YC3.1 (Iwano et al. 2004). При этом увеличение цитозольной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдали как в пыльцевых зернах, так и в папиллах опыленного рыльца, контактирующих с ними. В пыльцевом зерне был виден чёткий градиент с максимумом в месте будущего выхода трубки (Iwano et al. 2004). Позже Diao с коллегами, применяя более современный белковый сенсор G-CaMP, получили сходные результаты и также показали увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в области цитоплазмы, прилегающей к функциональной апертуре, ещё до появления видимых морфологических изменений (Diao et al. 2018). Выяснилось, что уже на этом этапе можно наблюдать осцилляции  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ . Интересно, что начало прорастания маркируется подъёмом  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  по всему объёму цитоплазмы (Diao et al., 2018).

Итак,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$  играют важную роль в процессе активации, но что было известно об анионах? Данные, полученные в нашей группе с применением ингибиторного анализа, указывали на важную роль анионного транспорта в процессе прорастания. Так, Матвеева с соавторами исследовали значение трансмембранного переноса  $\text{Cl}^-$  для прорастания пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* с применением ионоселективных электродов (Матвеева et al. 2003b). Оказалось, что ингибиторы анионных каналов полностью подавляют прорастание, чего не наблюдается в случае блокаторов симпортеров и антипортеров, переносящих хлорид-ион. Наиболее эффективен был NPPB, который в низкой концентрации (50  $\mu\text{M}$ ) снижал интенсивность выхода  $\text{Cl}^-$  более чем в 3 раза. Таким образом, важный факт выхода хлорид-иона и его значение для прорастания были установлены, однако чувствительность ионоселективных электродов невелика, поэтому такой выход мог быть зарегистрирован только в упрощённой модельной системе. В дальнейшем это направление получило развитие в рамках настоящей работы.

В 2015 году появилось сообщение о механочувствительном канале, обладающем повышенным сродством к анионам, который играет важную роль в гидратации пыльцы на начальном этапе ее прорастания. Транскрипты MSL8 были обнаружены в суммарной мРНК, выделенной из цветков *A. thaliana*, но не листьев или корней. Филогенетический анализ предполагает, что специфическая для мужской половой линии экспрессия генов MSL характерна как в однодольных, так и в двудольных растений (Hamilton et al. 2015).

В трансгенных растениях, экспрессирующих MSL8, слитый с зеленым флуоресцентным белком (gMSL8-GFP), сигнал наблюдался в пыльце, но не в какой-либо другой ткани. MSL8-GFP в пыльцевых зернах локализуется как на плазматической мембране вегетативной клетки,

так и в эндомембранных компартментах, и после прорастания мобилизуется на периферию пыльцевой трубки. Проводимость MSL8 в 6,3 раза выше для хлорида, чем для натрия и, следовательно, канал является анион-селективным. Чтобы проверить гипотезу о том, что MSL8 необходим пыльце, чтобы выжить при понижении осмотического давления во время регидратации, мы количественно оценили жизнеспособность зрелой пыльцы после инкубации в дистиллированной воде. В то время как пыльца дикого типа показывала жизнеспособность от 83 до 95% через 2 часа, жизнеспособность пыльцы *msl8-4* упала с 38% до 21% (*msl8-1* - 46%). Любопытно, что при этом пыльца *msl8-4* и *msl8-1* прорастала с большей скоростью, чем пыльца соответствующего дикого типа. Напротив, сверхэкспрессия LAT52pMSL8-YFP ингибировала прорастание, и три независимых гомозиготных линии показали только от 4 до 39% скорости прорастания дикого типа (Hamilton et al. 2015).

Суммарную активность ион-транспортных систем на плазматической мембране отражает мембранный потенциал, который рассматривают как один из наиболее важных и быстро меняющихся показателей изменения физиологического состояния клетки (Feijó et al. 1995). В ряде работ, посвященных различным аспектам ионного транспорта и распределения зарядов на плазматической мембране вегетативной клетки пыльцевого зерна, приводятся значения потенциала для пыльцы разных видов. К самым ранним относится работа, в которой значение мембранного потенциала пыльцевых зёрен лилии до прорастания составляло от -90 до -130 мВ (Weisenseel and Wenisch 1980). Эти данные подтвердились в более позднем исследовании: от -110 мВ до -150 мВ для лилии (Obermeyer and Blatt 1995). В классическом обзоре Фейжо с соавторами (Feijó et al. 1995) приводятся значения для пыльцы петунии (-30 мВ) и нарцисса (-37 мВ). Мембранный потенциал протопластов из пыльцевых зёрен бок-чой (*Brassica chinensis*) составлял -79 мВ (Fan et al. 2003a). В отличие от протопластов и активированных пыльцевых зёрен, пыльца, только начавшая активацию метаболизма, по идее, должна иметь более деполяризованную мембрану, что и было обнаружено при измерении мембранного потенциала у табака неинвазивным оптическим методом, который позже будет подробно описан: у неактивированных пыльцевых зёрен он составлял -16 мВ (Матвеева et al. 2004).

### **1.5 Значение АФК для прорастания пыльцевого зерна**

Одно из первых изменений, которые происходят в пыльцевом зерне после попадания на женские ткани спорофита, это продукция АФК. Накопление АФК в области апертуры пыльцевого зерна киви была показана с помощью окрашивания нитросиним тетразолием уже через 5 минут после начала инкубации *in vitro* (Speranza et al. 2012); окрашивание непроросших зёрен табака АФК-чувствительными красителями показало их локализацию в области апопласта и митохондрий (Смирнова et al. 2009). Продукция АФК также была описана с помощью NBT в

непроросших зёрнах аризонского кипариса (Pasqualini et al. 2015). Продукция АФК в митохондриях должна строго контролироваться, так как в случае избыточная продукция, например, в дефектной пыльце приводит к клеточной гибели и, как следствие, к цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) (Huang et al. 2011).

Участие АФК в абортации пыльцы было показано для многих разновидностей сельскохозяйственных растений с ЦМС, например, для хлопка (Nie et al. 2020), перца (Deng et al. 2012) и риса (Li et al. 2004). В этих случаях избыточная продукция АФК была ассоциирована со сниженным содержанием в митохондриях СОД, аскорбатпероксидазы, каталазы (Li et al. 2004), и пероксисомо-подобного белка (Nie et al. 2020).

Помимо продукции в митохондриях, АФК в пыльцевом зерне могут образовываться на плазматической мембране вегетативной клетки и накапливаться в апопласте. Так, продукция апопластных АФК и их выделение в окружающую среду были зарегистрированы уже через 20 мин после начала инкубации у табака (Смирнова et al. 2009) и киви (Speranza et al. 2012). В этих случаях синтез АФК был связан с НАДФН-оксидазой, поскольку ингибитор DPI (дифенилен иодониум) подавлял накопление АФК в среде прорастания (Смирнова et al. 2009) и синтез в пыльцевых зёрнах (Speranza et al. 2012; Pasqualini et al. 2015). В пыльце *Arabidopsis* две изоформы НАДФН-оксидазы плазмалеммы участвуют в продукции АФК: RbohH и RbohJ (respiratory burst oxidase protein homolog) (Kaya et al. 2014). Цитохимический анализ пыльцевых зёрен, прорастающих на рыльце, показал, что у двойных мутантов *rbohH,J*  $H_2O_2$  не накапливается в апопласте, в отличие от пыльцы дикого типа (Iwano et al. 2009; Kaya et al. 2014). Негативный эффект ингибиторов (?) также был описан при прорастании пыльцы кипариса (Pasqualini et al. 2015). У цветковых растений ситуация, кажется, более сложная, поскольку при опылении баланс между продукцией и элиминацией АФК в значительной мере определяется участием тканей пестика.

Так, у табака низкие концентрации аскорбиновой кислоты и ДФИ снижают содержание АФК в пыльце, но стимулируют её прорастание, как и MnTMPPP (Smirnova et al. 2013). Эти данные показывают, что пыльца табака продуцирует АФК до уровня более высокого, чем оптимальный для её прорастания. У киви, однако, такого эффекта не было обнаружено: все изученные концентрации подавляли прорастание (Speranza et al. 2012).

Вместе описанные факты указывают на важное значение эндогенных АФК и, конкретнее, АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой плазмалеммы, на ранних этапах прорастания пыльцы цветковых растений. Для хвойных растений данных было очень мало, делать заключения на основании одного вида было нельзя.

В время прорастания пыльцы арабидопсиса *in vivo* синтез АФК играет важную роль уже на этапе гидратации пыльцы (Gao et al. 2016). Протеинкиназный комплекс SnRK1 (sucrose

nonfermenting 1)-related kinase1) принадлежит к семейству высококонсервативных серин/треониновых киназ и вовлечен в регуляцию развития пыльцы, зародыша, проростка и органов растений, а также в сигналинг с участием углеводов, стресса и гормонов. Оказалось, что мутант, у которого отсутствует субъединица KINβγ комплекса SnRK1 в одно и то же время характеризуется сниженным уровнем эндогенных АФК и нарушением гидратации, которые не наблюдаются *in vitro* (когда вода в избытке), а также когда воду искусственно добавляют на рыльце. Аналогичные нарушения наблюдались при оверэкспрессии каталазы, которая резко снижала уровень эндогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в пыльце (Gao et al. 2016). Таким образом, была выявлена связь между продукцией АФК на раннем этапе активации и входом воды в дегидратированные пыльцевые зерна.

Помимо эндогенных АФК, было обнаружено, что экзогенные АФК могут оказывать заметное влияние на прорастающую пыльцу. Умеренные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активируют прорастание пыльцы табака, а высокие ингибируют (Smirnova et al. 2013); для киви, высокие концентрации пероксида водорода также оказывают ингибирующий эффект (Speranza et al. 2012). Одна из функций, выполняемых АФК в растительной клетке - контроль цитомеханики клеточной стенки. При этом одни АФК размягчают экстраклеточный матрикс, другие, напротив, обеспечивают образование дополнительных сшивок между полимерами (Kärkönen and Kuchitsu 2015). Снижение жесткости клеточной стенки может происходить за счет неферментативного разрезания полисахаридов с участием гидрокси-радикала (Lindsay and Fry 2007), в то время как пероксид водорода может повышать жесткость матрикса за счет образования связей между гидроксицинамивыми кислотами с участием пероксидазы (Bunzel 2010). Как было показано на табаке, эта функция очень важна на начальном этапе прорастания пыльцы: сдвиг баланса АФК приводит к снижению эффективности прорастания: так, пыльца, обработанная смесью для реакции Фентона, оказалась неустойчива к гипотоническому стрессу и лопалась, а та, которую обрабатывали высокими концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, становилась слишком жесткой и не способной к запуску полярного роста, хотя и сохраняла жизнеспособность (Smirnova et al. 2013).

## **1.6 Рыльцевый экссудат покрытосеменных растений**

В последние годы в центре внимания исследователей находится процесс взаимодействия между пыльцой и женскими тканями спорофита, который может происходить по двум принципиальным сценариям. У растений влажными рыльцами важнейшую роль в этом играет вязкая жидкость, выделяемая клетками рыльца, называемая рыльцевым экссудатом (Shivanna 2020). Состав экссудата может сильно различаться у разных растений, однако в него всегда входят белки, углеводы, липиды и целый ряд низкомолекулярных веществ (Konar and Linskens 1966; Tiezzi et al. 1981; Miki-Hirosige et al. 1987; Bednarska et al. 2005; Okolo and Abigor 2006).

Исследования рыльцевого экссудата начались во второй половине двадцатого века. Хотя о наличии жидкостей на рыльцах было известно и ранее, сбор и анализ их состава был и остается сопряженным с немалыми техническими трудностями и методическими ограничениями, поскольку объем жидкости очень мал. В 1966 году голландские учёные Конар и Линскенс опубликовали ставшую впоследствии классической статью о физиологических и биохимических свойствах рыльцевого экссудата петунии (Konar and Linskens 1966). Они изучали процесс выделения рыльцевого экссудата, влияние на него повышенной и пониженной температуры, света и опыления, а также определили основные углеводы и липиды, входящие в состав жидкости. В числе прочего, они установили, что количество продуцируемого экссудата тесно связано с температурой окружающей среды, а также с длиной светового дня. Удаление лепестков не влияло на количество выделяемого экссудата. Более того, оно не изменилось даже после обработки растения метаболитическими ядами цианидом калия и динитрофенолом. Таким образом, авторы показали, что экссудация на рыльце, в отличие от продукции нектара, лишь в незначительной степени зависит от интенсивности метаболитических процессов в тканях растений (Konar and Linskens 1966). Анализ физических свойств рыльцевого экссудата показал, что он обладает высоким поверхностным натяжением, благодаря которому имеет форму капли на рыльце. Благодаря высоким показателям адгезивности экссудата пыльца легко и прочно приклеивается к рыльцу, а значительное содержание в секрете гидрофобных молекул защищает пыльцу от смывания дождем. Биохимический анализ показал, что в состав рыльцевого экссудата петунии входят различные липиды, такие как фосфолипиды и стеролы, а также свободные жирные кислоты (Konar and Linskens 1966). Было обнаружено относительно высокое содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы. На рыльце компоненты рыльцевого экссудата распределены неравномерно. Во внутреннем слое, контактирующем с тканями рыльца, содержатся углеводы, растворенные в воде, а внешний слой образован веществами липидной природы. Функции липидного слоя состоят в связывании рыльцевых зерен и в защите от избыточной транспирации. Водная фаза, судя по всему, нужна для гидратации пыльцы и обеспечения ее питательными веществами, необходимыми для дальнейшего прорастания.

Эти данные, полученные для одного модельного вида, привлекли большой интерес к изучению рыльцевого экссудата. В 1969 году группа исследователей под руководством доктора Мартина описала состав рыльцевого экссудата для десяти видов растений из разных таксономических групп. Оказалось, что, несмотря на различия в соотношениях компонентов, качественный состав рыльцевого экссудата был в целом сходным у всех изученных видов (Martin 1969). Биохимический анализ показал, что в рыльцевом экссудате содержится фенольные соединения, в частности, гликозилированные флаваноиды и фенил-карбоновые кислоты, а также фенольные соединения с алифатическими боковыми цепями. Кроме того,



были обнаружены поверхностные воска, сходные по строению с кутином эпидермиса листа (Martin 1969). Индольные же составляющие в рыльцевом экссудате не нашли. Авторы отметили, что количественный состав экссудата значительно варьировал в зависимости от таксономического положения растения и экологических особенностей конкретного вида.

После такого таксономического скрининга стало понятно, что экссудаты бывают двух принципиальных видов: преимущественно липидный и преимущественно углеводный, гидрофильный. Поэтому в дальнейшем большинство исследователей, в зависимости от вида растения, изучали либо липидный/жирнокислотный, либо углеводный профиль рыльцевого экссудата.

Так, в 1972 году американские учёные Лабарка и Лойвус сосредоточили свое внимание на изучении экссудата как источника питания для пыльцевых зерен, выбрав своим объектом лилию (*Lilium longiflorum*), у которой, как оказалось, относительно много углеводов в экссудате (в отличие от петунии). При помощи изотопного анализа они показали, что рыльцевый экссудат является источником сахаров для построения клеточной стенки пыльцевой трубки (Labarca and Loewus 1972). Этот процесс включает несколько этапов: перенос фрагментов полисахаридов из тканей пестика в цитоплазму растущей пыльцевой трубки, гидролиз до мономеров и собственно синтез новой клеточной стенки. Таким образом, рыльцевый экссудат не только помогает удерживать пыльцу на поверхности пестика, но и способствует быстрому вращанию пыльцевой трубки в более глубокие слои тканей. Позже углеводный состав экссудата был исследован для многих немодельных видов с влажным рыльцем, таких, как арбуз и водяной гиацинт (Hawker et al. 1983; Kandasamy and Vivekanandan 1983). Другим направлением было изучение липидов экссудата, такие исследования также были выполнены на различных растениях, например, форзиции и лимоне (Dumas 1977; Tiezzi et al. 1981).

Для детального изучения механизмов секреции экссудата требовалось исследование анатомического строения рыльца. Мауро Крести с соавторами в 1986 году изучили ультраструктуру и биохимические показатели рыльца табака (*Nicotiana tabacum* L.). Они показали, что рыльце состоит из двух зон, включающих принципиально различные типы клеток (Cresti et al. 1986). Секреторная зона состоит из клеток-сосочков и 2-3 слоев расположенных под ними базальных клеток. Вторая же, несекреторная, образована вакуолизированными клетками. В клетках секреторной зоны сильно развит ЭПР, причем на ранних стадиях развития цветка преимущественно гранулярный, а позже – в значительной мере агранулярный. Максимально высокий уровень продукции компонентов рыльцевого экссудата отмечен за 2-3 дня до полного раскрытия цветка (Cresti et al. 1986).

Если с ролью сахаров в экссудате всё было более-менее понятно (они являются источником энергии и способствуют росту трубки), то роль липидов дольше оставалась

неясной. В 1998 году в журнале Nature была опубликована интересная работа, отвечающая на вопрос, какую роль в репродукции играют липиды рыльцевого экссудата. С помощью хирургических манипуляций с цветками Уолтер-Артс с соавторами показали, что при нанесении на безрыльцевый пестик табака экссудата петунии, который также содержит большое количество липидов, пыльцевые трубки развивались нормально, однако при нанесении экссудата лилии, содержащего в основном углеводные компоненты, пыльца не вращалась внутрь тканей пестика (Wolters-Arts et al. 1998). Таким образом, для прорастания пыльцы и роста трубок было важно наличие экссудата нужного типа, но не самих клеток рыльца. Далее авторы попробовали заменить природный экссудат синтетическими компонентами. Оказалось, что насыщенные триглицериды не способны вызвать вращение трубок, а ненасыщенные с этой задачей справились. На основании своих исследований авторы заключили, что липидная фракция экссудата, содержащая ненасыщенные триглицериды, необходима для гидратации пыльцевых зерен на поверхности рыльца и предположили, что образующийся в пестике водный градиент определяет направление роста пыльцевой трубки (Wolters-Arts et al. 1998).

Как видно из анализа приведенных выше ранних работ, долгое время исследователи изучали состав экссудата, не рассматривая белки, которые в нем содержатся, так как используемые в то время методы не позволяли изучить столь малые количества белка. Однако, с развитием современных методов (в том числе протеомного анализа) исследования рыльцевого экссудата возобновились с новой стороны. В своем исследовании, опубликованном в 2013 году, Рижон и соавторы изучали рыльцевые экссудаты лилии (*Lilium longiflorum*) и оливы (*Olea europaea*). Эти растения являются представителями далеких друг от друга систематических групп, имеют различия в морфологии и анатомии пестиков и экологических условиях произрастания. С помощью методов протеомного анализа авторы выявили 51 и 57 белков, уникальных для лилии и оливы, соответственно, причем многие из которых были описаны впервые (Rejón et al. 2013). Более того, они показали, что белки рыльцевого экссудата вовлечены в более чем 80 биологических процессов и выполняют 97 различных молекулярных функций. Это исследование заметно расширило существовавшие на тот момент представления о значении рыльцевого экссудата, доказав, что он обладает гораздо большим многообразием биологических функций, чем считалось ранее.

К первой группе белков, секретируемых экссудатом, относятся белки катаболизма – протеолитические ферменты, такие как О-гликозилазы, протеазы и липазы. Авторы предположили, что эти белки расщепляют полимеры рыльцевого экссудата до олигомеров и мономеров, тем самым облегчая их поглощение прорастающими пыльцевыми трубками (Rejón et al. 2013). Кроме того, они могут участвовать в регуляции градиента жесткости клеточной стенки пыльцевых трубок, необходимого для полярного роста. К другой группе белков,

обнаруженных при анализе, относятся элементы межклеточного взаимодействия и сигналинга, различные белки адгезии, помогающие задавать направление роста пыльцевых трубок.

Помимо белков, напрямую вовлеченных во взаимодействие с пыльцевыми зернами и трубками, авторы обнаружили большое семейство различных защитных белков, например, хитиназ. Это кажется вполне логичным, поскольку экссудат, содержащий много углеводов, может служить питательной средой для патогенных микроорганизмов. Хитиназы особенно важны для тех растений, которые опыляются насекомыми, поскольку опылители могут быть переносчиками грибных инфекций. По-видимому, функцию защиты выполняют и белки теплового шока, также обнаруженные в составе экссудата.

Одним из интересных фактов, обнаруженных в этой работе, было относительно слабо выраженное сходство протеомов для двух объектов. Оказалось, что рыльцевые экссудаты *Lilium longiflorum* и *Olea europaea* имеют в составе всего 22-25% одинаковых белков (Rejón et al. 2013). Авторы связывают такие различия с экологическими факторами, анатомией пестика и химическим составом экссудата. К примеру, экссудат лилии содержит значительно большее количество О-гликозилаз, чем у оливы, так как он имеет в составе больше полисахаридов. Из-за прямого контакта с опылителем в рыльцевом экссудате лилии присутствуют хитиназы, которые не найдены у оливы, так как это растение является ветроопыляемым. Однако, экссудат оливы, в отличие от лилии, содержит значительное количество белков теплового шока, из чего можно сделать вывод о важности температуры для репродукции этого вида.

Таким образом, рыльцевый экссудат играет важнейшую роль в размножении цветковых растений. Он участвует в распознавании совместимых с пестиком пыльцевых зерен, в защите пестика от патогенов, в питании растущей пыльцевой трубки (Verhoeven et al. 2005; Rejón et al. 2014; Shivanna 2020).

## **1.7 Особенности строения пыльцевых зёрен голосеменных растений**

Мужской гаметофит голосеменных растений в целом устроен сложнее, чем у цветковых растений, развивается и прорастает медленнее, а формируется в ходе трех-пяти митозов, причем у разных групп растений они происходят на разных этапах – до или после опыления (Pacini et al. 1999). В связи с этим, пыльца высыпается из микроспорангиев с разным числом клеток: 4 клетки входят в состав пыльцы у сосны и гинкго (две проталлиальных клетки, антеридиальная клетка и клетка трубки), две – у секвойи, одна – у можжевельника (Friedman 1987a; Pacini et al. 1999; Williams 2009). Мужские гаметы во всех случаях образуются только после опыления. Переход от зооидогамии к сифоногамии, то есть к участию в оплодотворении неподвижных гамет вместо подвижных сперматозоидов, произошел в процессе эволюции голосеменных растений, поэтому среди них встречаются оба варианта (Lora et al. 2016). Однако физиологические исследования среди голосеменных растений проводились практически

исключительно на хвойных растениях (преимущественно сосна и ель, редко – кипарис, пихта и другие), и для всех них характерна типичная сифоногамия, то есть оплодотворение с помощью пыльцевой трубки.

Морфология пыльцевых зёрен голосеменных весьма разнообразна, как и их строение, но можно выделить несколько ключевых паттернов, характерных для саговников, гинкго, гнетовых и сосновых (Схема 1). Клетки гаметофита разделены тонкими стенками, а снаружи, как и у цветковых растений, защищены массивной оболочкой. Оболочка, как правило, имеет полярное строение, как и внутренняя структура гаметофита, причем полярность микроспоры голосеменных, как и покрытосеменных, детерминируется в ходе мейоза (Williams 2009). Проксимальный полюс (тот, который ближе к центру тетрады), в дальнейшем становится более выпуклым, а дистальный полюс – более плоским, например, у *Ginkgo biloba* (Схема 1б), при этом экзина толще на проксимальной стороне, а крупная апертура локализована на дистальной стороне. Полярность на цитологическом уровне проявляется в том, что проталлиальные клетки расположены на проксимальном конце, а крупная клетка трубки – на дистальном (Tulecke 1957; Lu et al. 2011b, 2016). У саговников апертура в пыльцевом зерне занимает почти половину поверхности, экзина наиболее толстая в проксимальной области и тонкая – в дистальной, интина сравнительно тонкая, рельеф экзины не выражен (Схема 1а) (Dehgan and Dehgan 1988). Пыльца гнетовых может быть безапертурной с внутренней полярностью или моносулькатной, то есть, с одной апертурой (Схема 1г) (Tekleva and Krassilov 2009; Bolinder et al. 2015; Rydin and Noorn 2016).

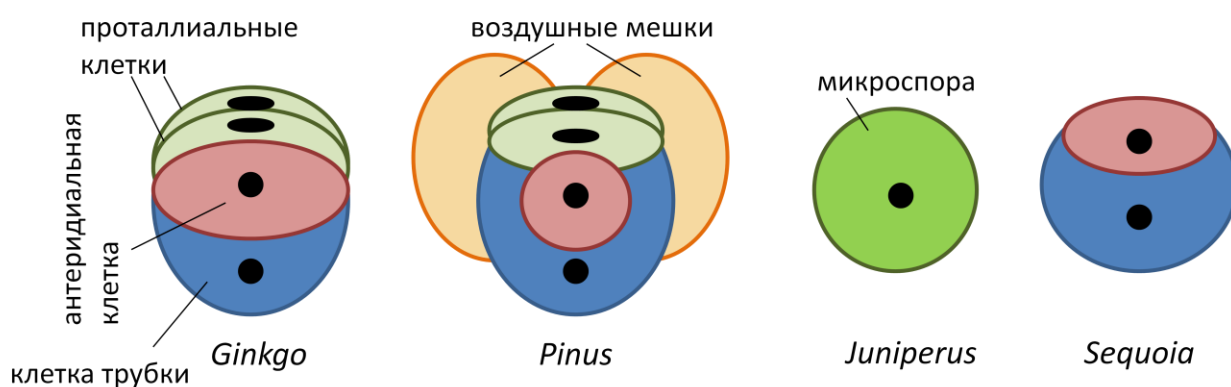


Схема 1 Клеточное строение пыльцевых зёрен некоторых представителей голосеменных растений. Иллюстрация из обзорной статьи (Breygina et al. 2021a).

У большинства представителей Pinaceae пыльца саккатная, то есть, имеет воздушные мешки - большие полые выросты, образованные экзиной (рис. 1в). Мешки располагаются на дистальном конце пыльцевого зерна, а экзина проксимальной части утолщена. Как было показано в модельном эксперименте, флотирование пыльцевых зёрен в опылительных каплях, которые служат местом посадки пыльцы у большинства хвойных растений, служит

эффективным механизмом их втягивания в микропиле, поэтому воздушные мешки служат не только для перемещения пыльцы ветром (Leslie 2010). Число воздушных мешков, равно как и размеры пыльцы и число митозов в ходе развития гаметофита варьибельны (Williams 2009). Пыльца голосеменных, в отличие от покрытосеменных, лишена трифины (Pacini et al. 1999).

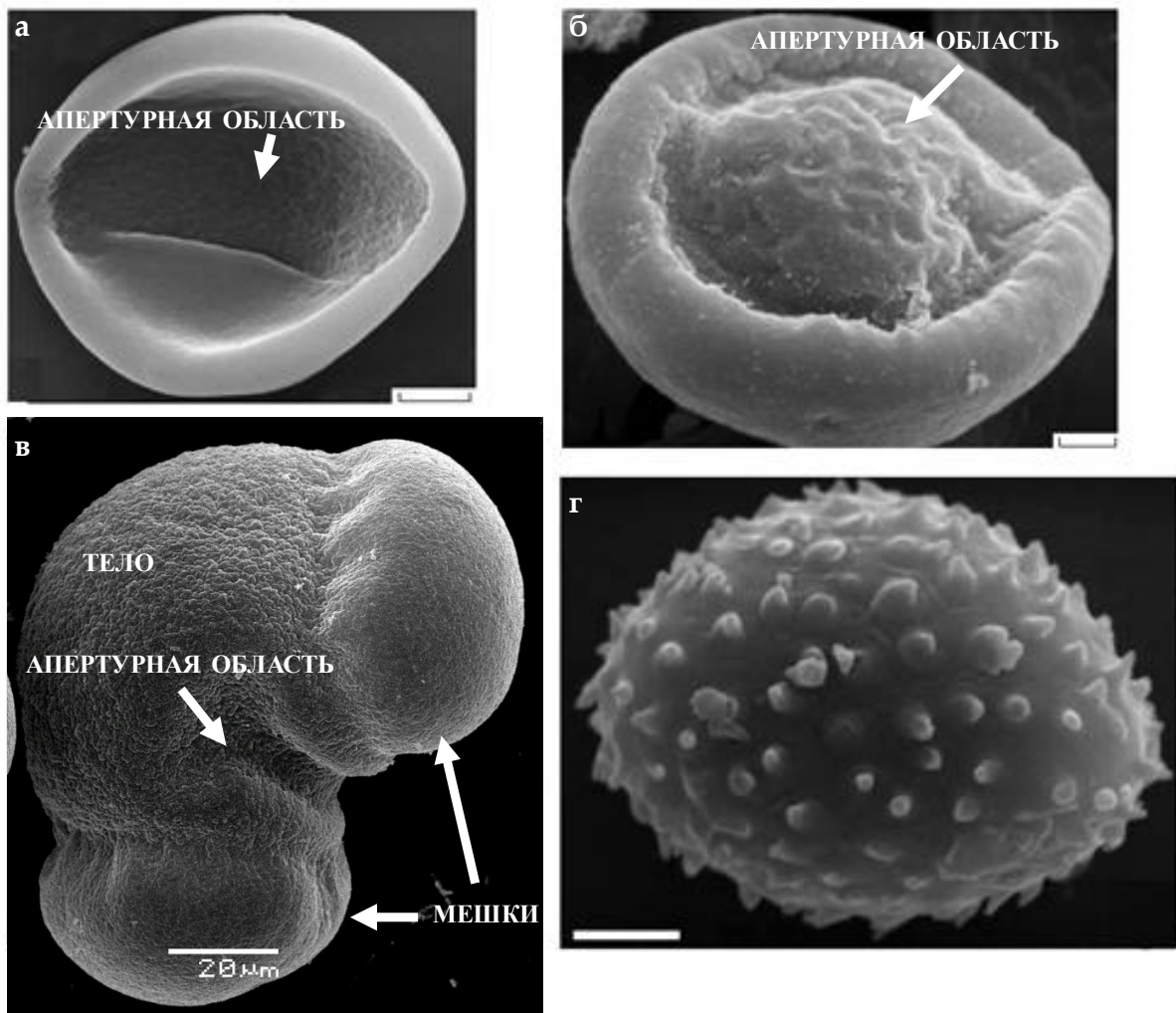


Схема 2. СЭМ пыльцы голосеменных растений. (а) *Cycas micholitzii* Dyer (Cycadaceae). (б) *Ginkgo biloba* L. с выпячиванием в области апертуры. (в) *Picea pungens* Engelm. с типичной саккатной (мешковой) морфологией. (г) *Gnetum macrostachyum* с шипиковой структурой. Масштабная линейка: (а), (б) и (г) – 3 мкм, Фотографии взяты из следующих статей: (а) и (б) (Tekleva et al. 2007) (в) (Breugina et al. 2021a); (г) (Tekleva and Krassilov 2009). Иллюстрация из обзорной статьи (Breugina et al. 2021a).

### 1.8 Особенности опыления у голосеменных растений

Примерно 98% видов голосеменных растений относятся к ветроопыляемым (Lu et al. 2011a), с чем связывают и особенности их строения (например, специфическая форма пыльцевого зерна и воздушные мешки) и физиологии. Известно, что пыльца почти всех современных голосеменных растений, за исключением некоторых видов *Araucariaceae* и *Gnetum*, характеризуется высокой степенью обезвоженности (Franchi et al. 2011) и может покрывать огромные расстояния. Опыление с участием насекомых (в основном, жуков) описано

у некоторых видов Cycadales и Gnetales (Labandeira et al. 2007; Bolinder et al. 2015), в том числе ископаемых, что стало возможно благодаря обнаружению копролитов в шишках древних саговниковых (Klavins et al. 2005). У современных пыльцевых зёрен, которые переносятся ветром и насекомыми, имеются существенные отличия в строении оболочки, даже в пределах одного рода, что было показано для эфедры (Bolinder et al. 2015).

Место появления пыльцевой трубки у голосеменных растений не предопределено в такой степени, как у большинства цветковых (Схема 2), поскольку у них почти всегда есть апертура - не покрытый экзиной участок зерна, предназначенный для беспрепятственного выхода трубки, а у многих голосеменных её нет (Yatomi et al. 2002). Однако трубка всё же не может появиться в любом месте. Так, у саккатных пыльцевых зёрен пыльцевая трубка чаще всего выходит в пространстве между мешками, на полюсе, противоположном проталлиальным клеткам. Если воздушных мешков в пыльцевом зерне нет, но оно поляризовано, то место выхода трубки ещё менее определенное, это достаточно широкая зона, противолежащая проталлиальным клеткам (пыльца *Ephedra*) (El-Ghazaly et al. 1998). В одноклеточной пыльце (можжевельник) признаков полярности не выявлено, и считается, что место появления трубки не детерминировано (Pacini et al. 1999; Surso 2018).

У большинства голосеменных растений пыльцевое зерно при опылении попадает в опылительную каплю. Это жидкий секрет рецептивной семяпочки, который в виде крупной капли выступает над поверхностью микропиле. Объем капли составляет от 10 нл до 1 мкл (Prior et al. 2019), крупные капли видны невооруженным глазом (Bolinder et al. 2015). Капля удерживает прилетевшую пылинку и втягивает ее в семяпочку, где она и прорастает (Gelbart and von Aderkas 2002; Coulter et al. 2012). Выделение и втягивание опылительной капли — во многом загадочный процесс. Недавно на основании транскриптома семязачатка гинкго было сделано предположение о гормональной регуляции процесса, но это исследование требует продолжения (Che et al. 2021).

Список видов, у которых нет опылительной капли, сокращается по мере пристального изучения у них опыления. Зачастую обнаруживается маленькая или быстро исчезающая капля. Опылительная капля – это, прежде всего, апопластная жидкость. Она содержит неорганические вещества, углеводы и белки, включая ферменты (Prior et al. 2013, 2019). Лу и др. использовали газовую хроматографию-масс-спектрометрию для идентификации в общей сложности 101 метаболита в опылительной капле *Ginkgo biloba* L.: наиболее распространенными метаболитами были сахара, за которыми следовали органические кислоты и спирты, участвующие в метаболизме углеводов, глицина, серина и треонина (Lu et al. 2020).

Сопоставление опылительной капли с более изученными апопластными жидкостями покрытосеменных растений (рыльцевый и овулярный экссудаты, нектар) выявило значительное

сходство их состава (Hou et al. 2019; Prior et al. 2019). На этой основе было высказано предположение, что функции капли не ограничиваются доставкой пылинки в семяпочку. Ферменты капли, в частности, хитиназы, могут участвовать в защите семяпочки от патогенов. Обсуждаются также возможные регуляторные функции компонентов капли в процессе прорастания пыльцы. Однако все эти предположения пока не проверены в эксперименте.

У хвойных можно найти разные стратегии опыления (Möller et al. 2000; Losada and Leslie 2018). Саккатная пыльца *Pinus* и *Picea* попадает в опылительную каплю и с ней переносится на поверхность нуцеллуса, где прорастает. У пихты образуется аналог опылительной капли из влаги, собравшейся после дождя или росы. Пыльца часто прорастает в микропиллярном канале, и трубка растет в направлении нуцеллуса. У лиственницы опылительная капля отсутствует, но микропиллярный канал заполнен овулярным секретом. В окружении этого секрета пыльца гидратируется, набухает и сбрасывает экзину. В таком виде она подплывает к поверхности нуцеллуса, где формирует пыльцевую трубку. Обычно это происходит через несколько недель после опыления. У некоторых видов *Tsuga* и всех видов *Araucariaceae* пыльца попадает на коническую поверхность рядом с семяпочкой и может оставаться там в течение нескольких недель. Затем она прорастает и формирует длинную трубку, которая врастает через микропиле в семяпочку и достигает нуцеллуса. Разнообразие паттернов поведения пыльцы в женской шишке активно обсуждается в литературе, поскольку может дать важную информацию об эволюции опыления (Lu et al. 2011a; Coulter et al. 2012; Losada and Leslie 2018).

Если сравнивать покрытосеменные и голосеменные растения, то мужской гаметофит голосеменных зачастую после опыления должен преодолеть меньшее расстояние, однако он делает это за гораздо более продолжительное время. Медленно происходит прорастание и рост мужского гаметофита на всех этапах. Так, гидратация пыльцы хвойных обычно происходит в первые сутки после опыления, а пыльцевая трубка появляется в течение нескольких дней, в то время как у цветковых растения эти процессы занимают минуты и часы (Fernando et al. 2005; Williams 2012). Так, скорость роста трубки *Picea abies* составляет около 20 мкм/ч, что составляет разительный контраст по сравнению с 300–1500 мкм/ч у покрытосеменных. Кроме того, для хвойных характерен период длительного покоя, когда пыльцевая трубка не растет. В частности, рост трубки может прекращаться на время, необходимое для завершения развития женского гаметофита – до года, при этом за несколько дней до оплодотворения пыльцевая трубка возобновляет свой рост и доставляет спермии к яйцеклетке. Например, у сосны и некоторых видов *Araucariaceae* пыльца прорастает вскоре после опыления, и трубка входит в нуцеллус. Затем наступает период покоя от середины лета до следующей весны. У *Pinus taeda* период покоя трубки начинается, когда в семяпочке начинается мейоз, и завершается за несколько дней до оплодотворения (Williams 2009). Таким образом, у разных групп растения

время от опыления до оплодотворения варьирует от нескольких недель (большинство видов Cupressaceae и Pinaceae) до года (*Pinus* и некоторые Araucariaceae) (Williams 2009).

## **I.2 Полярный рост пыльцевой трубки**

Пыльцевые зерна большинства видов растений способны успешно прорасти сами в отсутствие сигналов от спорофита и женского гаметофита, которые поддерживают и активируют прорастание *in vivo* (Qin and Yang 2011). При наличии такой гибкости они могут реализовывать программу полярного роста в питательной среде определенного состава *in vitro*. Большинство современных питательных смесей для культивирования пыльцы содержат кальций, осмотики, борную кислоту и углеводы (чаще всего это сахароза). Известно, что морфогенез *in vitro* не полностью соответствуют процессам, протекающим в условиях *in vivo* (Taylor and Nepler 1997). Однако, благодаря удобству использования и простоте интерпретации данных, эта экспериментальная модель активно используется для изучения закономерностей полярного клеточного роста, как свойственных исключительно растениям, так и универсальных, характерных для различных эукариотических клеток. В связи с этим пыльцевая трубка была в XX веке и остается в наши дни одним из наиболее изученных объектов с полярным ростом (Feijó et al. 2004; Rudall and Bateman 2007; Qian and Xiang 2019).

### **2.1 Цитологические основы полярного роста**

Особенность апикального клеточного роста заключается в том, секреция материала плазматической мембраны (и клеточной стенки) происходит в кончике трубки. Помимо пыльцевых трубок, к объектам с полярным типом роста относятся: корневые волоски, гифы грибов, протонемы и ризоиды мхов, ризоиды папоротников, а также нейриты (аксоны, дендриты) нейронов (Rounds and Bezanilla 2013). Одним из основных структурных механизмов, обеспечивающих поддержание полярного роста, является подразделение цитоплазмы растущей клетки на компартменты. В апикально растущих клетках растений и грибов принято выделять апикальную зону, свободную от крупных органелл, в которой сосредоточены секреторные везикулы, несущие строительный материал к апикальной мембране (Chebli et al. 2013). В следующей зоне (обычно её называют дистальной, но этот термин неудобен из-за неоднозначности поэтому я буду пользоваться переводной терминологией и называть ее стержневой (shank)) располагаются крупные органеллы: митохондрии, комплексы Гольджи и ЭПР, у хвойных также – амилопласты. В последнее время в трубках цветковых растений в связи с большим количеством данных о её физиологическом значении стали выделять субапикальную зону, где располагается актиновое кольцо (см. ниже). Некоторые авторы выделяют в «дистальной зоне» также ядерный компартмент, который содержит мужской гаметный модуль (ядро вегетативной клетки и генеративную клетку или два спермия). В



длинных трубках ближе к зерну, как правило, располагается вакуолизованная зона, однако у хвойных вакуоли встречаются и в других зонах трубки (во всех, кроме апикальной) (Pierson and Cresti 1992; Geitmann 2011; Nepler and Winship 2015). У хвойных растений растущий компартмент представляет собой прозрачную зону без амилопластов (которыми заполнена дистальный компартмент), но обогащенную митохондриями и компонентами эндоплазматической системы, трубки крупные, и апикальный компартмент продолжается до 20-30 мкм от кончика (De Win et al. 1996; Lazzaro et al. 2013).

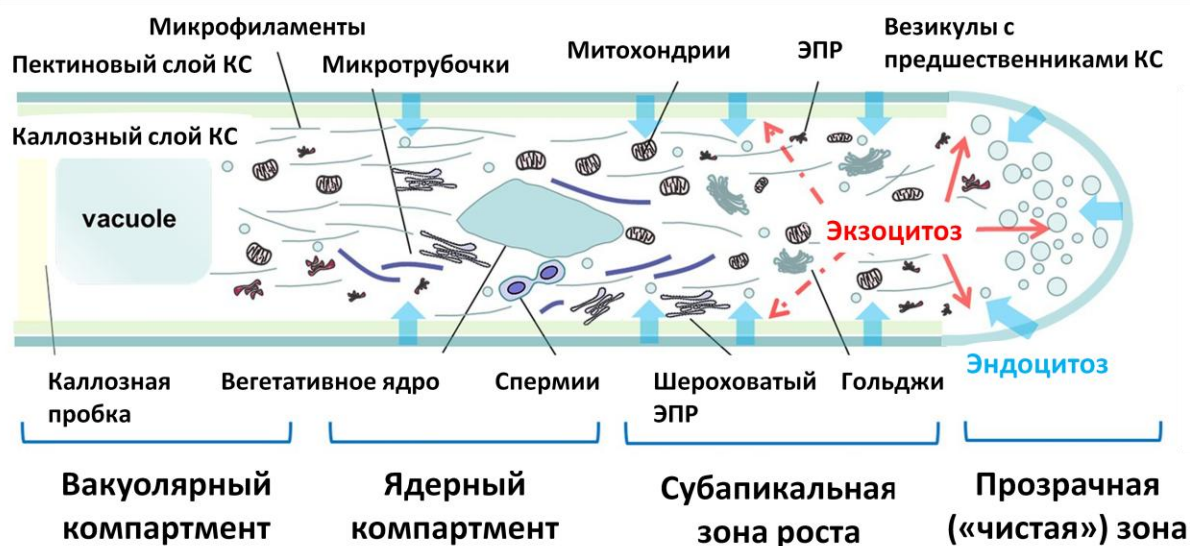


Схема 3. Схематическое изображение типичной структуры кончика пыльцевой трубки покрытосеменного растения. Пыльцевую трубку можно классически разделить на четыре зоны от апекса до основания: прозрачная зона (чистая, апикальная), субапикальная зона роста, ядерная зона и вакуолярная зона. Основная часть экзоцитоза происходит в апикальной области, как показано сплошными красными стрелками, в то время как определенные экзоцитозные везикулы также могут секретироваться в субапикальную зону роста, как показано пунктирными стрелками. Эндоцитоз может возникать в апикальной и субапикальной областях роста и ядерной области, как показано синими стрелками (ЭР - эндоплазматический ретикулум) (Yang et al. 2021a).

У цветковых растений трубка может достигать большой длины и растет очень быстро, при этом живую, растущую часть трубки от вакуолизованного пыльцевого зерна отделяет каллозная пробка. Её функция – ограничивать объём цитоплазмы при постоянном удлинении трубки, то есть, экономить ресурсы трубки и повышать скорость роста (Williams 2008). При этом каллозные пробки не были обнаружены пока что ни у одного голосеменного, поэтому вся пыльцевая трубка, даже если она сильно разветвлена, является у этих растений единой непрерывной клеткой от прорастания до оплодотворения (Fernando et al. 2010).

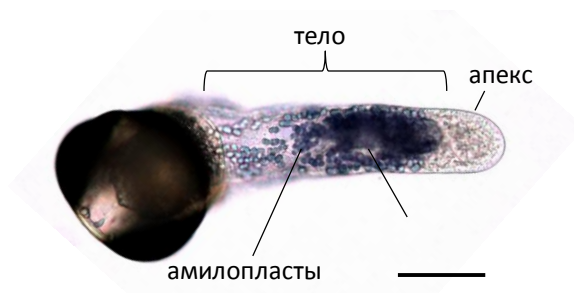


Схема 4. Пыльцевая трубка ели после 20 часов инкубации *in vitro*. Окрашивание на крахмал J<sub>2</sub>+KJ. Масштабная линейка 50 мкм (Breugina et al. 2021a).

Таким образом, цитологически поляризация выражается в первую очередь в зонировании цитоплазмы, а также в направленной секреции, однако есть и другие важные аспекты, такие, как архитектура цитоскелета и клеточной стенки и циклоз.

Циклоз в пыльцевой трубки имеет ярко выраженные особенности, связанные с полярным ростом: для цветковых растений характерно движение цитоплазмы с органеллами по траектории обращённого фонтана (Fernando et al. 2005; Cheung and Wu 2008), тогда как у хвойных растений направление противоположно: органеллы движутся вперед к кончику вдоль центральной оси и назад – по периферии клетки (Kroeger et al. 2009). Различное направление движения органелл в пыльцевых трубках покрыто- и голосеменных связывают с противоположной полярностью актиновых микрофиламентов (Justus et al. 2004; Chebli et al. 2013). Данные об ориентации микрофиламентов в трубках голосеменных отсутствуют, однако математическая модель подтверждает эту версию (Kroeger et al. 2009).

Для пыльцевых трубок цветковых растений характерен «осциллирующий рост», при этом выброс мембранного и стеночного материала происходит циклично, и трубка растёт не постоянно с одинаковой скоростью, а «рывками» (Feijo et al. 2001). Например, при изучении пыльцевых трубок лилии выяснилось, что скорость их роста колеблется с периодом 15–50 сек и составляет от 100 до 500 нм/с (Pierson et al. 1996). Колебательный характер роста трубок позволяет заглянуть в сеть взаимодействий, регулирующих морфогенез этих клеток. Эмпирические исследования осцилляций роста пыльцевых трубок направлены на раскрытие последовательности клеточных событий, составляющих один колебательный цикл, в то время как другие исследования пытались формализовать основные причинные взаимодействия через создание компьютерных моделей, в этом отношении к концу 2010х годов был достигнут значительный прогресс, суммированный в главе Ван Хемельрика, посвящённой осцилляциям роста, в книге «Pollen Tip Growth» (Van Hemelryck et al. 2017).

Одним из важнейших элементов, поддерживающий зонирование цитоплазмы, осцилляции и вообще механику полярного роста, является цитоскелет пыльцевой трубки (Geitmann and Emons 2000; Aouar et al. 2010; Chebli et al. 2013). Он устроен сходным образом в различных клетках, растущих кончиком, однако есть и особенности, в том числе, определяемые

систематическим положением растения. Особенности пыльцевых трубок хвойных растений мы рассмотрим ниже, в первую очередь речь здесь пойдет о более изученном объекте – пыльцевых трубках цветковых растений. В апикальной зоне крупные актиновые образования отсутствуют, короткие актиновые филаменты формируют динамичную сеть. В субапикальном компартменте располагается важная для полярного роста структура – актиновое кольцо/ошейник (Lovy-Wheeler et al. 2006; Nepler and Winship 2015), который не сразу был обнаружен в фиксированных пыльцевых трубках из-за своей хрупкости и нестойкости к альдегидной фиксации (Lovy-Wheeler et al. 2005). Что касается хвойных растений, у них кортикальное кольцо актина, по-видимому, отсутствует (Justus et al. 2004; Chen et al. 2007a), а апикальная зона имеет форму полумесяца. При этом в апикальной зоне у этих растений располагаются обильные скопления как актиновых филаментов, так и микротрубочек (De Win et al. 1996; Lazzaro 1996).

В более дистальной части трубки, как и в корневых волосках, актин формирует продольные тяжи. Эти тяжи более или менее параллельны направлению роста и служат для передвижения органелл в процессе циклоза (Geitmann and Emons 2000; Justus et al. 2004; Wu and Bezanilla 2018). Поскольку трубка – растущий объект, одним из свойств цитоплазматических зон и структуры цитоскелета является динамичность. Любые воздействия, затрагивающие механизмы роста, показывают эффект на структуру цитоскелета и скорость роста очень быстро. Показано, что конус/полумесяц везикул в апикальной зоне и движение цитоплазмы, как и сам полярный рост, нарушаются в присутствии ингибиторов взаимопревращений F- и G-актина (Gibbon et al. 1999; Vidali et al. 2001; Parton et al. 2001; Chen et al. 2007a). Кроме того, выявлены периодические колебания в структуре апикальной актиновой сети и, как следствие, в размерах апикальной зоны, свободной от крупных органелл. Принято считать, что эти осцилляции определяют колебательный характер роста трубки (Qian and Xiang 2019).

Участие элементов цитоскелета в поддержании роста пыльцевой трубки среди хвойных растений наиболее детально прослежена на *Picea* (Anderhag et al. 2000; Lazzaro et al. 2003, 2013; Chen et al. 2007a, 2009). Разрушение микрофиламентов полностью останавливало рост трубки. При этом движение везикул в кончике было дезорганизовано и, как следствие, был нарушен процесс строительства апикальной клеточной стенки (Anderhag et al. 2000; Chen et al. 2007a). Однако разрушение микротрубочек также останавливало рост пыльцевой трубки, нарушало движение органелл в кончике и организацию актиновых микрофиламентов (Justus et al. 2004; Zheng et al. 2010; Lazzaro et al. 2013). В этом эффекте проявились важные отличия трубок хвойных от покрытосеменных растений, у которых микротрубочки не являются необходимым участником полярного роста, а служат в основном для перемещения мужского гаметного модуля (Åström et al. 1995; Fu 2015; Wu and Bezanilla 2018). Более того, таким способом можно было изменить направление движения органелл: возникала характерная для покрытосеменных

картина обратного фонтана (Justus et al. 2004). Отметим, что аналогичный эффект наблюдали и в экспериментах с модуляцией концентрации в трубках внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (Lazzaro et al. 2005). Из этих данных можно сделать вывод о том, что движение органелл в пыльцевой трубке хвойных контролируют согласованно работающие микротрубочки и актиновые микрофиламенты (Lazzaro et al. 2013), которые, в свою очередь, находятся под контролем  $Ca^{2+}$ . Разделение функций и взаимодействие актинового и тубулинового цитоскелетов можно проиллюстрировать на примере движения митохондрий в пыльцевых трубках *Picea wilsonii* (Zheng et al. 2010). Актин и миозин осуществляют движение митохондрий, а динамика микротрубочек влияет на организацию актинового цитоскелета и тем самым они контролируют скорость, траекторию и местоположение митохондрий. Нарушение актинового цитоскелета также влияло на состав белков в культивируемой пыльце ели Мейера: было идентифицировано более 80 дифференциально представленных белков (из суммарных 600) (Chen et al. 2006), функционально сгруппированных в следующие категории: сигналинг, белки, ассоциированные с цитоскелетом, клеточный рост и углеводный метаболизм (Chen et al. 2006). В ответ на действие латрункулина существенно изменялась морфология аппарата Гольджи, митохондрий и амилопластов. Нарушения структуры органелл сочетались с дифференциальной экспрессией белков, участвующих в их работе. В данной работе впервые вскрыта сложная картина последствий разрушения актинового цитоскелета пыльцевой трубки, включая глобальные изменения белкового профиля и клеточной цитоархитектуры.

Другим важным структурным фактором, определяющим полярный рост, помимо цитоскелета, является клеточная стенка (Aouar et al. 2010). Самым ранним её компонентом является пектин, он откладывается непосредственно в апексе за счет экзоцитоза. Целлюлоза и каллоза у цветковых растений откладываются в дистальной зоне с участием специальных ферментных систем (синтаз), локализованных в плазмалемме трубки (Qin and Yang 2011; Mollet et al. 2013). Например, у табака отложение целлюлозного слоя начинается на расстоянии 5-15  $\mu\text{m}$  от кончика, каллоза появляется ещё дальше - около 30  $\mu\text{m}$  от кончика (Ferguson et al. 1998). Таким образом, состав клеточной стенки зависит от того, к какой функциональной зоне трубки она относится. Отличие между зонами состоит ещё и в том, что химическое состояние пектинов постепенно изменяется по мере того, как они из апикальной зоны переходят в субапикальную и далее (Geitmann 2010). Пектины, отложенные в кончике пыльцевой трубки, в значительной мере этерифицированы, тогда как в зонах, удаленных от кончика, они деэтерифицируются за счёт активности фермента пектинметилэстеразы, что приводит к градиентному повышению жёсткости и снижению эластичности пектинового геля по мере удаления от апекса (Rounds et al. 2011; Nepler et al. 2013). Этот градиент образуется за счет направленного везикулярного транспорта в растущей трубке. Этерифицированные пектиновые остатки, синтезированные в

аппарате Гольджи, секретируются в экстремуме апикального домена и там же встраиваются в клеточную стенку. В такой форме пектины не формируют гель, поскольку не связывают двухвалентные ионы, что делает кончик мягким и эластичным. Это служит структурной основой удлинения трубки в этой зоне. После того, как пектины перешли в зону субапекса, они начинают деэтерифицироваться. Эта модификация позволяет двухвалентным ионам, главным образом,  $\text{Ca}^{2+}$ , взаимодействуя с кислотными группами, сшивать между собой отдельные фрагменты пектинов с образованием полужесткого геля, который, вместе с другими полимерами, обеспечивает механическую прочность дистальным частям растущей трубки (Hasegawa et al. 2000). Изменения цитомеханических свойств клеточной стенки по мере удаления от кончика трубки были экспериментально изучены методом «микровдавливаний», который разработали канадские учёные (Geitmann and Parre 2004). Эти авторы впервые смогли показать, что количество и конфигурация пектинов является ключевым фактором, определяющим физические свойства апикальной клеточной стенки (Parre and Geitmann 2005a). Нарушение активности пектинметилэстеразы в результате мутации и применение эктопической пектин-метилэстеразы оказывали значительный эффект на рост и морфологию пыльцевых трубок, демонстрируя важность этого фермента в процессе их полярного роста (Franklin-Tong 1999; Geitmann 2011).

В субапикальной области в дополнение к пектинам в апопласте трубки начинает откладываться целлюлоза. Обработка ингибиторами синтеза целлюлозы вызывает апикальное набухание, то есть, изменение морфологии апикальной области. Это показывает, что целлюлоза участвует в контроле стабильности клеточной стенки в субапикальной области. Примечательно, что восстановление роста после временной остановки, вызванной обработкой такими ингибиторами, часто происходит в направлении, отличном от первоначального вектора роста (Aouar et al. 2010).

В сравнении с другими растительными клетками содержание целлюлозы в клеточной стенке пыльцевых трубок необычно низкое. Принципиальное различие между цилиндрической корневой клеткой и пыльцевой трубкой, конечно же, состоит в том, что первая растёт по всей своей длине, тогда как вторая удлиняется только на конце (Geitmann 2011), притом, что движущей силой роста в обоих случаях является тургорное давление. Чтобы предотвратить расширение стержневой части трубки, нужно сопротивляться тургору, для чего стенка в дистальной зоне должна быть усилена, и целлюлоза, как считают, играет важную роль в этом сопротивлении тургору по окружности трубки. Исходя из теоретических построений, предполагалось, что микрофибриллы должны были располагаться перпендикулярно продольной оси клетки. Однако выяснилось, что это не так. В пыльцевых трубках петунии и ели основное направление ориентации микрофибрилл целлюлозы было примерно  $45^\circ$  к

длинной оси (Sassen 1964; Derksen et al. 1999), а в пыльцевых трубках лилии и картофеля шаг спирали еще ниже - 20° и 15°, соответственно (Aouar et al. 2010). При таком отложении механическое сопротивление продольному изгибу ограничено, но меньшие (чем 90°) углы наклона обеспечивают значительное сопротивление также продольному напряжению сжатия и предотвращают изгиб трубки. Манипуляции с пыльцевыми трубками, растущими *in vitro*, с помощью микромеханических методов действительно показывают, что их стенки демонстрируют относительно высокое эластичное сопротивление изгибному напряжению, что подтверждает эту гипотезу (Geitmann and Parre 2004; Parre and Geitmann 2005a).

Помимо целлюлозы, в стенках пыльцевых трубок содержится сравнительно высокий процент другого полимера, идентичного по химическому составу, но имеющего другой паттерн пространственной организации – каллозы (Parre and Geitmann 2005b). Неравномерное распределение каллозы, которая, как и целлюлоза, присутствует только в дистальной части трубки, по крайней мере, частично является причиной механического усиления стержневой части. Устойчивость к растягивающему напряжению аморфного компонента клеточной стенки (каллозы) была продемонстрирована в опытах с ферментативным расщеплением этого полимера: оно приводило к увеличению диаметра клеток. Кроме того, методом микровдавливаний было показано, что у таких пыльцевых трубок жесткость стенки уменьшается, а вязкость, напротив, становится более выраженной (Parre and Geitmann 2005b; Geitmann 2011).

В пыльцевых трубках хвойных растений паттерн отложения компонентов стенки заметно отличается от такового у изученных видов цветковых растений, хотя есть и сходства (Lazzaro et al. 2003; Fernando et al. 2005). Так, у сосны каллоза встречается не в базальной части, а, напротив, на концах пыльцевых трубок и в относительно молодой части, а ближе к зерну исчезает (Derksen et al. 1999). Позже примерный состав стенок пыльцевой трубки был изучен для 14 видов голосеменных растений с помощью цитохимического окрашивания и моноклональных антител. Несмотря на небольшие различия, пыльцевые трубки Podocarpaceae, Pinaceae, Taxodiaceae и Cupressaceae (Coniferales) имели сходный состав компонентов стенки: много целлюлозы и арабиногалактановых белков присутствовало в стенке трубки, пектинов же почти у всех было мало (Yatomi et al. 2002). Только в пыльце *Cycas revoluta* было много пектинов, а у *Ginkgo biloba* в стенке трубки в большом количестве присутствовал  $\beta$ -(1,3)(1,4)-глюкан (гликан со смешанной связью). Каллоза была четко показана только в стенках пыльцевых трубок *Podocarpus nagi* и *Chamaecyparis obtusa* (с помощью анилинового синего), а также *Cryptomeria japonica* (с помощью моноклональных антител) (Yatomi et al. 2002). Подводя итоги, авторы отметили, что ни одна из исследованных пыльцевых трубок голосеменных не

имела стенок, подобных стенкам пыльцы покрытосеменных, которые состоят из двух слоев: пектинового внешнего слоя и каллозного внутреннего слоя (Yatomi et al. 2002). Эти результаты предполагают, что состав стенки пыльцевой трубки может отражать таксономические отношения между голосеменными и существенные отличия их типа и скорости роста от цветковых растений.

Ещё одно важное отличие касается пектинов. Кислые пектины в трубке сосны вообще не были обнаружены (Derksen et al. 1999), по-видимому, механизм повышения жесткости за счет деэтерификации у хвойных растения не функционирует. Позже какое-то количество их всё же было найдено (Fernando et al. 2010), но отсутствие регуляторной системы подтверждают и генетические исследования: специфичные для пыльцы пектинметилэстеразы не были обнаружены у базальных покрытосеменных или голосеменных растений (Wallace and Williams 2017). При исследовании экспрессии генов ПМЭ у базального цветкового растения *Nymphaea odorata* были обнаружены транскрипты четырех гомологов ПМЭ типа II и 16 гомологов типа I, которых было больше в пыльце и пыльцевых трубках, чем в вегетативных тканях (Wallace and Williams 2017). Предполагают, что усовершенствованный контроль за ПМЭ, появление специфичных для пыльцы ферментов, которые опосредуют деэтерификацию пектинов около кончиков пыльцевых трубок, являются консервативной особенностью покрытосеменных и определяет отчасти их способность к быстрому росту (Wallace and Williams 2017). Нейтральные пектины присутствуют в кончике трубки, а дальше исчезают, иногда оставаясь в следовых количествах в виде полос (Lazzaro et al. 2003). Целлюлоза присутствует в кончике пыльцевой трубки у *Pinus sylvestris* и *Picea abies*, а в более дистальной части является основным компонентом клеточной стенки (Derksen et al. 1999; Lazzaro et al. 2003). Специфическое ингибирование отложения микрофибрилл целлюлозы с помощью изоксабена приводит не только к остановке роста и раздуванию апекстов трубок, но и к дезорганизации микротрубочек (Lazzaro et al. 2003). Воздействие изоксабена на пыльцевые трубки ели, таким образом, подтверждает гипотезу о двусторонней взаимосвязи между микротрубочками и целлюлозой в этих клетках (Fernando et al. 2005).

## **2.2 Физиологические основы полярного роста**

### **2.2.1 Ионный гомеостаз**

#### **2.2.1.1 Гомеостаз и регуляторная роль $Ca^{2+}$ в растущей пыльцевой трубке**

За более чем 50 лет исследований роли кальция в полярном росте пыльцевой трубки было изучено внутриклеточное распределение ионов кальция в трубках ряда видов, что позволило сформулировать концепцию кальциевого градиента и установить его соответствие эффективности полярного роста. Была изучена динамика кальция в цитоплазме,

охарактеризованы токи кальция электрофизиологическими методами. Следует отметить, что такое пристальное внимание к теме и её подробное изучение связано с удобством пыльцевой трубки как модельного объекта, а также с универсальной ролью кальция как регуляторного элемента в процессе полярного роста. В связи с успехами секвенирования геномов модельных растений и прогрессом молекулярно-биологических методов ион-транспортные системы, обеспечивающие перенос  $\text{Ca}^{2+}$  у цветковых растений, в значительной мере идентифицированы; уточняются детали компартментации  $\text{Ca}^{2+}$  с применением белковых сенсоров. В последние годы ведутся работы по расшифровке регуляторной сети белков, способных связывать  $\text{Ca}^{2+}$  и обеспечивать дальнейшую трансдукцию сигнала при регуляции развития мужского гаметофита.

О наличии градиента  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в растущей пыльцевой трубке известно с 1975 года. Впервые измерения внутриклеточного кальция в пыльцевых трубках лилии (*Lilium longiflorum*) были проведены с использованием  $^{45}\text{Ca}$  и низкотемпературной автордиографии (Jaffe et al. 1975). Установленный факт многократно подтверждался, данные уточнялись на разных объектах с применением новых методических подходов, главным образом, основанных на различных флуоресцентных индикаторах: проникающих в клетку, мембранно-связанных или инъецированных (Reiss and Herth 1978; Reiss et al. 1985; Reiss and Nobiling 1986; Nobiling and Reiss 1987; Rathore et al. 1991; Lazzaro et al. 2005; Cardenas et al. 2008; Rounds et al. 2011; Qu et al. 2012, 2016). В эпоху разработки белковых флуоресцентных индикаторов градиенту  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  вновь стали посвящать публикации (Iwano et al. 2004; Diao et al. 2018). Как показали проведенные исследования, градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  характерен для всех изученных покрытосеменных растений, а также для хвойных растений (Fernando et al. 2005; Breygina et al. 2021a).

Считается, что градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  присутствует только в растущих пыльцевых трубках. После гибели или добавления в среду блокаторов или антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов градиент в кончике пыльцевой трубки исчезал, а рост трубки прекращался. Однако эффект был обратимым, и когда трубки переносили в среду без ингибиторов, они быстро восстанавливали градиент  $\text{Ca}^{2+}$  и возобновляли рост (Konrad et al. 2018). У цветковых растений с помощью флуоресцентных красителей были выявлены сопряженные осцилляции скорости роста пыльцевой трубки и  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ; оказалось, что эти показатели колеблются с одинаковым периодом и совпадают по фазе (Pierson et al. 1996). В то же время, колебания  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  не были обнаружены при росте пыльцевой трубки, растущей в пестике, однако это пока что единичные данные (Iwano et al. 2009).

Кратко охарактеризуем исследованные к настоящему моменту аспекты регуляторной функции кальция в процессе полярного роста. Так, диссипация градиента и резкое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , по-видимому, являются ключевыми механизмами, ведущими к абортации пыльцы при самонесовместимости (Franklin-Tong et al. 2002). Также градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  играет



ключевую роль в определении направления роста. Эксперименты научной группы Малхо, в которых направление роста трубок *in vitro* изменялось при помощи искусственных воздействий, показали, что  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  играет в этом ключевую роль. Так, направление роста пыльцевых трубок *Agapanthus umbellatus* может быть изменено ионофоретическим введением  $Ca^{2+}$  и слабыми электрическими полями, которые заставляли пыльцевые трубки расти по направлению к катоду. Приложение локального градиента ионофора A23187, который, как полагают, открывает  $Ca^{2+}$ -проводящие каналы, вызывало переориентацию кончика пыльцевой трубки в сторону воздействия. Когда в питательную среду добавляли блокатор  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов  $GdCl_3$ , трубки начинали расти в сторону, противоположную воздействию. Накопление свободного  $Ca^{2+}$  в цитозоле предшествовало переориентации кончика и позволяло предсказывать направление роста (Malho et al. 1994). Позднее это наблюдение дополнил тот факт, что регистрируемая с помощью внутриклеточных сенсоров переориентация градиента предшествует повороту растущей трубки во всех опытах (Dumas and Gaude 2006; Chae and Lord 2011; Diao et al. 2018). Увеличение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в момент входа пыльцевой трубки в семязачаток непосредственно перед её разрывом и высвобождением спермием из цитоплазмы зарегистрировано при культивации пыльцы в системах *semi-in-vivo* (Palanivelu and Preuss 2006; Diao et al. 2018). Дальнейшая демонстрация значения внутриклеточного свободного  $Ca^{2+}$  была получена путем микроинъекции временно связанного (caged)  $Ca^{2+}$  в живые пыльцевые трубки. После введения комплекса трубки облучались ультрафиолетовым светом с одной стороны в районе их кончика, что вызвало фотолиз комплекса и локальное высвобождение  $Ca^{2+}$  в апексе. Локальное повышение уровня свободного  $Ca^{2+}$  вызвало переориентацию роста кончика в сторону облученного участка. Эта картина дополнялась локальным снижением уровня  $Ca^{2+}$  на противоположной стороне трубки, в результате чего переориентация роста становилась устойчивой и сохранялась (Malho et al. 1995; Malho and Trewavas 1996). Кальций-зависимая киназа, локализованная в кончике пыльцевой трубки, также может принимать участие в определении направления роста трубки в результате связывания  $Ca^{2+}$  (Moutinho et al. 1998; Gutermuth et al. 2018). Система навигации трубки с помощью кальция, по-видимому, функционирует *in vivo*, параллельно с другими направляющими факторами (в основном пептидной природы), которых мы не будем здесь касаться. Работ, подтверждающих наличие доступного кальция в тканях рыльца, довольно много, уже изучен целый ряд видов, включая подсолнечник, хлопок, табак, капусту, батат, иглицу колючую и первоцвет (Zheng et al. 2019). Наиболее поздние из работ на эту тему была проведены Ge с соавторами на табаке и Wei с соавторами на капусте, при этом в первой работе был проанализирован не только уровень кальция в пестике, но и его поглощение пыльцевыми трубками. Для обнаружения слабосвязанного кальция в обеих работах использовался антимонат калия. У табака рыльце при

готовности к опылению покрывается слоем гликопротеинового экссудата. В этом слое много пузырьков, в которых авторы обнаружили обильный осадок соли кальция. Во время опыления отложения кальция были обнаружены главным образом в рыльце, гораздо меньше было обнаружено в проводниковом тракте. Через 22 часа после опыления концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в проводниковом тракте значительно возрастает, причем неравномерно, градиент прослеживается от границы с рыльцем до завязи (Ge et al. 2009). В пестике капусты  $\text{Ca}^{2+}$  также образует градиент от верхушки к основанию столбика. В этом случае градиент прослеживается и до опыления, но после уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в проводниковом тракте увеличивается, и градиент стал более выраженным (Wei et al. 2010a). Накопление  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащего осадка в зоне апертуры пыльцевого зерна табака при прорастании *in vivo* свидетельствует о том, что пыльца поглощает  $\text{Ca}^{2+}$ . Осадок антимоноита кальция, который накапливается в цитоплазме вегетативной клетки, изначально концентрируется в небольших вакуолях, но по мере прорастания они, по-видимому, сливаются, образуя ярко выраженные плотно окрашенные везикулы, которые преимущественно накапливаются вблизи проксимальной области растущей трубки (Ge et al. 2009). Таким образом, кальций не только участвует в поддержании полярного роста и восприятии различных сигналов, но может и непосредственно направлять трубки, врастающие в пестик.

Как говорилось выше, большое число работ посвящено системам трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в пыльцевой трубке и деталям регуляции их работы (Hepler et al. 2012; Konrad et al. 2018; Zheng et al. 2019; Yang et al. 2021a).

Как и в других растительных клетках, в пыльцевой трубке низкое базальное значение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  поддерживается благодаря активному экспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в апопласт и во внутриклеточные компартменты. Одной из важнейших транспортных систем является  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза плазмалеммы. Участие  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин-активируемой АТФазы АСА9 в активном выкачивании  $\text{Ca}^{2+}$  из растущей пыльцевой трубки было показано в работе Шиёт с соавторами на *Arabidopsis* (Schiøtt et al. 2004). С помощью экспрессии репортера GUS под промотором АСА9 показана преимущественная экспрессия гена АСА9 в пыльце. Конфокальная микроскопия демонстрирует, что конъюгат АСА9-YFP локализуется в плазматической мембране равномерно по длине пыльцевой трубки. Т-инсерционные мутанты по гену *aca9* характеризуются частичной мужской стерильностью. При опылении растений дикого типа пыльцой *aca9* происходит снижение семенной продуктивности более чем на 80%. Все эти факты подчеркивают важную роль АТФазы в экспорте  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы. В результате работы фермента избыточный кальций из цитозоля поступает в клеточную стенку. Как было указано выше, состав стенки пыльцевой трубки неоднороден по длине: у цветковых растений в апикальной части локализованы преимущественно нейтральные пектины, которые в дальнейшем деэтерифицируются с участием пектинметилэстеразы; высвобождающиеся карбоксильные

группы галактуроновой кислоты связывают доступные двухвалентные катионы, основным из которых является  $\text{Ca}^{2+}$ , за счёт чего образуется более плотный пектиновый матрикс (Bosch and Hepler 2005). Благодаря присутствию пектинов клеточная стенка является резервуаром для  $\text{Ca}^{2+}$  и обладает «буферной ёмкостью», оказывая влияние на транспорт этого иона через плазмалемму. Как отмечено в обзоре Хеплера с соавторами, токи  $\text{Ca}^{2+}$ , которые доступны для измерения в пыльцевых трубках, отражают суммарный процесс переноса кальция, который включает перенос через каналы плазмалеммы и движение в клеточной стенке, причем вклад клеточной стенки, по мнению авторов, преобладает (Hepler et al. 2012). В связи с этим объектом, пригодным для непосредственного изучения систем транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , являются в первую очередь протопласты.

В отличие от выкачивания ионов кальция, поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль происходит пассивно, без затрат энергии, из апопласта или внутриклеточных компартментов через каналы. Ещё на заре электрофизиологических исследований в апикальной части пыльцевой трубки был обнаружен входной ток, который был описан как ток  $\text{Ca}^{2+}$  (Weisenseel et al. 1975). Позднее другие авторы подтвердили, что градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  и вход  $\text{Ca}^{2+}$  тесно связаны с ростом трубки (Pierson et al. 1996). Ингибиторы  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих каналов нифедипин и трёхвалентные катионы  $\text{Gd}^{3+}$  и  $\text{La}^{3+}$  вызывали диссипацию градиента и одновременно блокировали рост пыльцевой трубки. Таким образом, градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  поддерживается за счет активности  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих каналов плазмалеммы, и функционирование этой системы критически важно для поддержания полярного роста.

Каким образом кальций управляет ростом? Логично было предположить, что  $\text{Ca}^{2+}$  контролирует процесс экзоцитоза, как и при секреции нейромедиаторов в клетках животных, но при регистрации колебаний роста и внутриклеточной концентрации кальция в пыльцевых трубках второй показатель всегда отставал по фазе от первого, что не укладывалось в эту модель (Konrad et al. 2018). Понимание роли кальция стало возможным благодаря изучению белков-участников процесса экзоцитоза: комплекса экзоцисты и Rop ГТФаз (Woollard and Moore 2008; Yang and Lavagi 2012; Žárský et al. 2013). Субъединица экзоцисты SEC3a взаимодействует со специфическими мембранными липидами в кончике пыльцевой трубки, и ее субклеточная локализация определяет место слияния везикул с мембраной (Bloch et al. 2016). Максимумы активности ROP1 в апикальной плазматической мембране, как и пиковые значения  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , опережают по фазе быстрый рост, и, предположительно, ROP1 может контролировать приток  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану кончика (Gu et al. 2005; Hwang et al. 2005). Одним из ключевых игроков в хемотаксическом направлении пыльцевых трубок являются LURE, богатые цистеином аттрактантные пептиды, секретлируемые синергидами (Okuda et al. 2009). Рецепторы LURE PRK6 и MDIS1 вместе с их корецепторами MIK1 и MIK2 служат для

внешнего контроля за экзоцитозом (через сигналинг с участием ROP1 Rho ГТФазы) (Takeuchi and Higashiyama 2016; Wang et al. 2016a; Luo et al. 2017; Zhang et al. 2017). Однако до сих пор остается в значительной степени неясным, как  $Ca^{2+}$  регулирует удлинение трубки, обеспечиваемое экзоцитозом, и как рецепторы LURE управляют этим процессом. В семязачатке 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК), предшественник синтеза этилена, стимулирует GLR-зависимое повышение  $Ca^{2+}$ , что, в свою очередь, способствует секреции LURE1 и привлечению пыльцевых трубок синергидами (Mou et al. 2020).

Под контролем  $[Ca^{2+}]$  находится также структура и динамика актинового цитоскелета, контролируемая многочисленными белками (Cai et al. 2015). Среди  $Ca^{2+}$ -зависимых актин-связывающих белков следует упомянуть, например, профилин, белки, содержащие домен LIM, ROP-интерактивный и CRIB-мотив-содержащий белок 1 (RIC1), а также виллины (Qian and Xiang 2019). Высокий уровень  $[Ca^{2+}]$  в кончике трубки поддерживает ремоделирование актина и обеспечивает его существование в виде редких коротких филаментов, тогда как низкий уровень  $[Ca^{2+}]$  в области хвостовика коррелирует с достаточно толстыми и стабильными актиновыми кабелями; основными медиаторами в этих отношениях являются белки суперсемейства виллин/гельзолин/фрагмин (Cai et al. 2015; Qian and Xiang 2019); субапикальная актиновая бахрома тесно связана со щелочной полосой, предположительно, через фактор деполимеризации актина (ADF) и взаимодействующий с актином белок 1 (AIP1) (Chen et al. 2002; Lovy-Wheeler et al. 2006). Таким образом, провоцируя приток  $Ca^{2+}$  в кончик пыльцевой трубки и регулируя внутриклеточный pH, АФК могут тем самым влиять на актиновый цитоскелет.

В целом можно заключить, что  $Ca^{2+}$ , по-видимому, принадлежит лидирующая и организующая роль в ионной регуляции развития мужского гаметофита цветковых растений. Что касается голосеменных растений, то у них роль этого иона изучена значительно слабее. В качестве модельных объектов в исследованиях кальциевого гомеостаза использовали пыльцу сосны Бунге (Wu et al. 2008) и различных видов ели (Lazzaro et al. 2005; Chen et al. 2008, 2009). Распределение  $Ca^{2+}$  в трубках выявляли с помощью инъецированных флуоресцентных красителей, что позволило описать апикальный кальциевый градиент, значительно более пологий, чем у покрытосеменных растений. В пыльцевых трубках *Picea abies* цитозольная концентрация  $Ca^{2+}$  изменялась с 450 нМ в экстремуме апекса до 225 нМ в основании чистой зоны (Lazzaro et al. 2005). Подобный же паттерн наблюдался и у других видов в контрольных условиях.

Блокирование кальциевых каналов плазмалеммы, естественно, уменьшало кальциевые токи, приводило к диссипации градиента и снижало внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в пыльцевых трубках *Picea abies*, *P. wilsonii* и *P. bungeana* (Lazzaro et al. 2005; Chen et al. 2008;

Wu et al. 2008). У сосны Бунге применение ингибитора нифедипина вызывало ряд цитологических эффектов и изменение набора экспрессируемых белков (Wu et al. 2008). Ранний ответ (в течение часа после блокирования кальциевых каналов) включал нарушения ультраструктуры органелл (митохондрий, аппарата Гольджи и ЭПР) и изменения состава белков, участвующих в генерации энергии и сигналинге (Wu et al. 2008). Вслед за этим (и очевидно, вследствие этого) начиналась деполимеризация актина, возникал дисбаланс эндо- и экзоцитоза и нарушения процессов строительства клеточной стенки. Эти результаты демонстрируют необходимость входных потоков кальция через плазмалемму для всестороннего поддержания активного роста пыльцевой трубки. У ели Вильсона с применением двух других ингибиторов изучали последствия блока входа кальция с точки зрения строительства клеточной стенки. Оказалось, что, помимо ожидаемых эффектов на ростовые процессы, оба ингибитора сильно изменяли морфологию трубки, например, вызывали сильное накопление каллозы в области кончика, а также паттерн отложения других стеночных компонентов, таких, как пектины и арабиногалактановые белки, причем это было показано двумя независимыми методами (Chen et al. 2008), что указывает на тесную связь между гомеостазом кальция и строительством клеточной стенки.

### ***2.2.1.2 Гомеостаз, транспорт и градиент $H^+$ в растущей пыльцевой трубке***

Важную роль в росте пыльцевой трубки играет величина рН цитозоля и трансмембранные протонные токи. Впервые сообщение о токах протонов в пыльцевой трубке сделали Weisenseel и Jaffe, которые изучали растущую трубку лилии с помощью неселективных микроэлектродов (Weisenseel and Jaffe 1976). Изменяя состав среды, они пришли к заключению, что выходной ток заряженных частиц в субапикальной области формируется за счёт  $H^+$  и предположили, что за него отвечает протонная помпа. Несколько позднее была описана удивительная способность растущих трубок закислять среду, в которой они находятся, причем в отсутствие буферной смеси трубки могли сдвигать рН настолько, что он становился неоптимальным для роста (Turý and Řhová 1984). В работе классика физиологии полярного роста Фейжо с соавторами с помощью рН-чувствительного красителя BCECF в растущей пыльцевой трубке лилии был впервые выявлен градиент рН сложной формы (Feijó et al. 1999): в апикальной части трубки рН кислый (6.8), в субапикальной зоне расположен «щелочной пояс» со значением рН около 7.5. В стержневой части пыльцевой трубки рН нейтральный. Поддержание щелочных значений рН в субапикальной области является результатом активности  $H^+$ -АТФазы (см. далее), тогда как кислые значения рН в апикальной части, по общепринятому мнению, обусловлены входом протонов через неселективные катионные каналы (Hepler et al. 2006). Совпадение колебаний рН и  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  по фазе подтверждает предположение о том, что вход  $H^+$  и  $Ca^{2+}$  осуществляется через единую транспортную систему.

Также вход протонов может быть опосредован транспортерами семейства СНХ, которые активно экспрессируются в пыльце (Michard et al. 2009).

Таким образом, в растущей трубке происходит циркуляция протонов: активный выход происходит в стержневой части трубки, но максимален в области «щелочного пояса», в то время как пассивный вход происходит в апикальной зоне. С помощью ингибиторного анализа показано, что поддержание кислых значений рН в апикальной области пыльцевой трубки необходимо для её роста (Nepler et al. 2006), при этом в нерастущих трубках «кислый кончик» отсутствует. Ранние данные о протонных токах подверглись критике, попытки опровергнуть наличие градиента рН и значение этого параметра предпринимались в 90е годы XX века (Fricker et al. 1997). Существование протонного градиента в пыльцевых трубках цветковых растений было многократно показано и является общепзванным фактом. Для пыльцевых трубок голосеменных растений таких данных не было до начала нашей работы (Breugina et al. 2021a).

$H^+$ -АТФаза плазмалеммы растительной клетки выполняет две основные функции: регуляция мембранного потенциала и контроль рН цитоплазмы (Falhof et al. 2016). На разных объектах была выявлена прямая зависимость между активностью протонной помпы и скоростью роста пыльцевой трубки: подавление активности  $H^+$ -АТФазы специфичным ингибитором ортованадатом приводило к замедлению роста, в то время как ее стимуляция фузикококцином ускоряла рост у табака и лилии (Feijó et al. 1992; Матвеева et al. 2002). Локализация протонной помпы в мембране вегетативной клетки мужского гаметофита цветковых растений изучалась несколькими методами. Обермейеру с соавторами с использованием моноклональных антител удалось впервые продемонстрировать полярное распределение  $H^+$ -АТФазы в пыльцевом зерне *Lilium longiflorum* (Obermeyer et al. 1992), однако трубка давала слабый сигнал. Позднее на одном из видов табака (*Nicotiana plumbaginifolia*), также с использованием антител, сигнал в трубке был получен, и впервые показано неравномерное распределение белка  $H^+$ -АТФазы в плазмалемме (Lefebvre et al. 2005). NpPMA5 отсутствует в апикальной и базальной частях трубки, но равномерно распределена по основной длине. Позднее Сертал с соавторами изучали распределение конъюгата  $H^+$ -АТФазы NtАНА с флуоресцентной меткой GFP в пыльцевой трубке табака (Certal et al. 2008): было показано, что NtАНА отсутствует в апикальной части трубки. Иммунолокализация фермента в пыльцевых трубках петунии показали, что  $H^+$ -АТФаза присутствует по всей длине трубки, за исключением апикального компартмента, а в субапикальной области формирует скопления (Kovaleva et al. 2016). Таким образом, обнаруженная у нескольких видов локализация протонной помпы хорошо согласуется с расположением максимальных протонных токов (Certal et al. 2008; Hoffmann et al. 2020) и внутриклеточным градиентом рН (Feijó et al. 1999). Полученные данные

свидетельствуют в пользу предположения, что полярные токи  $H^+$ , поддерживаются, в первую очередь, благодаря полярному распределению  $H^+$ -АТФазы, а не регуляции её активности.

Прямые доказательства связи между продуктами ряда генов АНА и функциями, которые они выполняют в клетке, были получены не так давно на *Arabidopsis* (Hoffmann et al. 2020). Авторы показали, что специфичные для мужского гаметофита изоформы  $H^+$ -АТФазы АНА6, АНА8, и АНА9 необходимы для поддержания полярного роста и фертильности. При этом любопытно, что пыльцевые трубки двойных мутантов *aha6/8* росли с той же скоростью, что и трубки дикого типа, но останавливались в своем росте значительно раньше, а трубки *aha6/9* прорастали позже и росли медленнее, чем дикий тип, но достигали практически такой же длины. На основании этих наблюдений авторы заключили, что разные изоформы протонной помпы подключаются к процессу полярного роста не одновременно: на ранних этапах функционируют главным образом АНА6 и АНА9, а для поддержания роста важнее АНА6 и АНА8. У тройного мутанта рост был сильно нарушен на всех стадиях, трубки были аномальной формы, волнистые и значительно короче, чему в пыльце дикого типа. Кроме ожидаемых подавления ростовых процессов у мутантов были выявлены сдвиги рН и нарушения формы градиента, причем у мутантов по разным изоформам форма градиента различалась, что совпадало с неравномерной преимущественной локализацией трёх изоформ в трубке. Устойчивая корреляция между скоростью роста и крутизной градиента рН была выявлена в популяции индивидуальных трубок, с абсолютными значениями рН корреляции не было (Hoffmann et al. 2020), что подтверждают и более ранние исследования (Fricker et al. 1997).

Активность протонной помпы регулируется с помощью 14-3-3 белка, который был обнаружен в микросомальной фракции, выделенной из пыльцевых зёрен и пыльцевых трубок лилии, с помощью моноклональных антител (Pertl et al. 2001). В той же работе было элегантно показано, что  $H^+$ -АТФаза участвует в регуляции тургорного давления у *Lilium longiflorum* (Pertl et al. 2010). При снижении тургорного давления в результате гиперосмотического шока в трубке сначала увеличивалось содержание 14-3-3 белка, активирующего протонную помпу, а затем возрастала её активность. Авторы предположили следующий механизм наблюдаемого эффекта: активация  $H^+$ -АТФазы приводит к гиперполяризации плазматической мембраны, которая служит движущей силой для входа ионов, а они, в свою очередь, увеличивают осмотическое давление цитоплазмы. Повышение осмотического давления цитоплазмы приводит к входу воды в клетку, и, следовательно, к восстановлению тургорного давления. Как ни странно, в позднейшей работе с мутантами по трём генам  $H^+$ -АТФазы нарушения тургорного давления выявлено не было (Hoffmann et al. 2020), что может быть связано с остаточной активностью других изоформ, которые, хотя и не являются специфичными для пыльцы, но в небольших

количествах экспрессируются мужском гаметофите, а также с другими компенсаторными механизмами.

Интересно обсудить место градиента pH в общей картине регуляции полярного роста, его связь со структурными факторами, поддерживающими рост, такими, как цитоскелет и направленная секреция. Обратимое ингибирование роста пыльцевой трубки цианистым калием и последующее восстановление нормального распределение ионов кальция, pH и паттерна секреции (Winship et al. 2016) указало на важную роль градиента pH в этом процессе: щелочной пояснок восстанавливался первым, и лишь затем возвращались к норме градиент  $Ca^{2+}$ , поляризованная секреция и рост трубки. Закисление пыльцевых трубок лилии ацетатом натрия блокировало полярный рост и демонстрировало связь между наличием щелочного пояска и субапикального актинового кольца: обе структуры сдвигались в апикальную зону после исчезновения «кислого кончика» (Lovy-Wheeler et al. 2006). Локализация двух белков, ассоциированных с актиновым кольцом, ADF (actin depolymerizing factor) и AIP (actin-interacting protein) также претерпевала изменения в закисленных трубках (Lovy-Wheeler et al. 2006). В норме ADF, возможно при участии AIP1, отвечает на щелочные значение pH, которые поддерживаются в субапикальной зоне, и стимулирует локальную перестройку цитоскелета (Chen et al. 2002; Allwood et al. 2002). Таким образом, pH может контролировать структуру актина через актин-ассоциированные белки и, следовательно, поддерживать правильную схему секреции. На это указывают и данные о структуре цитоскелета у мутантов по генам *aha*: изменения в актиновом цитоскелете наблюдались у всех исследованных мутантов, вплоть до разрушения субапикального актинового кольца и полной разборки актиновых элементов в апексе (Hoffmann et al. 2020).

Интересно отметить связь между ионами кальция и протонами в пыльцевой трубке. Li с соавторами пытались разобраться, регистрируя одновременно градиент обоих ионов, а также скорость роста (Li et al. 2021). Для воздействия на градиенты были выбраны изменения pH и гипоосмотический шок. Закисление среды относительно стандартной (с pH 5.8 до pH 5.0) повышало скорость роста, уровень  $[H^+]_{\text{цит}}$  и  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в кончике трубки. Напротив, защелачивание среды до pH 6.8 блокировало рост, рассеивало градиент pH и приводило к выраженным высокоамплитудным колебаниям  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  и  $[H^+]_{\text{цит}}$ . Эффект был обратимым: после переноса на стандартную среду рост и параметры ионного гомеостаза восстанавливались. Гипоосмотический шок приводил ко временному усилению градиентов кальция и протонов. Экспериментальное усиление либо рассеивание апикального градиента протонов приводило, соответственно, к ускорению либо замедлению роста. Чтобы проверить, имеет ли значение для ускорения роста pH цитозоля или внешней среды, использовали слабую кислоту, которая в протонированной форме может проникать через мембрану, высвобождая протон в цитозоле и,



тем самым, закисляя его (Brummer et al. 1984). Такое закисление также провоцировало ускорение роста. Ускорение роста с помощью закисления вызывало повышение  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  в кончике, однако не слишком значительное. Для того, чтобы проверить, насколько ускорение роста может быть опосредовано кальцием, применяли 3 мМ кофеин, который, как было ранее показано, эффективно рассеивает градиент ионов кальция в трубках, и обнаружили, что при такой обработке, на самом деле, рассеиваются оба градиента, а рост, соответственно, блокируется. Однако эффект был обратимым, и после вымывания кофеина, а также в результате любых перечисленных влияний на рост, его скорость коррелировала гораздо лучше с апикальным уровнем  $[H^+]_{\text{cyt}}$ , чем  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , что, в принципе, и предполагали на основании более ранних исследований (Winship et al. 2016; Hoffmann et al. 2020).

### **2.2.1.3 Гомеостаз и регуляторная роль $K^+$ в процессе роста пыльцевой трубки**

В пионерской работе Weisenseel и Jaffe с помощью неселективных микроэлектродов и изменений состава среды был показан вход  $K^+$  в растущий кончик пыльцевой трубки *Lilium longiflorum* (Weisenseel and Jaffe 1976). В дальнейшем системы транспорта  $K^+$  активно изучались методом пэтч-кламп на протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен и трубок. Фан с соавторами охарактеризовали выходные  $K^+$  каналы в протопластах из пыльцы китайской капусты и исследовали зависимость их активности от наружного и внутриклеточного рН (Fan et al., 2003). Оказалось, что активность выходных  $K^+$  каналов уменьшается при закислении наружной среды (до рН = 4.5), однако при рН > 5.8 пропадает чувствительность к этому показателю.

Фэн с соавторами изучали влияние  $K^+$  на рост пыльцевых трубок *Arabidopsis* и обнаружили связь между  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  (Fan et al. 2001). Входные токи  $K^+$ , измеренные методом пэтч-кламп ингибировались высоким уровнем  $Ca^{2+}$  во внешней среде (10-50 мМ). Позже был идентифицирован входной  $K^+$ -канал Shaker-типа SPIK, ген которого специфически экспрессируется в пыльце *Arabidopsis* (Mouline et al. 2002). Ряд электрофизиологических характеристик этого канала близки к параметрам входного тока  $K^+$ , охарактеризованного в работе Фэна с сотрудниками на протопластах из пыльцевых зёрен китайской капусты (Fan et al. 2003a). По-видимому, SPIK является основным каналом, обеспечивающим вход  $K^+$  в пыльцевую трубку *Arabidopsis*. Позднее было показано на том же объекте, что на активность канала влияет кальций: высокая  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  подавляла входящий ток  $K^+$ . При этом у мутантов по генам  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ CPK11 и CPK24 высокий уровень кальция не оказывал эффекта на вход  $K^+$  (Zhao et al. 2013). В результате исследования взаимодействия между киназами авторы предложили следующую схему сигнального каскада, который обеспечивает регуляцию гомеостаза ионов калия в растущей пыльцевой трубке:  $Ca^{2+} \rightarrow CPK11 \rightarrow CPK24 \rightarrow K^+$  канал.

#### 2.2.1.4 Транспорт анионов , их градиент и роль в процессе роста пыльцевой трубки

Если данные о регуляторной роли кальция в пыльцевых трубках, токах кальция и белках, которые его переносят и связывают, публикуются уже несколько десятков лет, то анионный транспорт в пыльце до начала 2000х годов вообще не изучали, а наибольшее развитие тема получила в 2010х годах. Пионерские опыты в рамках этой темы были проведены в двух лабораториях: нашей (под руководством проф. Ермакова) и в совместных исследованиях чешских и португальских коллег. Здесь я приведу данные зарубежных коллег и сотрудников нашей лаборатории до моего участия, остальные исследования будут описаны подробно в Главе IV. Матвеева с соавторами с помощью ингибиторного анализа показали значение трансмембранного транспорта  $Cl^-$  в процессе прорастания пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* (Матвеева et al. 2003b, a): ингибиторы анионных каналов NPPB и нуфлимовая кислота в низких концентрациях полностью подавляли прорастание. Токи  $Cl^-$  в растущей пыльцевой трубке были изучены с использованием нового на тот момент метода ионоселективных электродов (Zonia and Cordeiro 2002). Было показано, что в апикальной части трубки происходит осциллирующий выход  $Cl^-$ , а в основании чистой зоны и в стволовой части трубки происходит вход  $Cl^-$ . Таким образом,  $Cl^-$  циркулирует в пыльцевой трубке от базальной части к апикальной. Совпадение по частоте колебаний скорости роста пыльцевой трубки и выходных токов  $Cl^-$  в апексе подчеркивает участие  $Cl^-$  в процессе роста. Было показано, что ингибиторы анионных каналов NPPB (20  $\mu$ M), нуфлимовая кислота (40  $\mu$ M) и DIDS (80  $\mu$ M) эффективно блокируют рост трубок и вызывают расширение апекса, причем под действием DIDS плазмалемма пыльцевых трубок лопалась в течение 5-10 минут, что указывает на роль анионных каналов в осморегуляции (Zonia and Cordeiro 2002). Для исследования возможных путей регуляции анионных каналов Zonia с соавторами использовали инозитол-3,4,5,6-тетрафосфат ( $IP_4$ ) – негативный регулятор активности анионных каналов в клетках человека и других млекопитающих (Zonia and Cordeiro 2002). Было показано, что введение  $IP_4$  в пыльцевую трубку приводит к сокращению скорости роста на 85% и вызывает увеличение объема трубки, аналогично ингибитору DIDS.

Следует отметить, что после первой публикации об анионных токах, записанных с помощью вибрирующих электродов, которые оказались самыми сильными из всех токов в пыльцевой трубке, некоторые ученые были настроены критически, конкурирующая научная группа даже предпринимала попытки опровержения описанных результатов, представив их как артефакт измерения (Messerli and Robinson 2003). Однако, после этого анионные токи измерялись много раз, и сейчас никто не сомневается в их существовании.

Продолжая исследования после выхода ряда наших публикаций (Брейгина et al. 2009a, 2010; Breygina et al. 2010b), Тавареш с группой португальских исследователей

охарактеризовали анионные токи в протопластах из пыльцевых зёрен лилии методом пэч-кламп (Tavares et al. 2011). Выходной ток анионов включал три компонента, различающихся по степени чувствительности к NPPВ. Все обнаруженные токи модулировались изменением  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Позже связь между анионами и ионами кальция была изучена более подробно. Для этой группа исследователей применила метод двухэлектродной фиксации потенциала, который позволил одновременно кратковременно изменять мембранный потенциал в трубке и записывать в реальном времени флуоресцентные данные о  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  и  $[anion]_{\text{цит}}$  (Herbell et al. 2018). Было установлено, что импульсная гиперполяризация мембраны вызывает активацию  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов, вход  $Ca^{2+}$  и рост  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Индуцированное гиперполяризацией увеличение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  успешно блокировалось хлоридом лантана. Одновременная с электростимуляцией регистрация флуоресценции белкового сенсора анионов позволила показать снижение  $[anion]_{\text{цит}}$  в субапикальном регионе, сопряженное с увеличением  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Применив  $LaCl_3$ , исследователи заблокировали этот эффект, анионы накапливались в апексе (Herbell et al. 2018). В том же году впервые был описан градиент анионов в пыльцевых трубках табака, что стало возможным благодаря экспрессии белкового сенсора, в основе функционирования которого перенос энергии возбуждения по механизму Фёрстера (FRET). Концентрация анионов максимальна в стержневой части пыльцевой трубки (20–50  $\mu\text{m}$  от апекса), а в апексе, субапикальной зоне (<10  $\mu\text{m}$ ) и в базальной части концентрация анионов относительно низкая (Gutermuth et al., 2013). NPPВ вызывал диссипацию градиента и ингибировал рост пыльцевых трубок. Впоследствии на основании этих данных, а также результатов, полученных ранее для других ионов и наших данных по мембранному потенциалу, Липчинским была разработана и предложена осмофоретическая модель движения в пыльцевой трубке (Lipchinsky 2015, 2018). В соответствии с ней, следствием существования анионного градиента в пыльцевой трубке является градиент водного потенциала, который обеспечивает осмофоретическое движение везикул в апексе.

Были описаны два гена анионных каналов пыльцевых трубках *Arabidopsis*: SLAN3 и ALMT12 (Gutermuth et al. 2013). При этом гены принадлежат к разным семействам и различаются по кинетическим характеристикам: ALMT12 (ALuminum-activated Malate Transporter) является каналом с быстрой деактивацией, а SLAN3 – с медленной деактивацией). С помощью флуоресцентной метки было показано, что SLAN3 равномерно распределен на плазмалемме. Можно было предположить, что описанная ранее неравномерность анионных токов вдоль трубки поддерживается за счёт регуляции активности каналов, например, кальцием. В качестве потенциальных регуляторов рассматривались протеинкиназы CDPK2 и 20, заякоренные в плазмалемме. В результате проверки этой гипотезы было описано прямое взаимодействие между CDPK2/20 и SLAN3, в результате которого канал открывался (Gutermuth

et al. 2013). Позже выяснилось, что в активации канала SLAH3 также принимает участие другая кальций-зависимая киназа CDPK6 (Gutermuth et al. 2018). В той же работе были описаны дополнительные каналы с быстрой активацией: ALMT11, 13 и 14. Флуоресцентная микроскопия показала, что продукты этих генов локализованы в плазмалемме. Обануренные каналы также оказались вовлечены в регуляцию анионных токов  $\text{Ca}^{2+}$ : CDPK2/20/6 контролируют работу не только медленных, но и быстрых анионных токов (Gutermuth et al. 2018).

Предположив, что связь между транспортом кальция и анионов может функционировать не только на посттрансляционном уровне, так и на уровне экспрессии генов, Хербелл с соавторами выявили корреляцию между экспрессией кальций-зависимых киназ CPK2 и CPK6, которые, как ранее было показано, являются активаторами SLAH3, и анионными каналами S-типа при изменении состава анионов в среде прорастания (Herbell et al. 2018).

В более позднем исследовании удалось охарактеризовать системы не только выхода, но и входа анионов, которые долгое время оставались загадкой для учёных, и выделить мутантов по некоторым из них. Оказалось, что катион-хлоридный котранспортер *AtCCC* (cation-chloride cotransporter) расположен в стержневой части трубки, а *AtSLAH3* локализован с ним, но имеется также и в кончике трубки (Domingos et al. 2019). Измерение анионных токов у мутантов *slah3<sup>-/-</sup>* и *ccc<sup>-/-</sup>* показали, что они незначительны и гораздо слабее, чем в контроле, у мутантов по генам других каналов *almt12<sup>-/-</sup>* и *tmem16<sup>-/-</sup>* ослабления токов практически не наблюдалось. Из этих измерений авторы заключили, что первые два транспортера отвечают за большую часть анионных токов при нормальных физиологических условиях. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что катионно-хлоридный котранспортер *AtCCC* активно экспрессируется в пыльце а растения *ccc<sup>-/-</sup>* имеют сниженную фертильность (Colmenero-Flores et al. 2007).

Методом пэтч-кламп был охарактеризована чувствительность транспортеров к рН и  $\gamma$ -аминомасляной кислоте (ГАМК), а также подтверждена регуляторная роль  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в контроле анионного транспорта. Высокая чувствительность анионных токов к рН наблюдалась у дикого типа, но её не было у *tmem16<sup>-/-</sup>*. Авторы предположили, что *AtTMEM16* работает как анион/ $\text{H}^+$  котранспортер и, соответственно, является рН сенсором. Основываясь на параметрах тока при различных  $\text{pH}_{\text{out}}$ , они рассчитали стехиометрию, свойственную данному переносчику:  $2\text{H}^+:1\text{A}^-$ . Основываясь на полученных результатах, авторы сформулировали рабочую гипотезу, согласно которой в интактных трубках  $\text{H}^+$  транспортируется по электрохимическому градиенту (созданному за счет активности  $\text{H}^+$ -АТФазы), который дает энергию котранспортеру, позволяя ему переносить анионы против градиента (Domingos et al. 2019).

При повышении концентрации кальция у дикого типа каналы открывались, а в присутствии ГАМК происходило ингибирование тока. При этом у *almt12<sup>-/-</sup>* эффекта ГАМК не

наблюдалось; аналогичным образом ГАМК действовала на анионный ток в фибробластоподобных клетках линии COS-7, трансформированных *AtALMT12*, что доказывает, что этот канал является ГАМК-рецептором (Domingos et al. 2019). Это согласовывалось с результатами комплексного исследования, в ходе которого были выявлены многочисленные физиологические процессы, в которых участвуют ГАМК-рецепторы, включая рост пыльцевой трубки (Ramesh et al. 2015). Тогда было показано, что антагонист ГАМК рецепторов мусцимол подавляет рост пыльцевых трубок *Arabidopsis thaliana* и *Vitis vinifera in vitro*. Кроме того, градиент ГАМК необходим в женских репродуктивных тканях для направления пыльцевых трубок к женскому гаметофиту и успешного оплодотворения (Palanivelu et al. 2003).

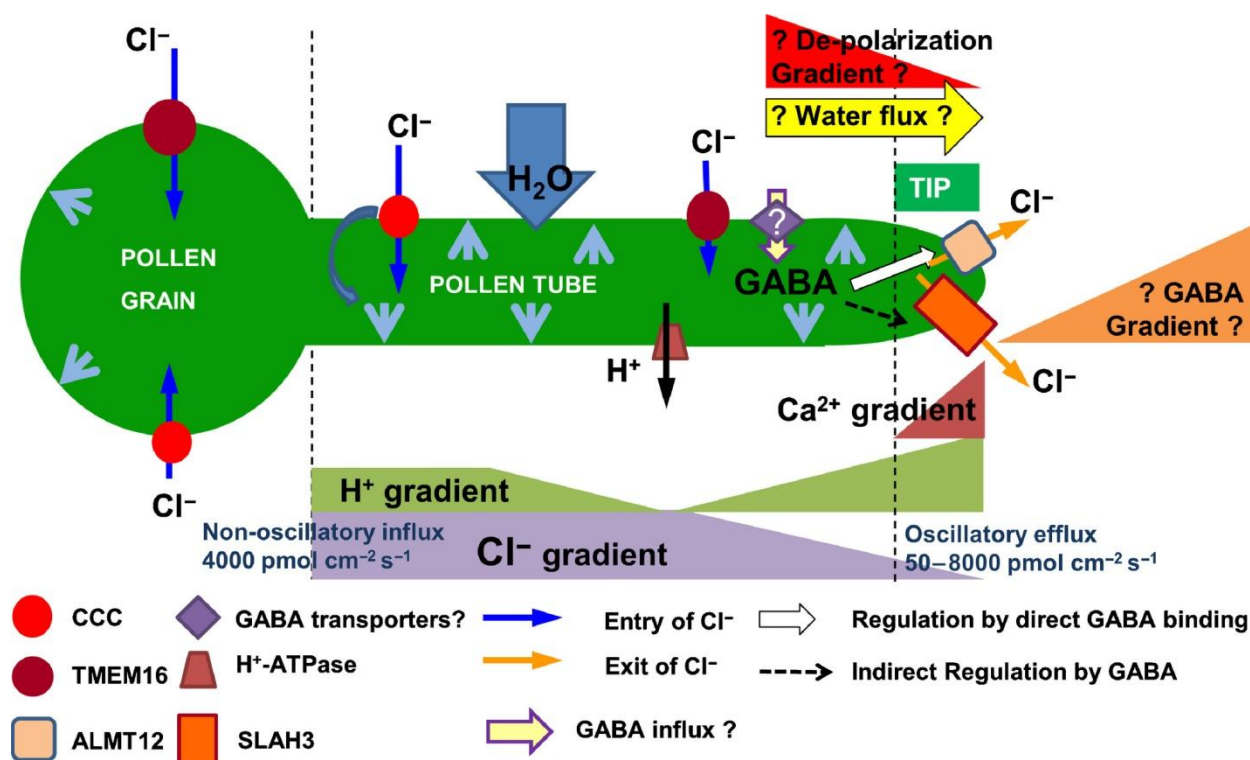


Схема 5. Модель, изображающая предполагаемую регуляцию роста пыльцевых трубок (ПТ) с помощью  $\gamma$ -аминоасляной кислоты (ГАМК), pH и  $\text{Ca}^{2+}$  через анионные переносчики. Синие и оранжевые стрелки указывают на вход анионов в области зерна и стержневой части трубки и выход в кончике; Показаны градиенты  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ . После прорастания пыльцевые трубки подвергаются воздействию возрастающих концентраций ГАМК вдоль пестика; ГАМК входит в трубку через транспортеры и напрямую связывается с ALMT12. Регуляторный эффект вызывает ионный дисбаланс, за которым следует пассивный ток воды в соответствии с осмотическим градиентом, который, в свою очередь, поддерживает рост. pH и  $\text{Ca}^{2+}$  дополнительно регулируют другие анионные каналы, такие как AtTMEM16 и AtSLAH3 (Domingos et al. 2019).

Описанный в 2015 году механочувствительный канал MSL8, который также может быть отнесен к анионным, хотя и не обладает большой специфичностью, мы рассматривали в разделе 1.4 Изменение ионного статуса пыльцевого зерна. Помимо важной роли в гидратации пыльцы,

MSL8 также играет роль в поддержании осмотического давления в процессе роста трубки *in vitro* (Hamilton et al. 2015).

Связь между анионными токами и работой  $H^+$ -АТФазы была установлена на двойных и тройных мутантах по генам протонной помпы (Hoffmann et al. 2020). Оказалось, что у мутантов с дефицитом изоформы  $H^+$ -АТФазы АНА6 анионные токи заметно уменьшены, хотя мутанты *aha8/9* по этому параметру не отличаются от дикого типа, что коррелировало с ростовым фенотипом (у *aha8/9* полярный рост не нарушен, тогда как другие мутанты имеют либо более медленный, либо преждевременно прекращающийся рост). По версии авторов, выходящий ток анионов в кончике напрямую зависит от электрохимического градиента, который генерирует протонная помпа в субапикальной зоне растущей трубки. Это подтверждается тем фактом, что у мутантов, о которых идёт речь, мембрана действительно деполаризована относительно дикого типа (Hoffmann et al. 2020).

### 2.2.2 АФК и NO в пыльцевой трубке

Многочисленные исследования указывают на роль в репродуктивном успехе хемотропных сигналов дальнего и ближнего действия, которые обеспечивают коммуникацию пыльцевой трубки с пестиком (Shah et al. 2019). К сигналам, которые определяют направления роста пыльцевой трубки *in vivo*, относятся продуцируемые женскими тканями спорофита АФК, NO, поламины и пептиды (Lopes et al. 2019; Scholz et al. 2020); во многих случаях АФК также участвуют в восприятии сигналов в качестве посредников (Sankaranarayanan et al. 2020).

Оксид азота - потенциальный низкомолекулярный сигнал, оказывающий противоположное действие на полярный рост у разных растений. Пыльцевые трубки покрытосеменных растений реагируют на NO замедлением и изменением направления роста, демонстрируя реакцию избегания (Prado et al. 2004; Domingos et al. 2015). С другой стороны, трубки сосны Бунге, напротив, ускорили свой рост (Wang et al. 2009).

В ставшем классическим исследовании Prado с соавторами выявили роль NO в регуляции роста пыльцевых трубок. Они предположили, что NO может играть роль в ориентировании трубки в тканях пестика, и проверили эту гипотезу, воздействуя на рост пыльцевых трубок с помощью точечного источника экзогенного NO. При достижении критической концентрации скорость роста снижалась, и направление роста резко менялось, после чего скорость восстанавливалась. Такой ответ не наблюдался в присутствии тушителя NO СРТЮ и снижался в присутствии реагентов, блокирующих компоненты цГМФ-опосредованного сигнального пути. Порог чувствительности ответа был значительно увеличен при воздействии на трубки цитратом силденафила (SC), ингибитором цГМФ-специфических фосфодиэстераз у животных. В пыльцевых трубках также было показано накопление

эндогенного NO, которое происходит в основном в пероксисомах. Пероксисомы обычно не заходят в кончик пыльцевых трубок, и в апикальной области NO если и присутствует, то в малых количествах (Prado et al. 2004; Domingos et al. 2015). Позже в той же группе была сделана другая работа, в которой они сосредоточились на роли NO в процессе коммуникации пыльца-пестик. Окрашивание фертильных цветков DAF-2DA показало присутствие NO в асимметричной ограниченной области вокруг микропиле. Таким образом, предполагается, что NO может напрямую обеспечивать нацеливание пыльцевых трубок на микропиле семязачки (Prado et al. 2008).

Транскриптомное исследование взаимодействия между пыльцой и пестиком выявили динамическую модуляцию уровня транскриптов AtNOS1 (nitric oxide synthase) и двух нитратредуктаз (nr1 и nr2), которые вместе, как полагают, запускают предполагаемый путь передачи сигнала от NO. Анализ взаимодействия между изолированными семязачками и пыльцой лилии *semi-in-vivo* показал, что NO необходим для нацеливания на микропиле. Кроме того, обработка СРТЮ приводила к образованию шаровидных кончиков в пыльцевых трубках, обращенных к семязачкам. Активация притока кальция в пыльцевые трубки частично восстанавливала их нормальную морфологию, указывая на то, что этот путь передачи сигнала включает  $Ca^{2+}$ . Роль NO в модуляции кальциевого гомеостаза была дополнительно подтверждена в наблюдениях за концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитозоле во время NO-индуцированной переориентации. Оказалось, что при этом возникают два пика  $Ca^{2+}$ : один - во время реакции замедления / остановки, второй - во время переориентации и возобновления роста (Prado et al. 2008; Domingos et al. 2015). Позднее сообщения о дозозависимом ингибировании прорастания пыльцевых зёрен и роста пыльцевых трубок покрытосеменных NO стали появляться в разных работах (Šírová et al. 2011; Wang et al. 2012; Shah et al. 2019).

Тот факт, что пыльца сама по себе продуцирует NO (Bright et al. 2009; Fancy et al. 2017), позволило предположить, что этот газ мог изначально эволюционировать как сигнал для осуществления межклеточной коммуникации на этапе прорастания множественных пыльцевых зёрен на рыльце. Изучая продукцию оксида азота в прорастающей пыльце оливы, Jimenez-Quesada с соавторами с помощью флуоресцентной микроскопии с соответствующим окрашиванием показали, что растущие пыльцевые трубки выделяют NO (Jimenez-Quesada et al. 2017), причем количество NO увеличивается по ходу инкубации, а в случае пыльцевых зёрен коррелирует с жизнеспособностью. Пыльцевые трубки, обработанные донорами NO, были не только короче, но и имели измененную морфологию, например шаровидные кончики, изодиаметрические расширения или демонстрировали биполярное прорастание; эти эффекты частично нейтрализовались тушителем NO с-РТЮ.

Положительное влияние оксида азота на скорость роста трубок хвойных было изучено на нескольких объектах. Так, донор NO стимулировал вход  $\text{Ca}^{2+}$  в пыльцевую трубку сосны и увеличивал крутизну апикального кальциевого градиента, он влиял также на организацию актина и везикулярный транспорт (Wang et al. 2009). Ингибирование NO-синтазы или инактивация NO оказывало противоположное действие: снижение уровня внутриклеточного NO в эксперименте приводило к нарушению структуры и состава клеточной стенки, при этом рост трубки прекращался. Таким образом, у сосны NO контролирует конфигурацию и распределение компонентов в стенке трубки, влияя на трансмембранные потоки кальция и организацию F-актина (Wang et al. 2009). Аналогичные данные были получены и для кипариса: ингибитор синтеза NO и его тушитель также подавляли рост трубок, вызывая морфологические нарушения и разрушая цитоскелет (Pasqualini et al. 2015). Что касается распределения NO, то оно также отличалось в пыльцевых трубках хвойных и цветковых растений. Так, у кипариса скопление NO наблюдалось в ядре и в апикальной части, там же, где и АФК (Pasqualini et al. 2015), а у *Lilium longiflorum* такое скопление отсутствовало, весь NO был локализован в пероксисомах (Prado et al. 2004).

В целой серии работ китайские ученые пытались связать низкотемпературное ингибирование роста пыльцевых трубок чай с NO-сигналингом. Исходя из предположения, что NO защищает растения от повреждения при низких температурах, увеличивая антиоксидантную защиту и снижая возможные последствия окислительного стресса, они решили изучить механизм участия NO в качестве сигнала в ответе пыльцевых трубок на холодовой стресс. При этом для всех работ был выбран практически значимый объект - чай (*Camellia sinensis*). В ходе исследований они обнаружили, что NO может положительно регулировать продукцию АФК и синтез пролина, вызывать закисление цитоплазмы и разрушать градиент концентрации ионов кальция в пыльцевой трубке (Wang et al. 2012, 2016b; Pan et al. 2016). В последней работе они составили список микроРНК, задействованных в ответе на NO. В общей сложности 115 мишеней были аннотированы. Они показали, что NO регулирует активацию большего количества генов и различных биологических процессов и заставляет большее количество клеточных компонентов участвовать в росте пыльцевых трубок *C. sinensis*, по сравнению с воздействием низких температур. Согласно аннотации базы данных, NO регулирует связывание катионов и окислительно-восстановительный процесс, в частности, который включает активность калиевых каналов, связывание кальмодулина, связывание ионов меди, связывание ионов магния, пероксидазную активность, антиоксидантную активность, детоксикацию клеточного окислителя, окислительно-восстановительные процессы и ответ на окислительный стресс. В частности, ген-мишень *new\_mir\_37* обладает мощными окислительно-восстановительными возможностями (Xu et al. 2021).



Кроме холодного стресса, оксид азота принимает участие в реакции самонесовместимости. Так, быстрый и кратковременный подъем уровня АФК и NO, каждый из которых формирует уникальную «сигнатуру», был недавно обнаружен во время самонесовместимого (SI) оплодотворения у *Papaver rhoeas* (Wilkins et al. 2011). Кроме того, эти авторы показали, что АФК и NO запускают принципиально важные процессы, предшествующие гибели трубки при самонесовместимости, а именно, формирование СН-индуцированных актиновых точечных очагов и запуск каспазоподобной активности.

Оксид азота также опосредует негативное влияние аАТФ на пыльцевые трубки (Reichler et al. 2009). Авторы убедительно показали, что (1) увеличение внеклеточного АТФγS вызывало повышение уровня внутриклеточного оксида азота, (2) химические агонисты сигнального пути оксида азота снижали уровень внеклеточного АТФγS, который ингибирует прорастание пыльцы, (3) антагонист гуанилатциклазы, который может ингибировать некоторые сигнальные пути оксида азота, блокировал вызванное АТФγS подавление прорастания пыльцы и удлинения пыльцевой трубки, и (4) эффекты АТФγS не развивались у мутантов *nia1nia2*, которые имеют сниженную продукцию NO. Таким образом, подавление прорастания пыльцы и удлинения пыльцевой трубки внеклеточными нуклеотидами частично опосредуется NO (Reichler et al. 2009). Однако какую роль играет этот сигналинг в жизни пыльцевой трубки? В 2003 году было обнаружено, что добавление АТФ, но не АДФ, в среду прорастания подавляло как прорастание пыльцы, так и рост трубок у *Arabidopsis*, такой же фенотип наблюдался у мутантов *apy1-1/apy2-1* по генам апираз, APY1 и APY2 (Steinebrunner et al. 2003). В другой работе было показано, что пыльцевые трубки и этиолированные гипокотили, оверэкспрессирующие апиразу, имели более высокие скорости роста, чем у растений дикого типа. В процессе роста пыльцевые трубки выделяли АТФ в питательную среду, а подавление активности апиразы антителами или ингибиторами одновременно увеличивало средние уровни АТФ и подавляло рост пыльцевых трубок. Эти результаты показали, что внеклеточные нуклеотиды являются негативными регуляторами роста у растений (Wu et al. 2007). Позже закономерность была обнаружена и у голосеменных растений. С использованием билюминесцентного анализа, Жоу с соавторами обнаружили, что пыльцевые зерна *Picea meyeri* выделяют апопластный АТФ (аАТФ) во внеклеточный матрикс до прорастания и в процессе удлинения трубки. Добавление экзогенного АТФ или ингибитора апиразы (фермента, гидролизующего аАТФ) к суспензии пыльцы ингибировало прорастание и удлинение пыльцевых трубок, дезорганизуя структуру микрофиламентов в них (Zhou et al. 2015). С другой стороны, экзогенная апираза тоже оказывала ингибирующее действие, как и ингибиторы пуриноцепторов. АТФ усиливал приток  $Ca^{2+}$  после прорастания, который подавлялся ингибиторами пуриноцепторов. Таким образом, авторы выдвинули концепцию оптимальной концентрации аАТФ, имеющей ключевое значение

для инициации прорастания пыльцы, а также для входящего тока  $\text{Ca}^{2+}$  в растущих пыльцевых трубках ели (Zhou et al. 2015).

В пыльцевых трубках табака экзогенные полиамины в низких концентрациях (10 мкМ) по-разному влияли на рост (Benkő et al. 2020): путресцин снижал скорость роста, спермидин повышал, а спермин не оказывал влияния. Интересно, что эти влияния коррелировали с эффектом на уровни АФК и/или NO в кончике трубки: высокий уровень NO и низкое содержание АФК интенсифицировали рост, противоположная комбинация ингибировала его (Benkő et al. 2020). Полиамины могут влиять на ионный гомеостаз в растительных клетках, во многих случаях, опосредованно, через модуляцию уровня АФК (Pottosin and Shabala 2014; Aloisi et al. 2016; Benkő et al. 2020). Например, при обработке спермидином в концентрации 100 мкМ, пыльцевые трубки груши отвечали резким повышением  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , изменение градиента pH и сменой паттерна роста (Aloisi et al. 2017). Аналогичных данных, полученных на клетках корней, значительно больше: активность H<sup>+</sup>-АТФазы изменялась у нескольких видов растений, включая как активацию (рис, пшеница), так и ингибирование (кукуруза) (Pottosin and Shabala 2014). В некоторых случаях, полиамины повреждают пыльцу за счет избыточного образования АФК, за которым следует активация антиоксидантной защиты, деградация ДНК и клеточная гибель (Aloisi et al. 2015).

Один из важнейших механизмов регуляции роста пыльцевых трубок *in vivo* - пептидный сигналинг. Недавно было обнаружено, что АФК участвуют в сигнальном каскаде, запускающем ответ на пептидный сигнал (RALF4—RAPID ALKALINIZATION FACTOR 4), который представляет собой контроль роста пыльцевой трубки со стороны пестика. Воздействие на трубки, растущие *in vitro*, этим пептидом вызывало резкое повышение уровня АФК, стимуляцию роста и предотвращало разрыв трубки (Feng et al. 2019). С другой стороны, тушители пероксида водорода иодид калия и пируват натрия ингибировали рост трубки и вызывали её разрыв. В тех линиях арабидопсис *llg2,3*, которые не способны продуцировать LORELEI-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINS 2/3, вовлеченные в восприятие пептидного сигнала RALF, уровень АФК был существенно ниже, а рост был нарушен. Добавление экзогенного пероксида водорода частично восстанавливало эти нарушения (Feng et al. 2019). Один из предложенных механизмов - регуляция механических свойств клеточной стенки (Zhang et al. 2020), поскольку у мутанта *llg2,3* было также нарушено отложение каллозы и пектинов (Feng et al. 2019).

Разрыв пыльцевой трубки - нежелательное явление на ранних этапах роста, но необходимое - на конечном этапе, поскольку служит для попадания спермиев к женским гаметам. Этот процесс чётко контролируется: необходимо узнавание пыльцевой трубки синергидами и последующее получение в ответ разрешающего сигнала (Li and Yang 2018; Ge et

al. 2019; Vogler et al. 2019). Сигнальные пептиды (например, цистеин-обогащенные пептиды) и малые молекулы (например, АФК), которые позволяют синергиде узнать пыльцевую трубку, накапливаются в области нитчатого аппарата. Он представляет собой сильно утолщенную часть клеточной стенки синергиды на микропилярном конце (Ермаков et al. 2016; Lopes et al. 2019). Узнавание пыльцевой трубки на этом этапе является важным барьером для межвидовых скрещиваний, поскольку неузнанная пыльцевая трубка не прекращает свой рост и не высвобождает спермии (Johnson et al. 2019). В узнавании участвуют рецепторная киназа FERONIA (FER), белок из подсемейства CrRLK1L (*Catharanthus roseus* receptor-like kinase 1-like). Он регулирует заякоривание в мембране NORTIA (NTA) и взаимодействует с GPI-anchored белком LORELEI (LRI) на поверхности синергиды (Zhang et al. 2020). Отсутствие узнавания и последующего разрыва («переросший фенотип») обнаружен в пестиках *Arabidopsis pistils* со сниженным уровнем АФК. В области нитчатого аппарата синергиды у растений дикого типа наблюдается пик продукции АФК, а у мутантов *fer* и *lre*, а также в пестиках, обработанных ДФИ, он отсутствует. Во всех перечисленных случаях трубки формируют «переросший фенотип» и не принимают участие в оплодотворении (Duan et al. 2014). Таким образом, рецепторная киназа FER, как и другой белок, LRI, который с ней взаимодействует, отвечают за локальную продукцию АФК, которая вызывает разрыв трубок и высвобождение спермиев. Фенотип ещё одного мутанта, *amc* (abstinence by mutual consent), также сходен с таковым у *fer*, но он является стерильным при самоопылении, то есть, ущербный фенотип наблюдается только в том случае, когда мутантный аллель несут как мужской, так и женский гаметофиты. АМС кодирует пероксин, который участвует в импорте белка в пероксисомы и за счет этого может также быть нужен для продукции АФК в процессе узнавания между пыльцевыми трубками и синергидами (Boisson-Dernier et al. 2008).

В пыльцевой трубке продуцируются эндогенные АФК, главным образом, с участием НАДФН-оксидаз (у Арабидопсис *RbohH* и *RbohJ*). Обе изоформа фермента локализованы в плазматической мембране, имеют в своей структуре EF-руки и при связывании с ионом кальция переходят в активированное состояние (Kaya et al. 2014). У табака, трансфекция пыльцы антисенс олигонуклеотидами (ODNs) против данного фермента приводило к ингибированию роста пыльцевых трубок, который мог быть восстановлен в результате добавления экзогенного  $H_2O_2$  (Potocký et al. 2007). У арабидопси также были описаны мутанты *rbohH,J* с серьезными нарушениями репродуктивной сферы. Пыльца этих растений демонстрировала нарушения полярного роста и кальциевого гомеостаза (Kaya et al. 2014; Lassig et al. 2014). Интересно, что пыльцевой фенотип этих мутантов был практически идентичен таковому мутантов по генам кальциевых каналов *cngc7,8* (cyclic nucleotide gated, non-selective,  $Ca^{2+}$ -permeable ion channels), что указывает на функциональную связь между этими регуляторными элементами (Zhang et al.

2020). Свойства этих мутантов изучали и *in vivo*: у растения *Arabidopsis* дикого типа продукция АФК в апопласте в зоне между поверхностью пыльцевой трубки и папиллами рыльца была показана с помощью гистохимического окрашивания; у мутантов АФК не накапливались, а рост трубки был нарушен (Кауа et al. 2015). Таким образом, эндогенные АФК, продуцируемые с участием НАДФН-оксидазы, необходимы для роста пыльцевой трубки как *in vitro*, так и *in vivo*.

Однако, этот фермент - не единственный источник АФК в мужском гаметофите: полиаминоксидаза (ПАО) в пыльце может синтезировать  $H_2O_2$  из полиаминов (Aloisi et al. 2016). У риса было идентифицировано семь изоформ ПАО, и одна из них, OsPAO7, специфически экспрессируется в пыльниках; OsPAO7 синтезирует  $H_2O_2$  примерно в 100 раз эффективнее, чем другие изоформы (Liu et al. 2014). В недавнем исследовании была обнаружена связь между полиаминами и пероксидом водорода в пыльцевых трубках *Arabidopsis* (Do et al. 2019). Раньше такая связь была выявлена для груши: градиенты суммарных АФК и спермидина в пыльцевой трубке совпадали, а в трубках, обработанных экзогенным спермидином, уровень этих веществ в цитоплазме изменялся сходным образом (Aloisi et al. 2015). При этом эффекты тех же самых полиаминов на уровни NO/ROS в пыльцевых зёрнах и трубках различались. Более того, недавние исследования показали, что полиамитны регулируют прорастание пыльцы главным образом через модуляцию уровня АФК, в то время как удлинение трубки - через уровень оксида азота (Benkő et al. 2020).

## Глава II. Объекты и методы исследования

### 1. Объекты исследования

В работе использовали цветки срезанных растений лилии (*Lilium longiflorum* Thunb.), некоторые опыты ЭПР проводили на живых растениях лилии в ГБС РАН. Растения табака (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Petit Havana SR1') выращивали из семян в климатической камере при 25 °С, фотопериоде 16/8 ч на смеси вермикулита вспученного (С-верад «Агро») с почвой в соотношении 4:1, поливая раствором минеральных солей (Nitsch 1965). Для исследования экссудата и окрашивания рылец использовали растения, цветущие в Москве в открытом грунте: барбарис *Berberis vulgaris* L. (на территории МГУ), древовидный пион *Paeonia × suffruticosa* (Ботанический сад МГУ на Воробьевых горах), кирказон *Aristolochia manshuriensis* Kom. (Ботанический сад МГУ «Аптекарский огород»).

Зрелость рыльца оценивали по внешнему виду цветка и делили на 3 стадии. Закрытые цветки, достигшие окончательного размера или не менее 4/5 от него, классифицировали как ювенильные. Цветки, которые раскрылись, но имели незрелые пыльники, классифицировались как пред-зрелые. Цветки с полностью открытым околоцветником и открытыми пыльниками считались зрелыми. Опыленные вручную на 3й стадии цветки на следующий день считались 4й стадией.

Рыльцевый экссудат собирали с цветков одной стадии в наконечники от микропипеток в каплю дистиллированной воды и/или раствора спиновой ловушки. Цветки 2 и 3 стадии кастрировали, чтобы избежать попадания пыльцы на рыльце. Время инкубации зависело от опыта и составляло 30 или 60 мин.

Для сбора опылительных капель использовались растения туи (*Thuja occidentalis* L.), тиса (*Taxus baccata* L.), сосны (*Pinus sylvestris* L.) и ели (*Picea pungens* Engelm.). Туя, сосна и тис произрастают около Корпуса электронной микроскопии МГУ, ели – в разных местах на территории МГУ. Ветви со зрелыми женскими шишками были срезаны с растений, произраставших на территории и в Ботаническом саду МГУ. Для сбора ОК 10 семенных шишек (СШ) тиса, 2 СШ сосны или 10 СШ туи погружали в 300 мл дистиллированной воды и/или раствора спинового зонда и инкубировали 30-60 мин. Шишки не срезали со стеблей, чтобы не провоцировать дополнительную генерацию АФК. С еловой шишки капли переносили пипеткой или иголкой в такой же объем воды.

Для получения пыльцы бутоны собирали накануне раскрытия и извлекали из них пыльники, которые затем помещали в термостат (25°C) не менее чем на двое суток для созревания и высыхания. Сухую пыльцу собирали с помощью специально оборудованного настольного пылесоса (Princessa, КНР) в пробирки и хранили при -20°C. Во всех опытах использовали пыльцу, предварительно увлажненную 2 ч при 25°C.

Стандартная среда для инкубации пыльцы цветковых растений *in vitro* включала 0,3 М сахарозу, 1,6 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 3 мМ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,8 мМ  $\text{MgSO}_4$  и 1 мМ  $\text{KNO}_3$  в 50 мМ MES-Tris - буфере, pH 5,9 (табак) или 5,8 (лилия) (Tushabe and Rosbakh 2021).

Для получения препаратов растущих в плоскости пыльцевых трубок увлажненные пыльцевые зерна покрывали 1,5% легкоплавкой агарозой. Для этого пыльцу наносили на покровное стекло, сверху по каплям добавляли 90 мкл расплавленной агарозы (температура геля не превышала 35°C) и накрывали другим покровным стеклом для образования тонкого слоя. После застывания агарозы верхнее стекло аккуратно снимали, а нижнее стекло с пыльцой и агарозой помещали в пластиковые чашки Петри (d = 40 мм) со средой прорастания на небольшую подложку (Podolyan et al. 2019). Для количественной широкополосной микроскопии чашки инкубировали при 29°C в течение 1,5-3 ч, для конфокальной микроскопии при 25°C в течение 2 часов.

При необходимости флуоресцентного окрашивания растущих пыльцевых трубок табака и лилии и других экспериментов, где липиды могут помешать, пыльцу перед увлажнением отмывали от поверхностных липидов гексаном или диэтиловым эфиром и высушивали на воздухе. Отмытую пыльцу не хранили более 12 часов, так как в процессе длительного хранения она теряет способность к прорастанию.

Также в работе использовали пыльцу ели (*Picea pungens* Engelm.), которую собирали с деревьев, растущих в ботаническом саду биологического факультета МГУ на Ленинских Горах. Микростробилы ели собирали в мае – июне (в зависимости от погодных условий) в период активного пыления и выдерживали в термостате при температуре 25°C в течение 3 дней, после чего сухую пыльцу собирали настольным пылесосом и хранили при -20 °C.

Пыльцу ели проращивали при 25°C в чашках Петри, пробирках или плашке на качалке на самой низкой скорости в питательной среде следующего состава: 0,3 М сахароза, 1 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  в 50 мМ MES-Tris буфере, pH 5,5 (Maksimov et al. 2018). Важным условием прорастания было наличие в пробирке достаточного слоя воздуха для длительной инкубации. Массового поражения суспензии грибной и бактериальной флорой не наблюдалось в течение первых суток инкубации.

Для выделения протопластов из пыльцевых зёрен лилии предварительно проводили полную регидратацию пыльцевых зёрен, инкубируя их в стандартной среде прорастания, следующего состава (далее SM): 1,6 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 3 мМ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,8 мМ  $\text{MgSO}_4$  и 1 мМ  $\text{KNO}_3$  в 25 мМ MES-Tris буфере, pH 5,8. Дополнительно среда содержала 0.3 М сахарозы. При регидратации концентрация пыльцевых зёрен составляла 2 мг/мл. Затем пыльцевые зёрна осаждали путем центрифугирования (600×g, 1 мин) и переносили в гипертоническую среду SM с ферментами, обеспечивающими гидролиз полисахаридов клеточной оболочки (0.175 М

сахарозы, 0.175 М D-маннитола, 1% (w/v) целлюлаза (MP Biomedicals, США), 1% (w/v) Macerzyme (MP Biomedicals) и 2 мг мл<sup>-1</sup> бычьего сывороточного альбумина (MP Biomedicals)) (Tanaka et al. 1987). Инкубирование проводили в течение часа при 29 °С. Затем протопласты дважды отмывали от ферментов путем центрифугирования (600×g, 1 мин) и ресуспендирования в гипертонической среде SM без ферментов. Суспензию протопластов использовали для флуоресцентной микроскопии и пэтч-кламп исследования в течение 2 часов с момента выделения (Breugina et al. 2016, 2017).

Для выделения субпротопластов из пыльцевых трубок табака сначала проводили проращивание пыльцевых зерен. Для этого пыльцу инкубировали 1 ч при 25 °С в среде SM с 0,3 М сахарозы. Концентрация пыльцы при проращивании составляла 2 мг/мл. Пыльцевые трубки осаждали однократным центрифугированием в течение 1 мин при 3300×g, затем переносили в гипертоническую среду SM с ферментами (0,7 М сахароза, 0,7 М D-маннитол, 2% (w/v) целлюлаза (Cellulase from *Trichoderma viride*, MP Biomedicals, Франция), 1% (w/v) пектиназа (Pectinase from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich, США)) и инкубировали на качалке 1 час при 29 °С. Суспензию субпротопластов отмывали от ферментов и фрагментов клеточной стенки (два цикла центрифугирования (30 с, 600×g) / ресуспендирование в гипертонической среде SM без ферментов). Полученную суспензию субпротопластов использовали для окрашивания и флуоресцентного микроскопического исследования (Максимов et al. 2015).

Для получения фиксированных субпротопластов суспензию осаждали в течение 30 с при 600×g и заменяли гипертоническую среду на фиксатор следующего состава: 1% формальдегид, 0,6 М D-маннитол в 100 мМ Na-P буфере pH 7.4. Перед окрашиванием фиксированные клетки отмывали от фиксатора однократным центрифугированием (30 с при 600×g) и заменой среды на гипертоническую среду без ферментов.

## **2. Окрашивание рылец**

### Окрашивание бензидином

В цветной реакции участвуют бензидин, ферменты с пероксидазной активностью и пероксид водорода. Для определения общей окислительной способности (включая как продукцию пероксида водорода, так и активность пероксидаз) (Josephy 1985) на рыльца наносили 1% раствор бензидина в 50 мМ трис-ацетатном буфере (pH 5,0) и оставляли на 30 мин. Чтобы гарантировать, что собственные пигменты не вносят вклад в наблюдаемую окраску, все пестики фотографировали до и после окрашивания. Все, кроме опыленных пестиков кирказона, к началу инкубации были практически неокрашенными. Поскольку травмирование пестика кончиком пипетки приводило к резкому увеличению продукции АФК и, соответственно, к локальному интенсивному окрашиванию, рыльца при нанесении раствора не трогали. Окрашенные пестики фотографировали в бинокляр (для мелких пестиков) и/или с

помощью фотоаппарата (для крупных). В первом случае из цветков вырезали пестики и помещали во влажный песок; в противном случае рыльце не попадало в фокус. Это вмешательство не приводило к гиперпродукции АФК на рыльце.

### Окрашивание NBT

Для специфичной оценки продукции супероксид радикала на рыльцах лилии их инкубировали в растворе NBT (10  $\mu\text{M}$ , 10 мин) в 50 мМ натрий цитратном буфере с рН 6.0, после чего кипятили в течение 15 мин (Cui et al. 2022). Для табака, который окрашивался очень сильно, длительность кипячения была сокращена до 5 минут, а концентрация красителя снижена в два раза.

### Окрашивание DCFH

Для оценки уровня внеклеточных АФК использовали окрашивание 25  $\mu\text{M}$  DCFH-DA. Объекты окрашивали при 25 °С предварительно дезацетицированным красителем (10 мМ NaOH, 60 мин) в течение 30 мин и фотографировали с помощью микроскопа AxioPlan.

## **3. Определение скорости прорастания пыльцы *in vivo* и эффективность оплодотворения**

Для оценки скорости прорастания на рыльца зрелых цветков табака (предварительно кастрированных), на которых уже выделился рыльцевый экссудат, наносили по 1.5 мг пыльцы табака, хранившейся при температуре -20°C от 3 до 6 месяцев (далее – *контролируемое опыление*).

При изучении влияния ингибиторов на скорость прорастания на рыльце пестика наносили ДФИ (дифенилениодония хлорид) и ацетованиллон (ингибиторы НАДФН-оксидазы) или LCS1 (ингибитор Cu/Zn-супероксиддисмутазы) в капле дистиллированной воды объемом 2 мкл на 10 минут, затем проводили стандартное опыление.

Через 30 минут после опыления пестики срезали и фиксировали в 70%-ом водном растворе этилового спирта. Спустя 10 минут при помощи лезвия делали продольные срезы фиксированного материала. На них наносили краситель анилиновый синий (раствор 0.1% анилинового синего в 108 мМ  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), который специфично связывается и окрашивает каллозу, визуализируя пыльцевые трубки.

Срезы инкубировали с красителем в течение 30 минут, после чего наблюдали окрашивание при помощи флуоресцентного микроскопа. В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imagingMOT (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.5 (Zeiss), оснащенный цифровой камерой AxioCamHRc (Zeiss).



Скорости прорастания оценивались по количеству пыльцевых трубок, проросших через ткани пестика за 30 минут. Каждый вариант опыта (контрольные растения и 3 ингибитора) проводился по 10 раз.

Для оценки эффективности оплодотворения использовался метод взвешивания семян. Калибровка, отражающая линейную зависимость веса группы семян от их количества, позволила заменить трудоемкий подсчет семян на их относительно несложное взвешивание. После контролируемого опыления контрольных цветков и цветков, пестики которых были инкубированы с ингибиторами, в течение 3 недель происходило созревание коробочек. Далее, из них извлекались семена и весовым методом при помощи калибровочной прямой проводилась оценка количества семян. Вес одного семени составлял 55 мкг.

#### **4. Полярография**

Поглощение кислорода суспензией пыльцы ели измеряли с помощью полярографа с встроенным электродом Кларка (Expert 001, Россия). Для получения необходимых значений силы тока в мкА навеску пыльцы (16 мг) в инкубационной среде помещали в полярографическую ячейку. Объём ячейки – 3,2 мл.

В результате измерений для каждой временной точки (30 мин, 2, 6, 9 и 14 ч) был получен ряд значений силы тока, отражающих изменение содержания кислорода в ячейке в течение первых 12 с (в этом временном диапазоне значения фиксировали каждые 2 с). Этот временной интервал выбрали по причине последующего всплывания и неравномерного распределения зёрен в ячейке из-за воздушных мешков (после 12 с зёрна всплывали и прилипали к крышке ячейки). Путем экстраполяции рассчитывали изменение силы тока за минуту. Полученное значение переводили в убыль (поглощение) кислорода в ячейке за 1 мин в мкмоль. Поглощение кислорода для каждой временной точки измеряли, как минимум, в 4-х повторностях. Для точек 6 и 9 ч с большим разбросом значений количество повторностей увеличили до 7 (Евменьева and Брейгина 2018; Breygina et al. 2020).

#### **5. Флуоресцентная широкополосная микроскопия**

В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imagingMOT (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.5 (Zeiss), оснащенный цифровой камерой AxioCamHRc (Zeiss) и Pro-08 (ADF Optics, КНР). Флуоресценцию возбуждали светом ртутной лампы, используя стандартные блоки фильтров.

Для количественных измерений препараты фотографировали с фиксированной выдержкой, используя автоматическую заслонку, которая позволяла освещать препарат только в момент съемки. Полученные фотографии анализировали, используя пакет программ AxioVision 4.7.1 (Zeiss, Германия) или ADF Imaging (ADF Optics, КНР).

## **Количественный анализ физиологических параметров**

### Оценка суммарного уровня АФК

Для оценки уровня внутриклеточных АФК использовали общепринятый метод окрашивания 50  $\mu\text{M}$  DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate acetomethylester, Sigma). Объекты окрашивали при 25 °С в течение 5 мин и фотографировали с помощью микроскопа AxioPlan.

### Определение рН цитоплазмы

Для определения цитоплазматического рН субпротопластов и пыльцевых трубок использовали ратиометрический флуоресцентный краситель BCECF (Feijó et al., 1999). В спектре возбуждения флуоресценции BCECF есть как рН-чувствительный участок, так и изобестическая точка, т.е. длина волны, при которой интенсивность флуоресценции не зависит от значения рН. Данная особенность позволяет определять значение рН, используя отношение интенсивностей флуоресценции в рН-чувствительном ( $I_1$ ) и рН-нечувствительном канале ( $I_2$ ), а значит, избежать погрешности, связанной с варьированием концентрации красителя в протопластах.

Окрашивание субпротопластов BCECF AM (Molecular probes, Нидерланды) проводили при 29°С в течение 5 минут в гипертонической среде без ферментов (Максимов et al. 2015). Конечная концентрация красителя составляла 10  $\mu\text{M}$ . Пыльцевые трубки окрашивали 10  $\mu\text{M}$  BCECF-AM в течение 10 мин при температуре 25°С (Podolyan et al. 2019, 2021). После окрашивания субпротопласты отмывали от красителя однократным центрифугированием (30 с при 0,6×g) и заменой среды на гипертоническую среду без красителя. Агарозную пластинку с растущими в ней пыльцевыми трубками также помещали в среду без красителя.

Для определения цитоплазматического рН была построена калибровка *in vitro* (Feijó et al., 1999). Интенсивность флуоресценции BCECF измеряли в среде, имитирующей цитозоль, следующего состава: 100 мМ KCl, 30 мМ NaCl, 0,5 М маннит, 40% сахара в 25 мМ MES (рН 6,0) или 25 мМ HEPES буфере (рН 7,0 и 8,0). Калибровочные растворы окрашивали при 25°С в течение 5 минут. Для построения калибровки использовали краситель в форме кислоты – BCECF Acid (Molecular probes); конечная концентрация красителя составляла 10  $\mu\text{M}$ .

### Определение мембранного потенциала

Для определения мембранного потенциала использовали два красителя с разным принципом действия: медленный DiBAC<sub>4</sub>(3) и быстрый Di-4-ANEPPS. Первый позволял определить абсолютные значения потенциала и исследовать большие популяции протопластов, тогда как второй позволял исследовать динамику потенциала в отдельном протопласте в реальном времени, а также картировать потенциал вдоль трубки, выявляя градиент.

DiBAC<sub>4</sub>(3). Определение абсолютных значений мембранного потенциала проводили с помощью флуоресцентного красителя DiBAC<sub>4</sub>(3) (бис-(1,3-дибарбитуровой кислоты) триметин оксонол). Распределение отрицательно заряженных молекул красителя между цитоплазмой и средой описывается уравнением Нернста. В определенном диапазоне концентраций интенсивность флуоресценции линейно зависит от величины мембранного потенциала (Брейгина и др., 2009). Для определения величины мембранного потенциала проводили окрашивание живых и фиксированных (полностью деполяризованных) субпротопластов DiBAC<sub>4</sub>(3), измеряли интенсивность флуоресценции и рассчитывали значение мембранного потенциала в мВ по формуле:

$$E_m = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{I}{I_0}$$

где R – универсальная газовая постоянная, 8,31 Дж×К<sup>-1</sup>×моль<sup>-1</sup>; T – абсолютная температура, К; F – постоянная Фарадея, 96.490 Дж×мВ<sup>-1</sup>×моль<sup>-1</sup>; I, I<sub>0</sub> – интенсивность флуоресценции тестируемой клетки и средняя интенсивность фиксированных клеток, соответственно.

Окрашивание клеток (как живых, так и фиксированных) DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular probes) проводили при 25°C в течение 10 минут, одновременно с воздействием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Конечная концентрация красителя составляла 5 μМ.

Di-4-ANEPPS. Для исследования динамики мембранного потенциала и картирования использовали ратиометрический потенциал-чувствительный краситель di-4-ANEPPS (Брейгина и др., 2009). Благодаря своей липофильности молекула красителя встраивается в липидный бислой плазмалеммы. Электронная структура молекулы красителя, а, следовательно, и её спектры возбуждения и флуоресценции зависят от величины окружающего электрического поля. При использовании di-4-ANEPPS интенсивность флуоресценции измеряется в красной области при возбуждении в синей и в зеленой области спектра. Потенциал-зависимой характеристикой является отношение F<sub>b</sub>/F<sub>g</sub>, где F<sub>b</sub> – интенсивность флуоресценции при возбуждении синим светом, а F<sub>g</sub> – интенсивность флуоресценции при возбуждении зеленым светом. При гиперполяризации мембраны величина F<sub>b</sub>/F<sub>g</sub> уменьшается.

Для окрашивания протопласты суспендировали в гипертонической среде с конечной концентрацией Di-4-ANEPPS 2 μМ. К капле суспензии, содержащей окрашенные клетки, на стекле добавляли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в гипертонической среде, до конечной концентрации 10 μМ. Затем препараты микрофотографировали и проводили съемку через определенные промежутки времени (30 с) в течение 5 минут. Поскольку продолжительное нахождение препарата под покровным стеклом нежелательно, для исследования более длительной динамики стекло с препаратом необходимое время инкубировали во влажной камере, после чего начинали съемку. Пыльцевые трубки ели также окрашивали 2 μМ Di-4-ANEPPS, после чего в течение 1-5 минут микрофотографировали.

## Оценка внутриклеточного $[Ca^{2+}]$

Определение внутриклеточной концентрации катионов кальция  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-3 (Molecular probes) (Wang et al. 2004). Fluo-3 относится к группе низкомолекулярных синтетических производных кальциевых хелаторов, при связывании молекулы с  $Ca^{2+}$  происходит значительное усиление флуоресценции. Это позволяет использовать низкие концентрации красителя, что снижает цитотоксичность. Важнейшей характеристикой  $Ca^{2+}$ -зондов является константа диссоциации  $K_d$ , характеризующая сродство красителя к  $Ca^{2+}$ . Для Fluo-3 величина  $K_d$  в физиологических условиях составляет 390 нМ. Это значит, что диапазон концентраций  $Ca^{2+}$ , в пределах которого интенсивность флуоресценции линейно зависит от его концентрации, составляет от 39 нМ до 3,9  $\mu$ М. По данным литературы, концентрация  $Ca^{2+}$  в цитозоле пыльцевой трубки составляет от 300 нМ до 3  $\mu$ М (Hepler et al. 2006), что позволяет использовать Fluo-3 для измерений  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в нашем объекте.

Загрузка красителя в протопласты и пыльцевые трубки происходила при 37°C в гипертонической среде, содержащей 10  $\mu$ М Fluo-3 и 0,1% PluronicF-127, в течение 30 минут (Wang et al. 2004). После загрузки красителя объект отмывали от красителя и инкубировали в течение 30 мин при 25°C для полной деэтерификации.

В качестве ингибитора  $Ca^{2+}$ -каналов использовали нифедипин (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 100  $\mu$ М. Также для ингибирования  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов использовали хлорид лантана  $LaCl_3$  (Sigma-Aldrich).

## **Качественный анализ клеточных структур**

### Окрашивание клеточной оболочки

Для окрашивания интины пыльцевых зёрен ели использовали флуоресцентный краситель Tinopal (Calcofluor white M2R, Sigma), связывающийся, в первую очередь, с целлюлозой. Экзину окрашивали липофильным АФК-чувствительным красителем MitoSOX (ThermoFisher Scientific) в конечной концентрации 5  $\mu$ М. Ранее было показано, что этот краситель эффективно связывается со спорополленином (Смирнова et al. 2009).

### Окрашивание амилопластов

Амилопласты окрашивали крахмалспецифической реакцией с  $I_3^-$  ( $I_2 + KI + \text{этанол}$ ). Для окрашивания настойку йода разбавляли в 1000 раз средой для проращивания. Конечная концентрация была 0,005%  $I_2$ , 0,0025%  $KI$ , 0,43% этанол. Все окрашивания проводили в течение 5 мин при 25°C.

### Выявление ядер

Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI (Sigma-Aldrich). Окрашивание проводили в течение 5 минут, конечная концентрация красителя  $10^{-3}$  мг/мл. Субпротопласты

окрашивали живыми, а пыльцевые трубки предварительно фиксировали в 1% растворе этилового спирта для лучшего проникновения красителя.

### **Тест на жизнеспособность**

В работе использовали традиционный способ оценки жизнеспособности – окрашивание pH-чувствительным флуоресцентным красителем FDA (Sigma-Aldrich) (Yang 1986). Краситель в форме ацетоксиметильного эфира проникает в клетку через плазмалемму, где подвергается ферментатическому гидролизу. Образовавшийся заряженный продукт при условии целостности плазмалеммы не может покинуть клетку и при нормальной величине цитоплазматического pH (~7,0) обладает яркой зеленой флуоресценцией, что является показателем жизнеспособности клетки.

Субпротопласты окрашивали в течение 5 минут при концентрации FDA 10  $\mu\text{M}$ . Затем проводили однократную отмывку (центрифугирование 30 с, 600 $\times$ g / ресуспендирование в гипертонической среде) и микроскопировали.

## **6. Конфокальная микроскопия**

Работу проводили на конфокальном флуоресцентном микроскопе Nikon A1, установленном на БС МГУ и оборудованном 488- и 514-нм лазерами.

### Картирование внутриклеточных АФК

Для картирования внутриклеточных АФК использовали два красителя: супероксид анион радикал, локализованный в митохондриях, выявляли с помощью MitoSOX (5  $\mu\text{M}$ ). Пероксид водорода выявляли путем окрашивания PFBS (pentafluorobenzene sulfonylfluorescein, Cayman Chemical) (10  $\mu\text{M}$ ). Особенностью данного красителя, разработанного японскими учеными, является его высокая специфичность к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также неокислительный механизм перехода во флуоресцентную форму (Maeda et al. 2004). Окрашивание производили при 25 $^\circ\text{C}$  в течение 10 мин.

### Анализ расположения и движения органелл

Транспортные везикулы идентифицировали путем окрашивания пыльцевых трубок FM4-64 (дибромидом (N-(3-триэтиламмонийпропил)-4-(6-(4-(диэтиламино)фенил)гексатриенил)пиридиния; Molecular Probes) (8  $\mu\text{M}$ ). В экспериментах по проверке способности трубок к эндоцитозу FM4-64 присутствовал в инкубационной среде в течение последних 20 минут культивирования (Podolyan et al. 2021). В других опытах окрашивание трубок проводилось в течение 10 минут.

Митохондрии идентифицировали путем окрашивания пыльцевых трубок NAO (10-N-нонилакридиновый оранжевый; Molecular Probes) (5  $\mu\text{M}$ , 10 мин).

## 7. Пэтч-кламп

Пэтч-кламп представляет собой группу электрофизиологических методов, служащих для исследования биологических мембран (Penner et al. 1995; Медведев 2012). Основная сложность при проведении измерений ионных токов методом пэтч-кламп на растительных клетках состоит в наличие у них ригидной целлюлозной композитной клеточной оболочки. В связи с этим моделью для изучения токов служат протопласты, находящиеся в гипертонической среде. К сожалению, протопласты достаточно быстро начинают регенерировать клеточную оболочку, что нарушает гигаомный контакт пипетки с мембраной и затрудняет работу (Penner et al. 1995).

Метод пэтч-кламп с фиксацией потенциала предполагает контроль над значением мембранного потенциала при помощи усилителя с обратной связью (Delay et al., 2012; Медведев, 2012). При фиксации потенциала ток ( $I$ ) оказывается прямо пропорционален проводимости мембраны ( $R^{-1}$ ). Кроме того, фиксация потенциала позволяет напрямую контролировать функциональное состояние потенциал-чувствительных каналов (Delay et al., 2012).

В настоящей работе изучение трансмембранных ионных токов проводили методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» («whole cell»). В данной конфигурации содержимое пипетки диффундирует в цитоплазму, что позволяет контролировать её состав. Изолированные протопласты помещали в экспериментальную камеру (RC-24; Warner Instruments, Hamden, CT, USA; объем 80 мкл) заполненную внешним раствором. В работе использовали пипетки, изготовленные на пуллере PC-10 (Narishige, Tokyo, Japan) из стандартных стеклянных боросиликатных капилляров (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). После установления контакта с плазмалеммой протопласта в конфигурации «whole cell» включали перфузию раствора в камере ( $0.5 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ ).

Электрофизиологические эксперименты проводили в сотрудничестве с Абрамочкиным Д. В. Для записи тока использовали установку кафедры Физиологии человека и животных МГУ им. Ломоносова, включающую усилитель Axopatch 200A (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA), USB усилитель EPC-800 (HEKA Instruments, Lambrecht, Germany), персональный компьютер с программным обеспечением Strathclyde Electrophysiological Software version 4.6.9 (University Strathclyde, Glasgow, UK). При записи тока компенсировали ёмкость пипетки, протопластов и сопротивление контакта. Все записи токов нормализовали к ёмкости протопластов. Средняя ёмкость протопластов составляла  $226 \pm 32$  пФ в экспериментах по установлению регуляторной роли  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $238 \pm 32$  пФ в экспериментах с тяжелыми металлами. После установления конфигурации «whole cell» дожидались полной перфузии раствора из пипетки в протопласт в течение 30-45 минут. Записи тока выполняли при комнатной температуре ( $24 \pm 1$  °C).

Выходящий  $K^+$  ток (Breugina et al. 2016, 2017) возбуждали деполяризующими импульсами продолжительностью 3 с, с интервалом 15 с, от стационарного потенциала -58 мВ (рассчитанный  $K^+$  равновесный потенциал при нижеприведенных внешнем и внутреннем растворах) до значений: -40, -20, 0, 20, 40, 60 и 80 мВ. Внешний раствор: 10 мМ глутамат калия, 10 мМ  $CaCl_2$ , 5 мМ MES, 1 мМ  $MgCl_2$ , pH 5.8 (титровали TRIS), осмоляльность составляла 1.5 моль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-сорбитолом). Внутренний раствор: 100 мМ глутамат калия, 1 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ EGTA, 5 мМ HEPES, pH 7.2 (титровали TRIS), осмоляльность составляла 1.5 моль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-сорбитолом) (Fan et al. 2003b). Для подтверждения  $K^+$  природы ионного тока использовали ингибитор  $K^+$ -проводящих каналов TEA(10 и 100 мМ) (Sigma-Aldrich, USA).

Входящий  $Ca^{2+}$  ток (Breugina et al. 2016) возбуждали гиперполяризующими импульсами продолжительностью 2 с, с интервалом 10 с, от стационарного потенциала 0 мВ до значений: -20, -40, -60, -80, -100, -120, -140, -160, -180 и -200 мВ (Shang et al., 2005). Внешний раствор: 0.2 мМ D-глюкоза, 10 мМ  $CaCl_2$ , 5 мМ MES, pH 5.8 (титровали TRIS), осмоляльность составляла 800 мОсмоль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-сорбитолом) (Qu et al., 2007). Внутренний раствор: 1 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 мМ  $CaCl_2$ , 4 мМ  $CaCO_3$ , 10 мМ EGTA, 2 мМ MgATP, 10 мМ HEPES, 100 мМ CsCl, 0.1 мМ MgGTP, pH 7.3 (титровали TRIS), осмоляльность составляла 1100 мОсмоль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-сорбитолом) (Qu et al. 2007). Для подтверждения  $Ca^{2+}$  природы ионного тока использовали ингибитор  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов  $LaCl_3$  10 и 100 мМ (Sigma-Aldrich, USA).

Выходящий  $H^+$  ток (Breugina et al. 2017) возбуждали деполяризующими пилообразными импульсами продолжительность 5 с, с интервалом 15 с, с пиками -100 и +100 мВ, при стационарном потенциале 0 мВ. Внешний раствор: 50 мМ NMG, 30 мМ L-глутаминовая кислота, 10 мМ L-глутамат кальция, 15 мМ TEA, 2 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ сахараза, 10 мМ D-глюкоза, 10 мМ L-малат, pH 7.0 (титровали HEPES), осмоляльность составляла 1.5 моль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-маннитолом) (Taylor and Assmann 2001). Внутренний раствор: 50 мМ NMG, 50 мМ L-глутаминовая кислота, 15 мМ TEA, 2 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ сахараза, 10 мМ D-глюкоза, 0.1 EGTA, 5 мМ MgATP, 10 мМ L-малат, pH 7.0 (титровали HEPES), осмоляльность составляла 1.5 моль $\times$ кг $^{-1}$  (доводили D-маннитолом) (Taylor and Assmann 2001). Для подтверждения  $H^+$  природы тока использовали ингибитор  $H^+$ -АТФазы ортованадат натрия ( $Na_3VO_4$ ) 3 мМ.

## **8. ЭПР спектроскопия**

Метод электронного парамагнитного резонанса обладает высокой чувствительностью и позволяет полуколичественно оценивать содержание свободных радикалов в жидкости (Senesi and Senesi 2005). Он основан на взаимодействии внешнего магнитного поля с магнитным моментом неспаренного электрона. Для стабилизации свободных радикалов, которые в обычном состоянии быстро переходят друг в друга, необходимо использовать спиновую ловушку (Haunwood 2013). Исследования проводились в сотрудничестве с Лунёвой О. Г.

Для регистрации супероксид радикала использовалась спиновая ловушка DEPMPO ((5-дитоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид) (Sigma, Германия), специфичная для супероксид-анион радикала. Спектры ЭПР были записаны при комнатной температуре на спектрометре Re-1307 (Москва, Россия) на кафедре биофизики (совместная работа с доц. Лунёвой О. Г.), при мощности микроволнового излучения 20 мВ, частоте 9.5 ГГц и периодом качания 1 мин. Каждый использованный в работе спектр является результатом 20 накоплений сигнала.

Общую окислительную способность экссудата оценивали с помощью спинового зонда CAT1H (дихлорид 1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-(триметил аммоний)пиперидиния (Dikalov et al. 2011, 2018). Для количественной характеристики окислительной способности измеряли интенсивность центральной линии в спектрах ЭПР CAT1H. Спектры ЭПР записывали при 21-22°C при мощности СВЧ 22 мВт и постоянной времени 0,1 с. Каждый спектр, представленный на рисунках, представляет собой среднее значение 10 повторностей.

## **9. Спектрофотометрия**

### Определение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Содержание пероксида водорода оценивалось с помощью колориметрического метода FOX-1, основанного на окислении ионов Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup> в присутствии красителя ксиленолового оранжевого (Li 2019). Экссудат собирали стандартным способом (см. выше) в течение получаса, далее его разбавляли в два раза дистиллированной водой, и добавляли реактив, содержащий 500 μМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 50 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 μМ ксиленолового оранжевого в 200 мМ сорбите. Пробы инкубировали с красителем в течение 5 минут, дальше измеряли оптическую плотность при длине волны 560 на спектрофотометре SmartSpec (BioRad, США).

По калибровочной прямой определяли концентрацию пероксида водорода в рыльцевом экссудате на разных стадиях созревания пестика и после опыления.

### Определение активности гваяколовой пероксидазы

Свежие рыльца табака и лилии на разных стадиях гомогенизировали на льду в 60 мМ фосфатном буфере (pH 7.0) с 0.2 мМ ЭДТА. Гомогенат центрифугировали при 10,000 g, 4 °C, в течение 20 мин. Для исследования аликвоту супернатанта смешивали с 0.5% гваяколом и 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gechev et al. 2002). Поглощение при 470 нм измеряли в течении 5 минут с помощью спектрофотометра SmartSpec.

## **10. Зимографическое определение активности ферментов**

Суть зимографического метода заключается в разделении белков методом электрофореза с сохранением их активности (нативный электрофорез) и последующем определении этой активности непосредственно в геле (Gamero-Sandemtrio et al. 2017).



Свежие рыльца удаляли из цветков и гомогенизировали при 0 °С в трициновом буфере (100 мМ, рН 8.0) с добавлением 3 мМ MgSO<sub>4</sub>, 3 мМ EGTA, 1 мМ DTT и 0.1% ингибитора протеаз. Гомогенаты центрифугировали при 10,000 g, 4 °С, в течение 20 мин.

Белковый экстракт растворяли в среде следующего состава: 200 мМ трис-НСl (рН 6,8), 20% глицерин, 100 мМ дитиотреитол, 0,4% бромфеноловый синий; соотношение белкового экстракта и среды для растворения образцов соответствовало 1:1 по объему. Образцы загружали по 20 мкг (40 мкг для АРХ) общего растворимого белка на дорожку на полиакриламидный гель. Электрофорез проводили по методу Леммли с использованием 5% полиакриламидного геля на 0,5 М трис-НСl буфере (рН 6,8) в качестве концентрирующего геля и 10, 12,5 или 15% полиакриламидного геля на 1,5 М трис-НСl буфере (рН 8,8) в качестве разделяющего геля. Электрофорез проводили при напряжении 180 В в течение 2 ч при 4 °С.

Концентрация белка в гомогенате оценивалась при помощи метода Бредфорда. Выделенный белок для сохранения активности хранили в жидком азоте и размораживали непосредственно перед нативным электрофорезом.

Для исследования активности супероксиддисмутазы в рыльцах использовали 10% или 15% полиакриламидный гель без добавления Na-ДДС; электродным буфером служил трис-глицин (25 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3). После прохождения электрофореза гель разделяли на две части, одну из которых вымачивали в 0.5 мМ растворе нитросинего тетразолия в темноте в течение 30 минут, после чего переносили гель в 50 мМ фосфатный буфер (рН 7.8), содержащий 28 мМ рибофлавина и 28 мМ тетраметилэтилендиамина на 20 минут в темноте. Затем гель переносили на свет, где постепенно развивалась темно-фиолетовая окраска, зоны активности СОД оставались бесцветными. Освещение останавливали, когда достигался максимальный контраст между бесцветной и окрашенной зонами. Для определения изоформ фермента перед обработкой нитросиним тетразолием гели обрабатывали ингибиторами – 3мМ KCN или 5мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – в течение 30 минут, затем проводили все то же, что с контрольными гелями.

Для исследования активности аскорбат пероксидазы (АРХ) гель выдерживали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) с 2 мМ аскорбата натрия 30 мин, раствор меняли каждые 10 мин. Затем гель переносили в ту же среду, дополнительно содержащую 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 20 мин, промывали фосфатным буфером 1 мин и замачивали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7.8) с 28 мМ TEMED и 2,45 мМ NBT. Инкубировали в течение 10 мин в темноте, а затем выставляли на свет. Реакцию останавливали 10% уксусной кислотой.

Для определения активности каталазы гель держали в 4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 минут, после чего споласкивали водой и переносили в буфер, содержащий 1% (w/v) KCl<sub>3</sub> и K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и освещали до получения чётких полос.

Для зимографии всегда использовали одну часть геля, а вторую окрашивали кумасси (25% изопропанол, 10% ледяная уксусная кислота, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250) для проверки равного распределения белка по дорожкам и оценки эффективности разделения белка в геле.

## **11. Спектрофлуориметрия**

### Выход анионов из пыльцевых зерен

Выход анионов из пыльцевых зерен в раствор выявляли с помощью флуоресцентного индикатора MEQ (6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide) (Molecular Probes), флуоресценция которого тушится  $Cl^-$  без образования устойчивого комплекса с ионом (Verkman et al., 1989). Стандартные навески пыльцевых зёрен инкубировали в среде, содержащей 5  $\mu$ M MEQ, в течение 2 или 10 мин. Затем пыльцу осаждали центрифугированием (60 сек, 3000 g) и измеряли интенсивность флуоресценции красителя. В работе использовали спектрофлуориметр RF-5301PC (Shimadzu, Япония). Флуоресценцию возбуждали при 344 нм, регистрировали при 445 нм.

### Выход активных форм кислорода из пыльцевых зёрен

Выход активных форм кислорода из пыльцевых зерен в раствор выявляли с помощью деэтерифицированной формы красителя DCFH (10 mM NaOH, 60 мин) (Смирнова et al. 2009) либо с помощью неспецифического красителя OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF, конъюгированного с БСА, что предотвращало его интернелизацию в клетки (Thermo Fisher Scientific) (Maksimov et al. 2018). В ходе эксперимента клетки помещали в раствор красителя (10  $\mu$ M), через заданное время удаляли путем фильтрации, а флуоресценцию внеклеточного раствора измеряли в микрокувете. Флуоресценцию возбуждали при 488 нм, спектр записывали в диапазоне 500-600 нм.

## **12. Рентгено-спектральный микроанализ**

После инкубации пыльцу фиксировали в охлажденной смеси абсолютного этанола и ацетона, 1:1 по объему (12 ч, 6°C). Затем образцы переносили в ацетон и сушили при критической точке на приборе HCP-2 (Hitachi, Япония). Анализ проб проводили на аналитическом сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония), оснащенный аналитической станцией JED-2300. Спектры характеристического излучения записывались путем помещения микроаэра в область апертур, где эскина отсутствует. Длительность счета составляла 100 с, ускоряющее напряжение – 20 кВ.

### **13. Пламенная фотометрия**

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

### **14. Сканирующая электронная микроскопия**

Пыльцевые зерна ели для СЭМ инкубировали в течение 21 ч в стандартной среде на квадратных покровных стеклах или пленке 24 мм, покрытых поли-L-лизинном, фиксировали 2,5% глутаральдегидом, растворенным в 0,1 М фосфатно-солевом растворе, pH 7.3. (PBS tablets, MP Biomedicals) при комнатной температуре в течение 1 ч с последующей дегидратацией в серии спиртов и ацетона и сушкой в критической точке на установке HCP-2 (Hitachi, Япония). Исследование образцов проб проводили на аналитическом сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония) в лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Работа была проведена в сотрудничестве с Полевой С.В. (Breygina et al. 2019)

### **15. Проточная цитофлуориметрия**

#### Изучение протопластов из пыльцевых трубок табака

Мембранный потенциал протопластов оценивали окрашиванием 1 мМ DiBAC<sub>4</sub>(3) в течение 10 мин на проточном цитометре Gallios (Beckman Coulter), анализ проводили с помощью программы FlowJo (TreeStar). Для различения популяции протопластов и клеточных фрагментов, стенок пыльцы и интактных зерен использовали окрашивание целлюлозы тинопалом (1 мг/л). Эта популяция была единственной, флуоресценция которой изменялась в присутствии агентов, влияющих на мембранный потенциал, например, ингибитора дыхания NaN<sub>3</sub> (мы наблюдали заметное увеличение сигнала при деполяризации). Стратегия гейтирования популяции, основанная на а) прямом и боковом рассеянии, б) флуоресценции тинопал (канал FL9, возбуждение 405 нм, полоса пропускания 450/40 нм) по сравнению с аутофлуоресценцией в дальнем красном свете (канал FL5, возбуждение 488 нм, детекция света с длиной волны > 755 нм) (Рисунок 1б,в). Протопласты пыльцы демонстрируют относительно низкую флуоресценцию в обоих каналах, так как лишены клеточной стенки. Флуоресценцию DiBAC<sub>4</sub>(3) измеряли в зеленой части спектра (канал FL1, возбуждение 488 нм, полоса пропускания 525/40 нм) (Рисунок 1г,д).

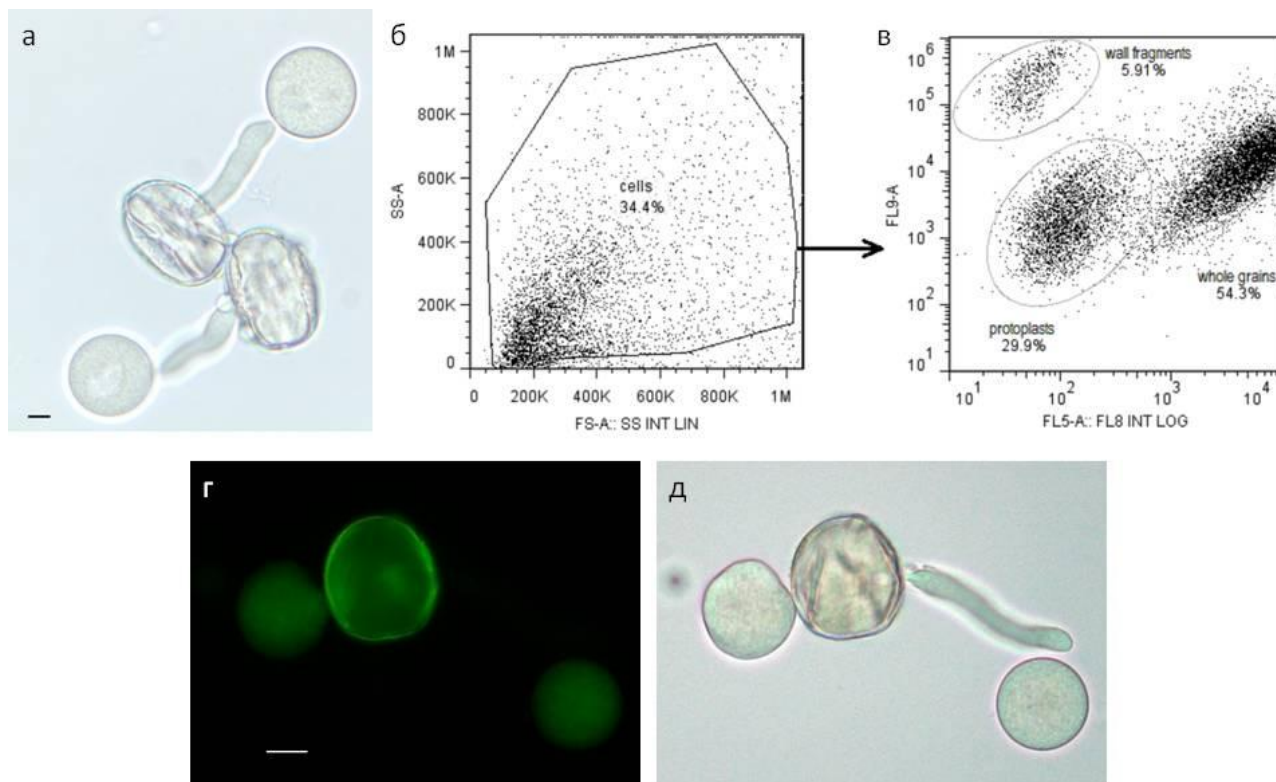


Рисунок 1. Окрашивание DiBAC<sub>4</sub>(3) и проточная цитометрия протопластов из пыльцы табака. а – образование протопластов из пыльцевых трубок в ферментативном растворе; б, в – стратегия стробирования, основанная на (б) прямом и боковом рассеянии (FS и SS соответственно), (в) флуоресценции тинопаля (канал FL9, возбуждение 405 нм, полоса пропускания 450/40 нм детектирования) по сравнению с автофлуоресценцией в дальнем красном диапазоне (канал FL5, возбуждение 488 нм, длинный проход детектирования 755 нм); г, д – протопласты, окрашенные DiBAC<sub>4</sub>(3) в свете флуоресценции (г) и светом поле (д). Масштабная линейка – 5  $\mu$ m (а), 10  $\mu$ m (г, д).

### Изучение суспензии изолированных митохондрий

Митохондрии выделяли из пыльцевых зёрен табака, которая прорастали в течение 2,5 часов (для увеличения доли митохондриального материала). Пыльцевые трубки собирали на 40  $\mu$ m нейлоновом фильтре с помощью вакуумного насоса и промывали буфером для промывки (0,3 М маннит, 2 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> в 25 мМ HEPES буфере, pH 7,2), затем переносили в буфер для выделения (0,3 М маннит, 2 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мМ цистеин, 0,4 мМ PMSF, 1  $\mu$ л/мл ингибиторный коктейль Sigma в 25 мМ HEPES буфере, pH 7,5) (Брейгина et al., 2010). Пыльцу разрушали с помощью гомогенизатора Diax 900 (Heidolph, Германия) при 17000 об/мин в течение 45 с. Суспензию отделяли от неразрушенных клеток и крупных фрагментов путем двухступенчатого центрифугирования: 5 мин при 1500g, затем 10 мин при 6000g. Митохондрии осаждали в течение 10 минут при 12000g. Осадок растворяли в буфере для выделения и наносили на перколл. Градиент перколла включал два слоя: 40% (нижний) и 23% (верхний). Центрифугирование в градиенте проводили в течение 30 мин при 12000g. Митохондриальная фракция образовывала видимую полосу в верхнем слое. Её переносили на 0,22  $\mu$ m мембранный фильтр (Millipore, США), отмывали буфером для промывки, смывали с

фильтра и хранили в буфере для промывки в течение 2-5 часов. Все операции проводили при 4°C.

В работе использовали проточный цитометр FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для идентификации митохондрий использовали краситель NAO (1  $\mu$ M, 10 мин при 4°C). В каждой пробе просчитывали 10 000 частиц, попавших в заданную зону. Флуоресценция всех использованных красителей считывалась в канале F-1 (530  $\pm$  15 нм), возбуждаемом 488-нм аргоновым лазером. Обработку данных производили с помощью программы FlowJo (Treestar Inc, США). Средняя концентрация митохондриального белка в исследованных пробах (по методу Лоури) составляла 114 мкг белка/мл.

Изменения мембранного потенциала митохондрий выявляли с использованием красителя краситель DiOC<sub>5</sub>(3) (Molecular Probes, Нидерланды). Суспензию изолированных митохондрий окрашивали в течение 10 мин при 4°C. В экспериментах с разобщителем дыхательной цепи CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) и ингибиторами анионных каналов NPPB и DIDS эти реагенты добавляли к суспензии за 5 минут до начала окрашивания в концентрациях 20, 40 и 80  $\mu$ M, соответственно.

Выявление активных форм кислорода в митохондриях проводили с помощью красителя DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular Probes). Концентрация красителя составляла 10  $\mu$ M, суспензию митохондрий окрашивали в течение 60 мин при 4°C.

## **16. Протеомные исследования**

Белки выделяли методом фенольной экстракции (Faurobert et al. 2007). Растительные ткани гомогенизировали в ледяном экстракционном буфере (500 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ ЭДТА, 700 мМ сахарозы, 100 мМ КСl, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 1 мМ ДТТ) с последующей инкубацией на льду в течение 10 мин. Добавляли равный объем ледяного трис-НСl (рН 8.0), насыщенного фенола, смесь перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при встряхивании. После центрифугирования (10 мин, 5500 $\times$ g, 4°C) фенольную фазу собирали и рекстрагировали экстракционным буфером. Белки осаждали из конечной фенольной фазы тремя объемами ледяного 0,1 М ацетата аммония в метаноле в течение ночи при -20°C. Гранулы промывали ледяным 0,1 М ацетатом аммония в метаноле три раза и один раз ледяным ацетоном, а затем сушили. Полученный осадок растворяли в 8 М мочевины, 2 М тиомочевины и 10 мМ Трис. Белки определяли количественно с помощью анализа белка по Брэдфорду (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США). 100 мкг белков восстанавливали 5 мМ ДТТ в течение 30 минут при 50°C и алкилировали 10 мМ йодацетамидом в течение 20 минут при комнатной температуре. Белки растворяли в 40 мМ бикарбоната аммония и расщепляли в 1 мкг модифицированного трипсина сиквенс-класса (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) при 37°C в течение ночи. Реакцию останавливали добавлением трифторуксусной кислоты до 1%. По 20

мкг каждого образца дважды обессоливали экстракционными дисками Empore октадецил C18 (Supelco, США) и затем сушили в вакуумном концентраторе (Breygina et al. 2021b).

Масс-спектрометрический анализ проводили в трех независимых биологических и трех технических повторах. Обращенно-фазовую хроматографию выполняли с использованием системы Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, Роквелл, Иллинойс, США), которая была соединена с масс-спектрометром Q Exactive HF (масс-спектрометр Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, Thermo Fisher Scientific, США). Пептиды разделяли на колонке C18 длиной 15 см с внутренним диаметром 75 мкм (Acclaim® PepMap™ RSLC, Thermo Fisher Scientific, Роквелл, Иллинойс, США). Пептиды элюировали градиентом от 5–35% буфера В (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) в течение 65 мин при скорости потока 0,3 мкл/мин. Общее время анализа, включая начальные 10 минут уравнивания колонки с буфером А (0,1% муравьиной кислоты), затем градиент от 5–35% буфера В в течение 65 минут, 5 минут до достижения 99% буфера В, промывку 5 минут 99% буфером В. и 5-минутное реуравнивание к буферу А составило 90 минут. МС-анализ проводили по меньшей мере в трех экземплярах с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF (масс-спектрометр Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, Thermo Fisher Scientific, Роквелл, Иллинойс, США). Масс-спектры получали с разрешением 120 000 (МС) и 15 000 (МС/МС) в диапазоне  $m/z$  300–1500 (МС) и 100–2000 (МС/МС) соответственно. Для отбора предшественника был определен порог изоляции в 100 000 отсчетов; до 20 лучших прекурсоров были выбраны для фрагментации с помощью высокоэнергетической столкновительной диссоциации (HCD) при 29 NCE и времени накопления 100 мс. Прекурсоры с заряженным состоянием +1 отбраковывались, а все измеренные прекурсоры исключались из измерений на 20 с. Другие настройки: исключение начислений - не назначено, 1, >6; совпадение пептидов – предпочтительно; исключить изотопы – включено; динамическое исключение - 20 с было включено.

Данные масс-спектрометрии обрабатывали с использованием бесплатно доступного программного обеспечения MaxQuant (v1.6.6.0). Спектры МС/МС были найдены в базе данных, содержащей белковые последовательности из Uniprot (73066 записей) и последовательности из базы данных распространенных белков-примесей (Tyanova et al. 2016a). Коэффициент ложного обнаружения (FDR) для идентификации пептидов и белков был установлен на уровне 0,01. Для поиска были заданы фиксированная модификация (карбамидометилирование цистеина) и переменная модификация (окисление метионина и N-концевое ацетилирование). Все остальные параметры остались со значениями по умолчанию. Для количественного определения белка использовался алгоритм LFQ MaxQuant, который объединяет и корректирует интенсивность пептидов в значение интенсивности белка.

Интенсивности LFQ белков из анализа MaxQuant были импортированы в свободно доступное программное обеспечение Perseus (версия 1.6.0.7) и преобразованы в логарифмическую шкалу с основанием два (Tyanova et al. 2016b). Обратные попадания в базу данных и загрязнения были удалены перед выполнением двустороннего критерия Стьюдента и проведена коррекция ошибок (значение  $p < 0,05$ ) с использованием метода Бенджамини-Хохберга. Требовалось минимум 2 измерения на группу. Все те белки, которые показывали кратность изменения не менее 1,2 и удовлетворяли  $p < 0,05$ , считались дифференциально экспрессируемыми.

Анализ обогащения онтологии генов (GO) проводился с использованием онлайн-сервиса карты регуляторной транскрипции растений (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn>) (Jin et al. 2015, 2016).

## **17. Анализ жирнокислотного состава пыльцы**

Экстракция липидов. Поверхностные липиды (трифину) смывали с пыльцы лилии и табака гексаном (2 раза по 1 мин) и анализировали отдельно. Образцы пыльцы (с трифиной или без нее) фиксировали отдельно в кипящем изопропиловом спирте в течение 1 ч для сохранения нативного липидного состава. До экстракции образцы хранили при +4 °C. Для экстракции липидов изопропанол отделяли через стеклянный фильтр Шотта в мерную колбу емкостью 200 мл, а растительный материал гомогенизировали в фарфоровой ступке и экстрагировали, как описано ранее с небольшими модификациями (Voronkov and Ivanova 2021). Липиды экстрагировали трижды последовательно смесью хлороформ/метанол/H<sub>2</sub>O (30:20:1,7 по объему) и хлороформ/метанол/HNO<sub>3</sub> (20:10:0,1 по объему). Все экстракты переносили в мерную колбу, нейтральный pH доводили с помощью NH<sub>4</sub>OH и общий объем доводили до 200 мл изопропанолом, содержащим 0,001% ионола (бутилированный гидрокситолуол, Sigma-Aldrich, 34750) в качестве антиоксиданта. Экстракты хранили при +4 °C. Следует отметить, что другие существующие методы экстракции липидов без использования хлороформа не всегда способны полностью извлечь их из тканей растений, поэтому метод экстракции выбирается в соответствии с задачами исследования (Nekrasov et al. 2021).

Получение и анализ метиловых эфиров жирных кислот. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали по ранее описанной методике с небольшими модификациями (Voronkov and Ivanova 2022). Аликвоту (50 мл) экстракта (или липидов оболочки в гексане) упаривали досуха на роторном испарителе в стандартных условиях и проводили омыление в кипящем растворе 4% NaOH в метиловом спирте/воде (1:1 по объему). Затем образец упаривали досуха. К высушенному образцу добавляли H<sub>2</sub>O (1–2 мл), и неомыляемые ЖК несколько раз промывали гексаном до прозрачности. Затем к оставшейся водорастворимой фракции добавляли несколько капель метиленового оранжевого и подкисляли ее 20%-ным

раствором  $H_2SO_4$  до розового цвета. Затем жирные кислоты экстрагировали шесть раз гексаном. Собранный гексан упаривали, к образцу добавляли 3 мл метанола и несколько капель ацетилхлорида и кипятили 1 час. Затем образец снова упаривали, добавляли 1–2 мл  $H_2O$  и несколько капель метилоранжа и шестикратно экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот гексаном. После этого гексан выпаривали и добавляли 500  $\mu$ л бензола. Экстракт в бензоле наносили пипеткой на хроматографическую пластинку, в качестве подвижной фазы использовали смесь гексан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (8:2:0,1 по объему). Когда фронт переходил к верху пластины, пластину снимали и сушили на воздухе в течение 1–2 мин. Затем пластинку обрабатывали 0,001% раствором 2',7'-дихлорфлуоресцеина в этаноле и сушили на воздухе в течение 5–7 мин. Зоны, содержащие МЭЖК, визуализировали в УФ-свете ( $\lambda=365$  нм). Затем сорбент из зоны хроматографической пластинки, содержащей МЭЖК, удаляли скальпелем и переносили на стеклянный фильтр Шотта, а МЭЖК элюировали с сорбента шестикратной промывкой гексаном (Voronkov et al. 2019).

МЭЖК анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на газовом хроматографе Agilent 7890А с квадрупольным масс-детектором Agilent 5975С, оснащенный 60-метровой капиллярной колонкой DB-23 (внутренний диаметр 0,25 мм, толщина неподвижной фазы -( 50%-цианопропил)-метилполисилоксан — 250 мкм). Подготовленные МЭЖК разделяли при следующих условиях: газ-носитель — гелий, скорость 1 мл/мин; объем образца – 1 мкл; коэффициент разделения 4:1 (во многих анализах использовался безраздельный впрыск); температура испарителя 260°C. Программа температуры печи была следующей: от 130 до 170 °С со скоростью 6,5 °С/мин, до 215 °С со скоростью 2,75 °С/мин (выдержка при этой температуре 25 мин), до 240 °С со скоростью 40 °С/мин. (выдержка 30 мин при 240°C). Рабочая температура масс-детектора была установлена на уровне 240 °С, а энергия ионизации — на уровне 70 эВ. Для идентификации отдельных видов FAME использовали поисковые библиотеки NIST и Wiley и программное обеспечение ChemStation, а для каждого пика рассчитывали относительное время удерживания и значение равной длины цепи (ECL) (Ivanova et al. 2019).

Кривые поглощения метиловых эфиров жирных кислот. Два миллиграмма МЭЖК растворяли в 1 мл гексана и измеряли спектры поглощения приготовленных растворов при 200–500 нм с помощью спектрофотометров UV/Vis (Shimadzu UV-2700 или Hitachi 557, Япония).

## 18. Реагенты, сдвигающие редокс-гомеостаз

$H_2O_2$  (пероксид водорода) – полярная молекула со степень окисления кислорода -1: каждый атом кислорода связан с соседним и с атомом водорода. Такая связь является относительно нестабильной, но по сравнению с другими АФК пероксид стабилен, так как не



является радикальной частицей. Для приготовления растворов использовался 30% стабилизированный  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Panreac, Германия).

Системы для генерации  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : (1) 8 мкМ рибофлавина и 1 мМ ЭДТА в 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4) облучали ультрафиолетом ( $365 \pm 12$  нм) в течение 1 минуты для запуска реакции (Beauchamp and Fridovich 1971; Смирнова et al. 2009); (2) свежеприготовленный 50 мМ раствор ксантина (К) смешивали с 1 Ед/мл раствором ксантиноксидазы (КО) (Zhu 2016) до конечной концентрации в среде инкубации пыльцы. 0.25 мМ К/0.005 Ед/мл КО.

$\text{OH}^\bullet$  генерировали в реакции Фентона, добавляя 100 или 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  и 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (Kukavica et al. 2009).

Mn-TMPP – синтетический Mn-порфирин (Merck, Германия), эффективный тушитель пероксида водорода и супероксид-аниона, имитирующий действие СОД и каталазы. Использовался в работе как антиоксидант.

## 19. Статистическая обработка данных

Все опыты проводили не менее чем в трёх биологических повторностях. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 и 0.01. На рисунках указаны средние значения и стандартные ошибки. При обработке пэтч-кламп экспериментов, а также некоторых других данных, где было мало повторностей, использовали статистические критерии для малых выборок (критерии Вилкоксона и Манна-Уитни). Для характеристики уровня ненасыщенности липидных ЖК рассчитывали индекс ненасыщенности (ИН) (Lyons et al. 1964). Статистический анализ проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным анализом с использованием честной значимой разницы Тьюки (HSD) для неравных N-тестов. Разные буквы и символы имеют существенно разные значения. Средние значения считались значимо отличающимися при  $P < 0,05$ . Для экспериментов по прорастанию пыльцы достоверную разницу оценивали с помощью программного обеспечения OriginLab (Нортгемптон, США) по критерию Манна-Уитни,  $P < 0,05$ .

## Глава III. Роль АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна<sup>1</sup>

### III.1. Начальные этапы прорастания у ели.

Редокс-регуляция прорастания пыльцевых зёрен к настоящему моменту неплохо изучена, в том числе, благодаря работе нашей группы. Однако, по традиции, основная масса классических исследований проводилась на пыльце модельных цветковых растений, главным образом, табака и лилии. Позже, когда в фокус исследований вошли регуляторные белки, а для детекции АФК стали применяться белковые сенсоры, исследования в значительной мере сосредоточились на другом модельном объекте – *Arabidopsis*, который позволял выполнять такие работы благодаря изученности генома, доступности трансформации и обширному списку мутантов. Наименее изученными в этом отношении были и остаются голосеменные растения. В то же время, особенности редокс-регуляции у них представляли несомненный интерес, поскольку *in vivo* пыльцевые зёрна прорастают совершенно в другой среде, чем у цветковых: отсутствуют ткани пестика, которые могли бы продуцировать АФК или антиоксиданты, а значит, пыльца в этом случае может оказаться быть более автономной, то есть поддерживать оптимальный баланс продукции и ликвидации АФК самостоятельно. В связи с этим важным отличием мы проводили на пыльце голосеменного растения исследования, сходные с теми, которые ранее были выполнены на табаке, и сравнивали полученные результаты. Полученные результаты не подтвердили гипотезу об автономности пыльцы ели и будут представлены ниже.

---

<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. Maksimov N.M., Evmenyeva A.A., **Breygina M.A.**, Yermakov I.P. The role of reactive oxygen species in pollen germination in *Picea pungens* (blue spruce). // Plant Reproduction. –2018. – Vol. 31. – № 4. – P. 357- 365 (IF =3.4, 0,8/0,6)
2. **Breygina M.A.**, Maksimov N.M., Polevova S.V., Evmenyeva A.A. Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*). // Protoplasma.– 2019. – Vol. 256. – № 4. – P. 941- 949 (IF =2.9, 0,75/0,5)
3. Podolyan A.O., Maksimov N.M., **Breygina M.A.** Redox-regulation of ion homeostasis in growing lily pollen tubes. // Journal of Plant Physiology.– 2019. – Vol. 243 (IF =4.3, 0,85/0,6).
4. **Breygina M.A.**, Klimenko E.S., Shilov E.S., Podolyan A.O., Mamaeva A.S., Zgoda V.G., Fesenko I. Hydrogen peroxide in tobacco stigma exudate affects pollen proteome and membrane potential in pollen tubes. // Plant Biology. – 2021. – Vol. 23. – № 4. – P. 592- 602 (IF =3.9, 0,85/0,7)
5. Podolyan A.O., Luneva O.G., Klimenko E.S., **Breygina M.A.** Oxygen radicals and cytoplasm zoning in growing lily pollen tubes. // Plant Reproduction. – 2021. – Vol. 34. – № 2. – P. 103-115 (IF =3.4, 0,8/0,6)
6. **Breygina M.A.**, Voronkov A.S., Ivanova T., Babushkina K.O. Fatty acid composition of dry and germinating pollen of gymnosperm and angiosperm plants. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 11 (IF =5,6 1/0,7).

## 1.1 Выделение АФК во внеклеточную среду пыльцой ели

В качестве объекта была выбрана ель колючая, пыльцу собирали с деревьев на территории Университета, хранили и регулярно проверяли на жизнеспособность и процент прорастания. Отличие ели от другого распространенного объекта из семейства Сосновых, сосны, заключается в более длительном прорастании пыльцевых зёрен последней, которое в связи с этим нуждается в стерильных условиях и стерилизации до высыпания из шишек. Пыльца ели прорастает относительно быстро, демонстрирует высокий уровень прорастания и может быть собрана из зрелых шишек непосредственно с деревьев.

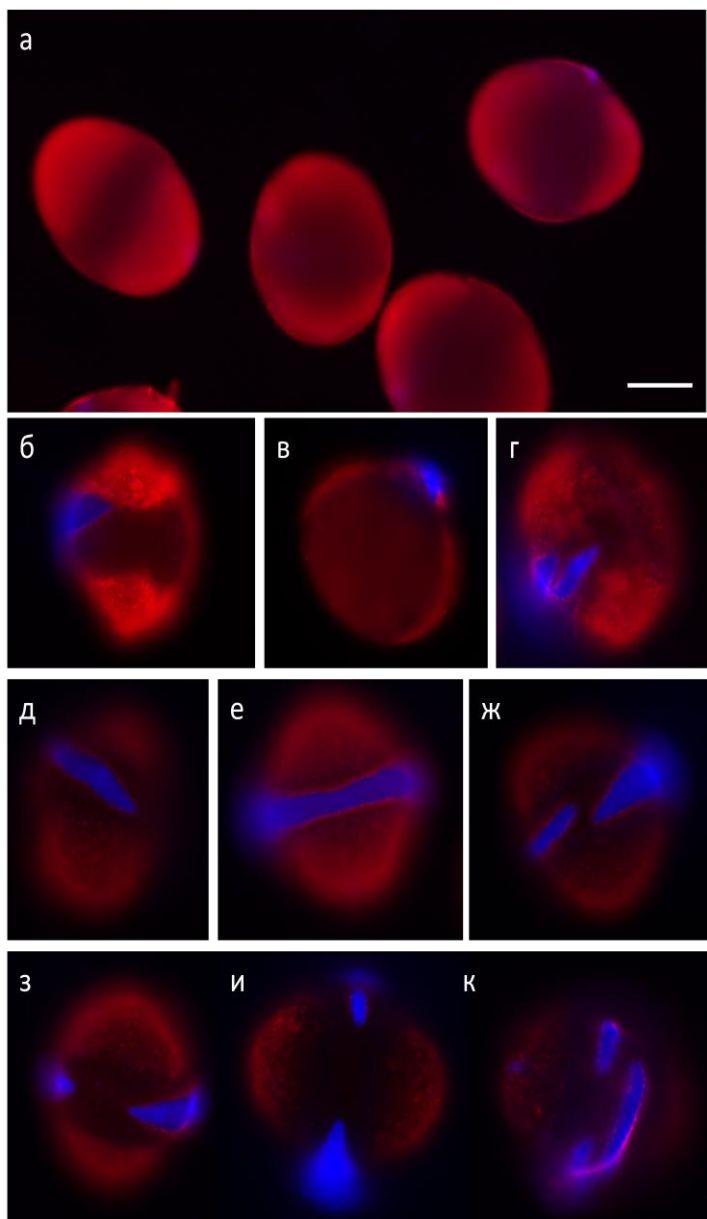


Рисунок 2. Динамика пыльцевой оболочки при запуске прорастания пыльцевых зёрен *Picea pungens*. Экзина окрашена гидрофобным красителем MitoSOX (красный), интина визуализирована красителем Tinopal (синий). а – 2 ч. инкубации, разрывов экзины нет; б-г – 6 ч.: единичные разрывы можно увидеть во многих зёрнах; д-к – пыльцевые зёрна через 9 часов: имеют один относительно большой разрыв, два разрыва на концах борозды, более или менее расширенные множественные разрывы. Биполярное прорастание происходит у зёрен с двумя или множественными разрывами на двух концах борозды (з, и). Масштабная линейка – 50  $\mu\text{m}$ .

До нашей работы активация пыльцы хвойных растений практически не изучалась, поэтому необходимо было описать временные параметры прорастания пыльцевых зёрен ели, которые можно оценить микроскопическими методами.

После 2 часов инкубации у 99% зёрен в экзине не наблюдалось разрывов (Рисунок 2а). Изучение динамики разрывов экзины показало, что они чаще всего образуются в ямках на конце борозды от 6 до 9 часов инкубации *in vitro*. После 6 часов на многих зернах в суспензии появляются единичные мелкие разрывы, за которыми удобно наблюдать с помощью флуоресцентного окрашивания интины (голубой) и экзины (красный) (Рисунок 2б-г). Позже мелкие разрывы могут сливаться, образуя одно или два крупных отверстия в экзине (Рисунок 2г). После 9 часов инкубации появляются первые пыльцевые трубки («носики») (Рисунок 2д-к), а точка 14 часов соответствует периоду полярного роста в значительной части популяции. Эти временные точки будут использованы в дальнейшей работе.

Сотрудница лаборатории Анна Смирнова с соавторами обнаружила, что пыльца табака при подготовке к прорастанию *in vitro* продуцирует АФК, которые могут быть задокументированы спектрофлуориметрически (Смирнова et al. 2009). Выход пероксида водорода в среду инкубации был позднее обнаружен для пыльцевых зёрен киви (Speranza et al., 2011). Аналогичный опыт с пыльцой ели, однако с применением более современного красителя (непроникающий в клетки БСА-связанный АФК-чувствительный зонд ОхуBurst), был проведен нами в 2020 году (Maksimov et al. 2018). Оказалось, что пыльца ели также продуцирует значительные количества АФК, однако выделение АФК в среду инкубации было зафиксировано ещё раньше, чем потенциальное начало их синтеза: в среде, кондиционированной пыльцевыми зёрнами в течение 1 минуты, уже содержатся заметные количества АФК по сравнению с чистой средой (Рисунок 3а), причем присутствие ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилениодониум (ДФИ) никак не влияло на этот процесс. Однако, в ходе инкубации контрольной суспензии количество АФК продолжило увеличиваться (Рисунок 3б), причем в присутствии ДФИ такого увеличения не происходило. Таким образом, ингибитор фермента блокировал дальнейшее повышение уровня АФК. Логично предположить, что АФК, выделяемые из пыльцевых зёрен в первую минуту инкубации, не связаны с активностью НАДФН-оксидазы и, судя по всему, вымываются из цитоплазмы или стенки пыльцы в процессе гидратации. Дальнейшее выделение АФК преимущественно обеспечивается НАДФН-оксидазой плазмалеммы. Аналогичный процесс у табака также подавлялся 0.1 мМ ДФИ (Смирнова et al. 2009). Мы можем заключить, что работа НАДФН-оксидазы, приводящая к экстраклеточной продукции АФК, в процессе активации пыльцы происходит как у цветковых, так и у хвойных растений.

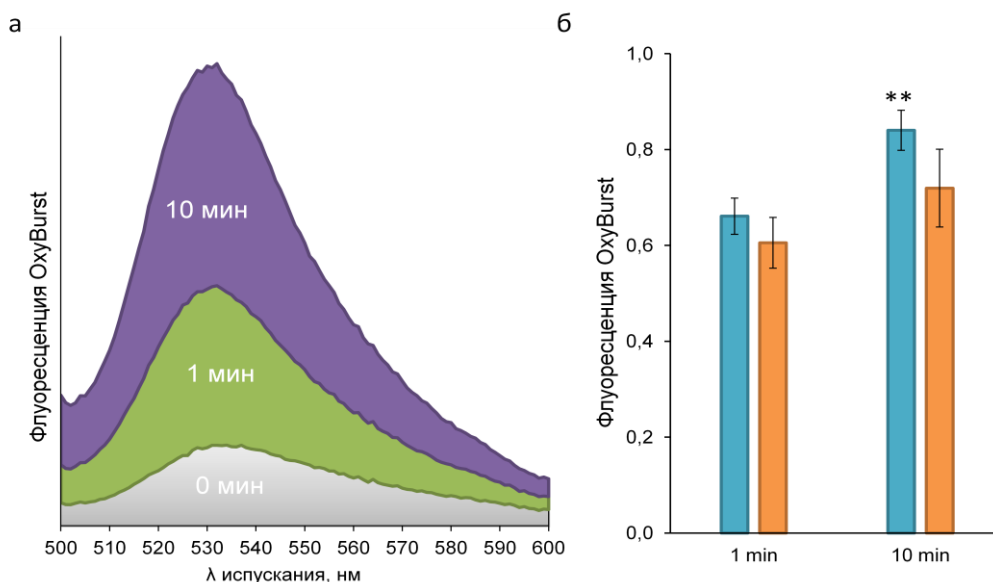


Рисунок 3. Внеклеточные АФК, выделяемые пылью на ранней стадии прорастания. а – репрезентативная запись спектра флуоресценции АФК-сенсора OxyBurst в контрольной среде до (0 мин) и после 1 и 10 минут инкубации пыли; б – эффект ДФИ на выделение АФК (средние на основании 5 суспензий). В контрольной суспензии (голубые столбики) флуоресценция существенно выросла в интервале от 1 до 10 минут ( $P < 0.01$ , t-критерий Стьюдента), а в суспензии с ДФИ (оранжевые столбики) статистически значимого возрастания не наблюдалось.

Исследования продукции АФК в более широком временном интервале проводили методом ЭПР спектроскопии. При этом использовали спиновый зонд, обладающий неспецифическим сигналом, то есть детектирующий суммарный уровень АФК. Зонд обладает способностью проникать через плазмалемму, так что, теоретически, он может детектировать как вне-, так и внутриклеточные АФК. Мы измеряли продукцию АФК пыли после 2, 6, 9 и 14 часов инкубации, а также сравнивали динамику АФК в контроле и среде с каталазой (100 единиц активности/мл) (Бабушкина и Лунёва 2023).

После 2 и 6 часов инкубации генерация АФК была стабильна на относительно низком уровне. К 9 часам концентрация АФК резко возрастает (Рисунок 4), что согласуется с данными о появлении пыльцевых трубок на девятом часу прорастания (Рисунок 2). К 14 часам интенсивность сигнала вновь снижается до базального уровня. Таким образом, представляется логичным, что начало роста трубок совпадает с пиком концентрации АФК.

Обработка каталазой снижала уровень АФК на 18% (9 ч) и на 45% (14 ч) (Рисунок 4). По-видимому, на пике генерации АФК пероксид водорода составляет небольшую часть суммарного уровня, в то время как в растущей трубке он составляет примерно половину суммарных АФК. Это согласуется с данными о снижении эффективности прорастания под действием СОД (см. далее).

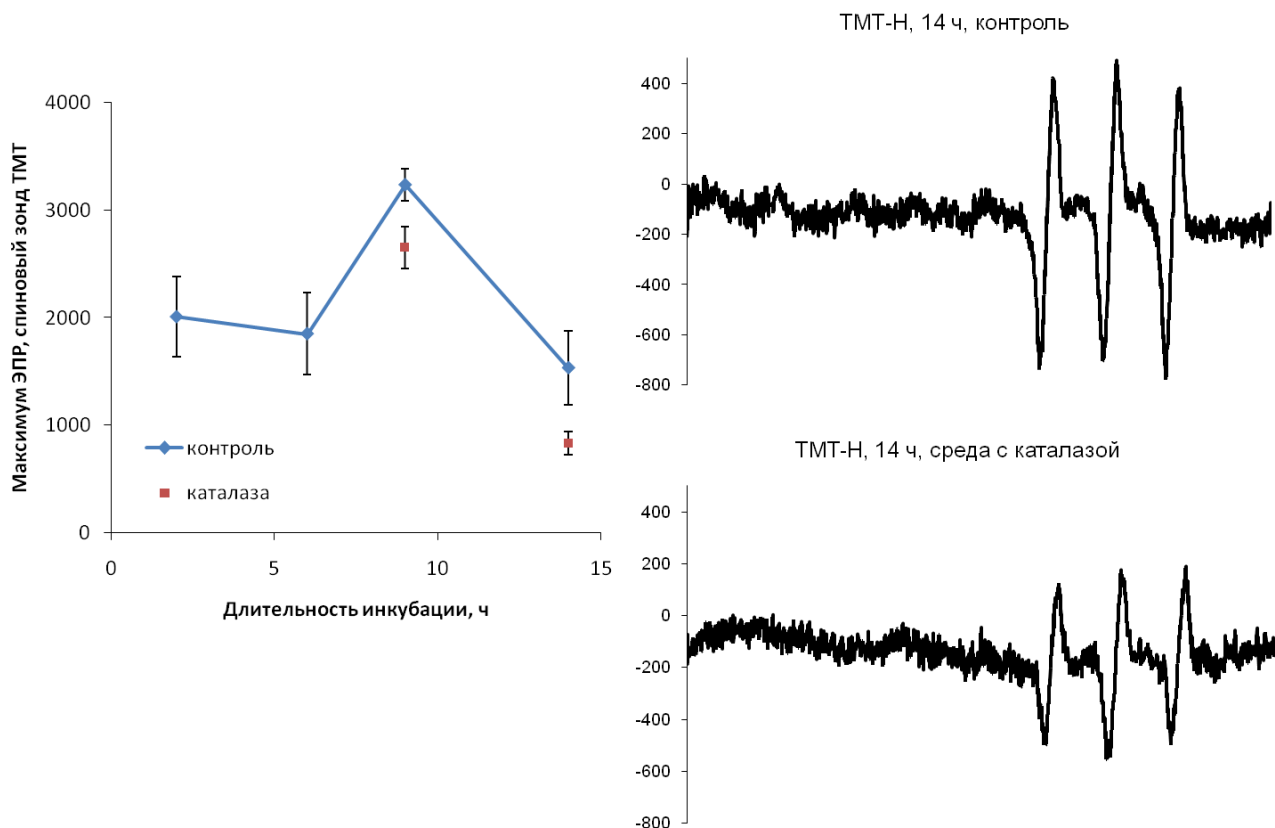


Рисунок 4. Динамика содержания АФК в суспензии пыльцевых зёрен, зарегистрированная методом ЭПР спектроскопии с неспецифичным спиновым зондом TMT-H. Каталаза добавлена в концентрации 100 Е/мл.

## 1.2 Значение генерации АФК для прорастания пыльцевых зёрен ели

Необходимо было проверить, насколько продукция эндогенных АФК важна для эффективного прорастания пыльцевого зерна ели. Для решения этой задачи мы использовали различные реагенты, модулирующие баланс образования и/или ликвидации АФК в суспензии пыльцевых зёрен: Mn-TMPP, разлагающий  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$ ; супероксиддисмутазу (СОД), катализирующую переход  $O_2^{\cdot -}$  в  $H_2O_2$ ; POBN, специфичный тушитель  $\cdot OH$  (Smirnova et al., 2013); и аскорбиновую кислоту. Последняя служила внеклеточным антиоксидантом, поскольку при pH 5.8 молекула аскорбата представляет собой анион ( $pK_a^1 = 4.2$ ,  $pK_a^2 = 11.6$ ) и, за счёт отрицательного заряда, не проникает в клетку (Maksimov et al. 2018). Продолжительность инкубации пыльцевых зёрен была выбрана так, чтобы обнаружить как стимулирующие, так и ингибирующие эффекты: в контроле эффективность прорастания составляла примерно 50% от максимальной.

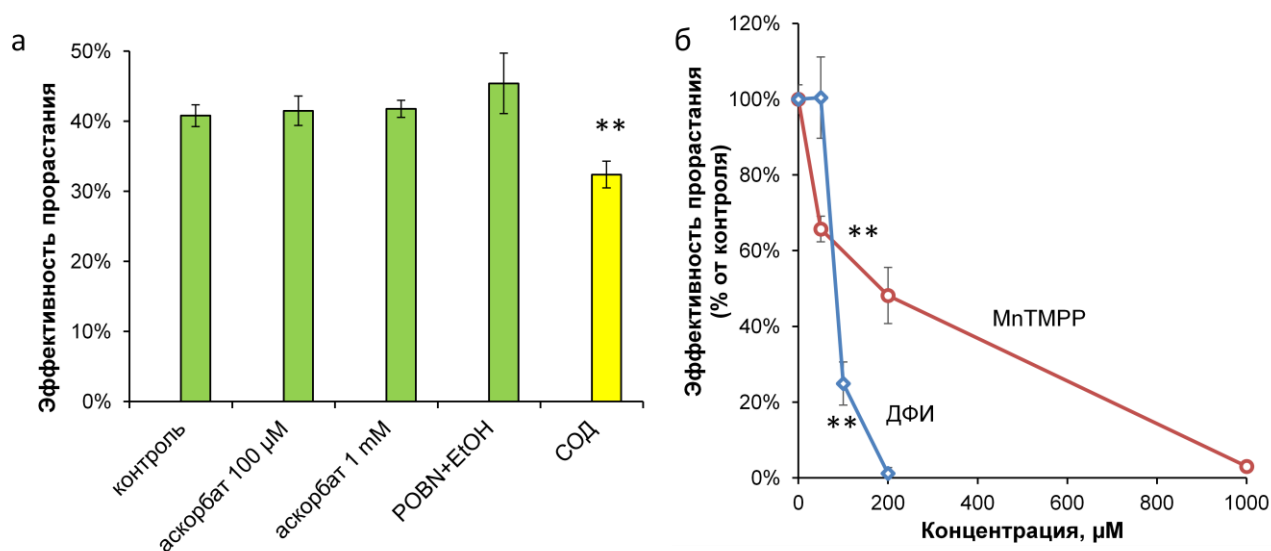


Рисунок 5. Эффекты антиоксидантов и ДФИ на прорастание пыльцевых зёрен ели. а – эффективность прорастания в контроле, в присутствии аскорбиновой кислоты, POBN + этанола и СОД после 13 часов инкубации. Аскорбиновая кислота и POBN не оказывают эффекта, СОД достоверно ( $P < 0.01$ ), но не сильно снижает эффективность прорастания; б – эффективность прорастания в суспензиях, обработанных различными концентрациями ДФИ и MnTMPP (нормализовано к контролю). Оба вещества блокируют прорастание, в обоих случаях наблюдается концентрационная зависимость.  $P < 0.01$ .

Аскорбиновая кислота (0.1 или 1 мМ) и POBN не влияли на прорастание, СОД (100 ед/мл) снижала эффективность прорастания (Рисунок 5а). Наиболее эффективно подавляла прорастание Mn-TMPР, причем наблюдалась четкая концентрационная зависимость, и при 1 мМ появление трубок было полностью заблокировано (Рисунок 5б). Таким образом, некоторые АФК, а именно,  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$ , являются значимыми для прорастания у *Picea pungens*;  $\cdot OH$ , по-видимому, не присутствует в суспензии в заметных количествах. Эти результаты хорошо согласуются с действием ДФИ на продукцию экстраклеточных АФК (Рисунок 3).

В отличие от пыльцевых зёрен ели, аналогичные опыты на табаке демонстрировали эффекты практически всех веществ, сдвигающих баланс образования/ликвидации АФК, причем действие на прорастание могло быть разнонаправленными в зависимости от концентрации (Smirnova et al., 2013; Смирнова и др., 2009; Speranza et al., 2011).

Так, аскорбиновая кислота и обе концентрации POBN ингибировали прорастание пыльцы табака (Smirnova et al., 2013; Смирнова и др., 2009), но не оказывали действия на пыльцу ели. Напротив, СОД стимулировала прорастание у табака, но снижала его эффективность у ели. А главное, сильнейшие ингибирующие эффекты на пыльцу ели оказывали MnTMPР и ДФИ (Рисунок 5), в то время как у табака низкие и средние концентрации этих же веществ стимулировали, а высокие ингибировали прорастание (Smirnova et al., 2013; Смирнова и др. 2009). Наиболее простое объяснение заключается в том, что уровень продукции АФК пыльцевыми зёрнами цветковых растений значительно выше, чем у хвойных.

Однако для киви эффекты двух модуляторов – ДФИ и MnTMPРР – были сходны с обнаруженными у ели (Speranza et al., 2011), а другие вещества в данном опыте не тестировались. Причина обнаруженного сходства может крыться как в размере пыльцевых зёрен (у киви они значительно крупнее, чем у табака, и сходны в этом отношении с елью) (Mangalore et al. 2017), так и в филогенетическом положении *Actinidia deliciosa* (киви) и особенностях АФК-регуляции прорастания пыльцы у данной группы растений *in vivo*, которые будут обсуждаться в последней главе.

### 1.3 АФК и битубулярное прорастание

Остановимся на ещё одном важном аспекте, отличающем пыльцу голосеменных растений от цветковых растений. Общая эффективность прорастания у голубой ели довольно высока (более 70% после 21 часа инкубации *in vitro*), при этом для неё характерно явление, которое мы описали в статье термином «биполярное прорастание» (хотя можно назвать и иначе, например, битубулярное прорастание), и частота которого в среднем составляет, по нашим данным, около 25% всех проросших зерен (Breugina et al. 2019). Обнаружив это явление, мы искали сведения о нём в литературе, однако оно практически не упоминалось в статьях, посвященных прорастанию пыльцы голосеменных растений. При этом на иллюстрациях в статьях пыльцевые зерна с двумя трубками можно встретить довольно часто (Chen et al. 2009; Cui et al. 2015).

У зооидогамных семенных растений, таких как саговники и гинкго, выросты мужского гаметофита, условно называемые пыльцевыми трубками, функционируют как гаустории, т.е. на их дистальном конце появляются множественные ответвления, которые проникают в нуцеллус для поглощения воды и питательных веществ, необходимых для развития сперматозоидов (Fernando et al. 2010). Это явление, по-видимому, является адаптацией мужского гаметофита к переходу от свободноживущего существования к росту в тканях спорофита (Lora et al. 2016). В более дивергентных группах, у хвойных и гнетовых, женский спорофит способствует росту и развитию пыльцевой трубки, поэтому, как считается, ветвление мужского гаметофита уменьшилось или исчезло (Lora et al. 2016). Тем не менее, разветвленные пыльцевые трубки встречаются у различных хвойных растений, хотя это явление менее выражено и распространено по сравнению с таковым у саговников и гинкго (Owens et al. 1998).

Биполярное (битубулярное) прорастание представляет собой другую разновидность мультиполярного роста и, помимо представителей Pinaceae, также было описано у некоторых покрытосеменных растений, таких как австралийский эндемик *Conospermum* и некоторые представители *Dipsacaceae* и *Morinaceae* (Blackmore and Cannon 1983; Stone et al. 2004; Hesse et al. 2009). Множественные трубки («мгновенные пыльцевые трубки») появляются в последнем случае еще до выхода из пыльника или в зрелой пыльце сразу после контакта с водой; их



появление интерпретируется как процесс, предшествующий прорастанию, и его функция четко не установлена (Hesse et al. 2009).

Обсуждая эволюцию роста пыльцевых трубок, авторы ряда публикаций постулируют «гаусториальную» природу множественных трубок, по крайней мере, у хвойных (Johri 1992; Rudall and Bateman 2007; Lora et al. 2016), но, с другой стороны, раз утрачивается ветвление, гаусториальная роль пыльцевых трубок хвойных в лучшем случае вторична (Fernando et al. 2010). Может ли быть другая роль у биполярного прорастания и какова его природа у ели?

Изучая этот феномен, мы обнаружили, что обе трубки выходят из пыльцевого зерна одновременно, обычно с двух противоположных концов лептомы (Рисунок 6а). При униполярном прорастании трубка имеет видимую цитоплазматическую зональность (Рисунок 6г): четко различимая апикальная часть («прозрачная зона»), скопление амилопластов вокруг вегетативного ядра в центре трубки и вакуоли ближе к пыльцевому зерну. При биполярном прорастании обе трубки обычно содержат прозрачную зону и вакуоли, но амилопласты накапливаются главным образом в одной из трубок, а другая вакуолизируется (Рисунок 6в), или же амилопласты неравномерно распределены между двумя трубками (Рисунок 6д).

Мы обнаружили, что при битубулярном прорастании вегетативное ядро (ядро трубки) выходит из пыльцевого зерна очень поздно по сравнению с униполярным прорастанием. После 21 часа инкубации все одиночные трубки имеют в средней части ядро (Рисунок 7а,б), в то время как у 75% пыльцевых зёрен с биполярным прорастанием ядро в это время находится еще внутри пыльцевого зерна (Рисунок 7в), у других оно находится в устье трубки (Рисунок 7г). В среднем путь, пройденный ядром в битубулярных зернах, был в десять раз меньше, чем в унитарных за то же время. При биполярном прорастании ядро выходило в более длинную трубку («ведущую трубку») во всех наблюдаемых случаях, но другим требованием было, чтобы ведущая трубка была как минимум в 1,5 раза длиннее второй трубки. Если две трубки имели почти одинаковую длину, ядро оставалось внутри зерна. Этот факт указывает на природу отсроченного выхода ядра: вероятно, цитоплазма, текущая в направлении второй трубки, затрудняет движение ядра в противоположном направлении. Длина второй трубки может отражать интенсивность этого движения.

Поскольку движение ядра необходимо для длительного роста в тканях спорофита и оплодотворения, в случае прорастания *in vivo* битубулярный паттерн может рассматриваться как недостаток, снижающий скорость оплодотворения. Однако можно было предположить, что биполярное прорастание помогает пыльце на более ранней стадии получать питательные вещества подобно тому, как это делают разветвляющиеся трубки зооидогамных семенных растений (Lora et al. 2016). В этом случае процент биполярного прорастания должен увеличиваться при переносе на менее питательную среду. Например, активация ветвления

гаусторий наблюдалась в гаметофите гинкго при снижении концентрации сахарозы в среде с  $2 \times 10^{-1}$  г/л до  $2 \times 10^{-3}$  г/л (Friedman 1987b). Мы проверили эту гипотезу для пыльцевых зёрен ели.

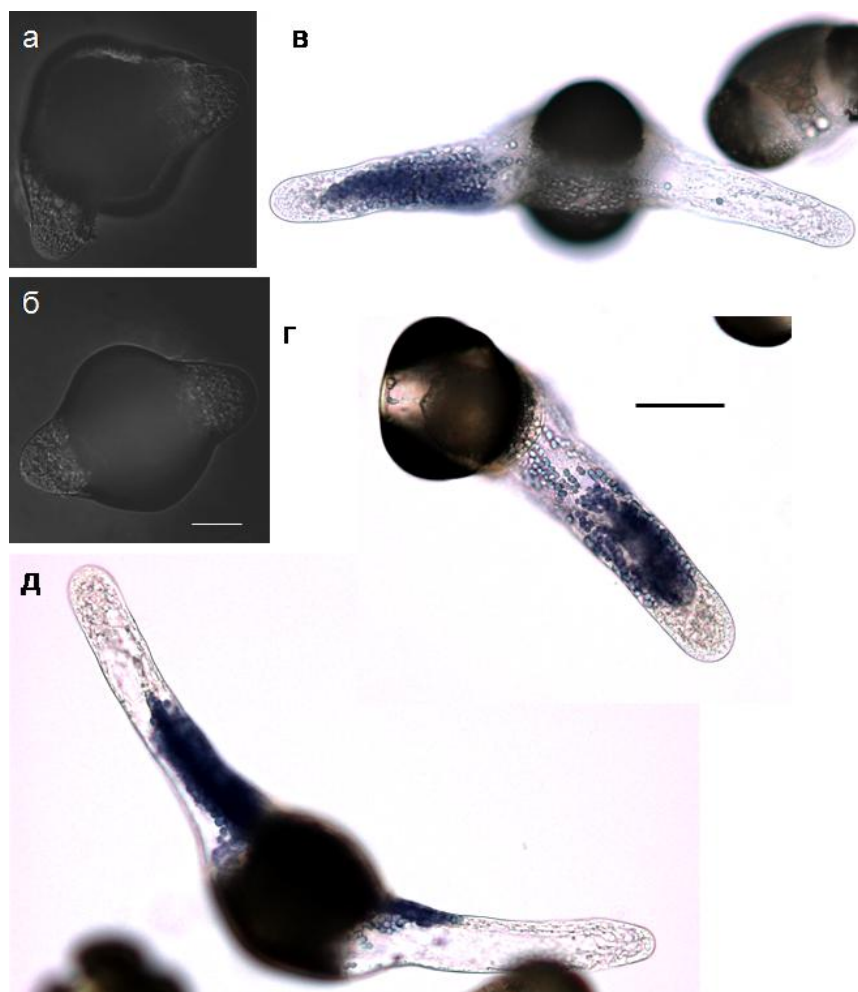


Рисунок 6. Пыльцевые зёрна и трубки *Picea pungens*. а, б – конфокальные изображения пыльцевых зерен после 9 часов инкубации. Два «носика» в биполярно прорастающих зернах появляются одновременно; в – распределение амилопластов (визуализировано с помощью окрашивания крахмала йодом) во время униполярного (г) или биполярного (в, д) прорастания после 20 часов инкубации; в, д – в ведущей трубке видна чистая зона, эта трубка содержит большую часть амилопластов, вторая трубка вакуолизована; г – единственная трубка имеет чистую зону, содержит все амилопласты, окружающие вегетативное ядро (отмечено звездочкой). Масштабная линейка – 30  $\mu\text{m}$  (а, б), 50  $\mu\text{m}$  (в-д).

Проращивание производили на среде трёх составов: без сахара, с низким содержанием сахара и с высоким содержанием сахара (оптимальная). Осмолярность сохранялась во всех случаях за счёт добавления маннита. Оказалось, что эффективность прорастания сильно снижается при снижении доступности сахарозы (Рисунок 8а), как и процент биполярного прорастания (Рисунок 8б): мы можем видеть, что среди трубок, растущих в среде с низким содержанием сахара, 95% являются одиночными трубками. Уровень прорастания на среде без сахара очень низкий (Рисунок 8а), битубулярных зёрен не наблюдали вовсе. Между тем, если бы предположение о трофической функции было бы верным, биполярное прорастание должно

было провоцироваться углеводным голоданием или, по крайней мере, оставаться на том же уровне (Fernando et al. 2010).

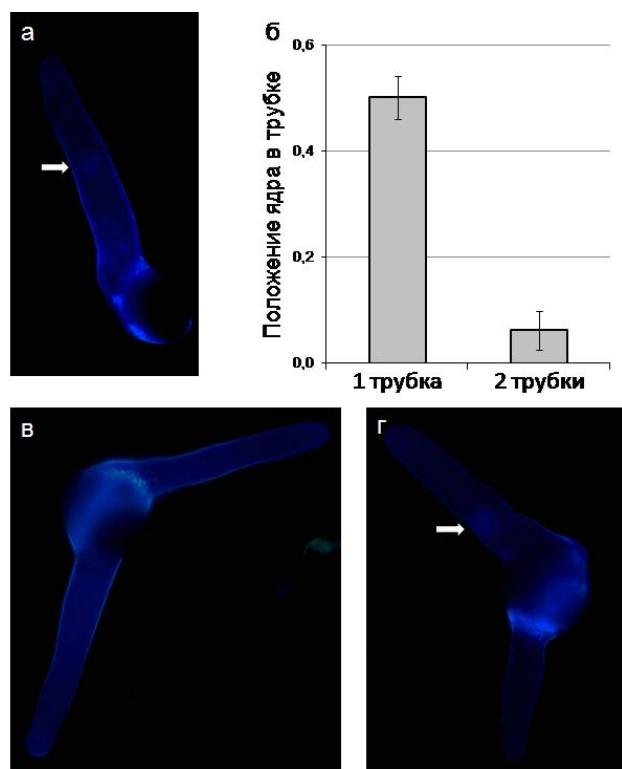


Рисунок 7. Движение ядра в трубке *Picea pungens*. Ядро клетки трубки (отмечено стрелками) выходит из зерна значительно раньше в одиночных трубках (а), чем в ведущих трубках биполярных зерен (в, г). 75% пыльцевых трубок в этих зёрнах ещё не содержат ядра после 21 ч инкубации (в, г) в то время как 100% одиночных трубок содержат ядро (а); б – относительное расстояние в трубке (0,5 = половина трубки), которое ядро прошло в одиночных трубках, в десять раз больше, чем в ведущих трубках биполярных зерен. Масштабная линейка – 50  $\mu\text{m}$ .

Альтернативная гипотеза состояла в том, что битубулярное прорастание является следствием отсутствия эффективных систем механической регуляции клеточной стенки, поскольку тургорное давление, как ненаправленная сила, действует одинаково во всех точках поверхности зерна. Для проверки этой гипотезы мы использовали два типа среды: изотоническую (в которой тургорное давление оптимально) и гипертоническую (в которой тургорное давление ниже). В обоих случаях содержание углеводов было одинаковым. В гипертонической среде уровень прорастания и процент биполярного прорастания были значительно ниже, чем в изотонической (Рисунок 8в, г).

Таким образом, вторая гипотеза, в отличие от первой, подтверждается результатами эксперимента: возможность появления двух трубок определяется балансом между тургорным давлением и жесткостью стенки. Чтобы лучше понять роль клеточной стенки в этом процессе, мы проанализировали морфологию пыльцевых зерен с обоими типами прорастания, уделяя особое внимание разрыву экзины и появлению трубки, а затем использовали активные формы кислорода, чтобы повлиять на механические свойства пыльцевой оболочки.

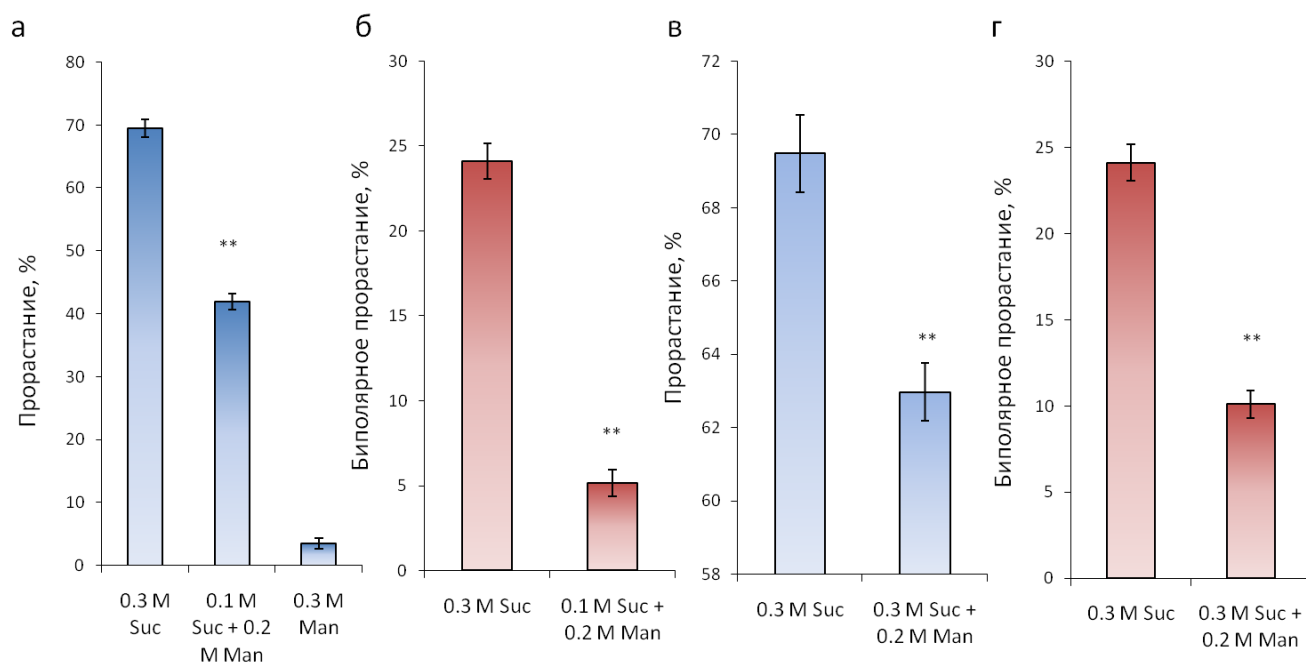


Рисунок 8. Влияние доступности питательных веществ и осмолярности на общее прорастание и биполярное прорастание. а, б – более низкое содержание сахарозы в среде прорастания при стандартной осмолярности снижает общую эффективность прорастания (а), а также процент биполярного прорастания среди проросших зёрен (б); в, г – более высокая осмолярность среды при стандартном содержании сахарозы оказывает тот же эффект на общее и биполярное прорастание соответственно. Процент биполярного прорастания, а также общая эффективность прорастания являются самыми высокими в оптимальных осмотических и трофических условиях.

С помощью сканирующей электронной микроскопии мы выявили морфологию, типичную для мешковых пыльцевых зерен: экзина сплошная, между воздушными мешками отчетливо видна область более тонкой экзины – лептома. Лептома имеет форму вытянутой борозды, причем эта борозда глубже в слабо гидратированных пыльцевых зернах (Рисунок 9а) и более уплощена в полностью гидратированных зернах (Рисунок 9б). В концевых частях лептомы видны расширения треугольной формы; здесь, как мы выяснили, чаще всего происходят разрывы на поверхности прорастающих зерен, часто два одновременно с двух сторон (Рисунок 9в). В некоторых случаях из двух разрывов образуются две трубки (Рисунок 9г). В других случаях разрывы могут удлиняться в сторону центральной части лептомы, образуя единую щель, из которой затем появляется одна трубка (Рисунок 9д). В некоторых зернах образуется только один разрыв, из него также выходит одна трубка (Рисунок 9е). Поскольку мы наблюдали, что появление одной или двух трубок зависит от слияния разрывов, мы предположили, что при снижении прочности оболочки процент биполярного прорастания изменится: будет больше сплошных разрывов и, соответственно, одиночных трубок, аналогично тому, как при снижении тургорного давления. В качестве фактора, изменяющего механические свойства клеточной стенки, мы выбрали гидроксильный радикал. Ранее было

установлено, что этот реагент локально размягчает оболочку пыльцевого зерна (главным образом, интину), разрезая сшивки между стеночными полимерами (Smirnova et al. 2013).

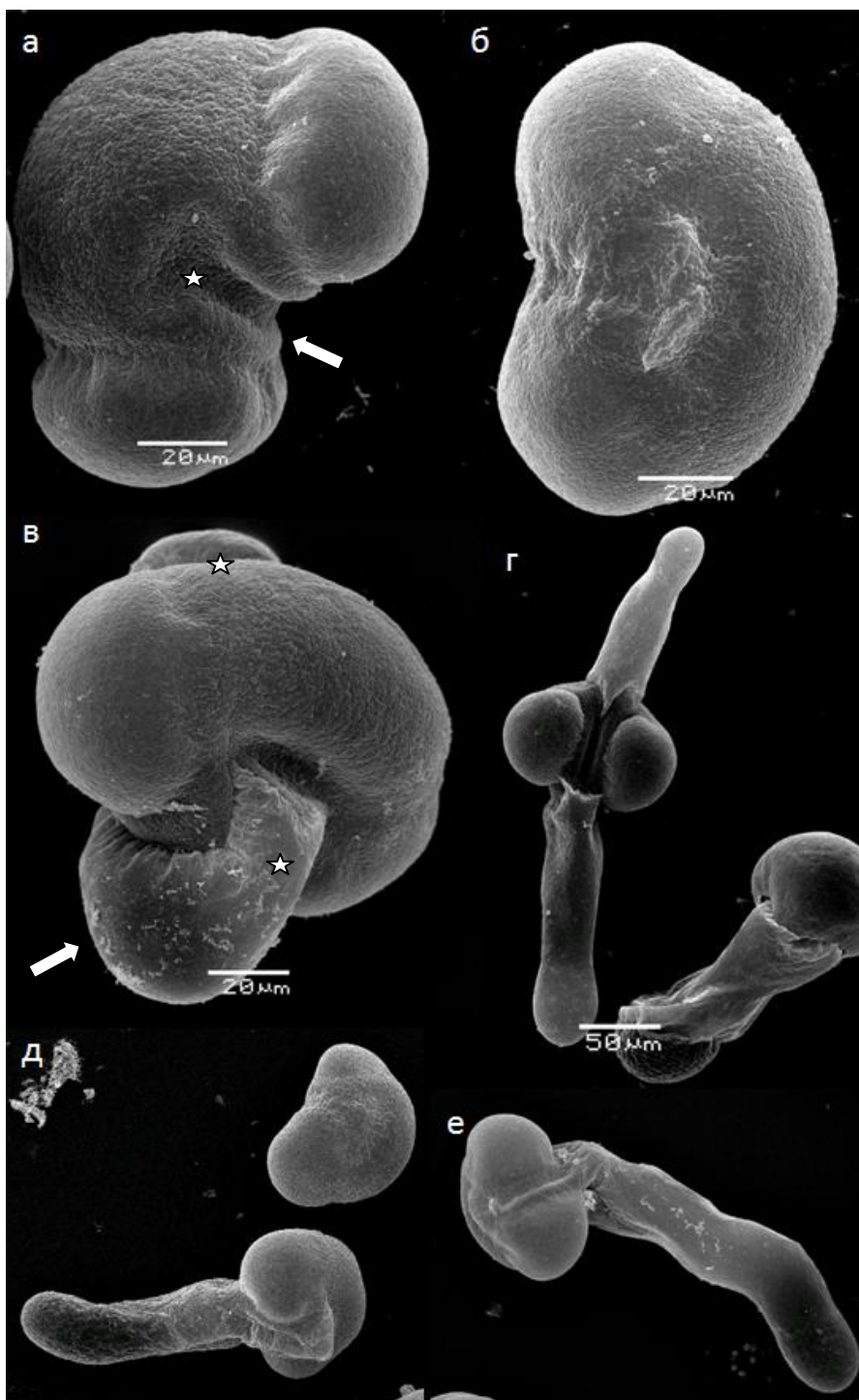


Рисунок 9. СЭМ прорастающих зерен пыльцы *Picea pungens*. Пыльцевые зерна: а – слабо гидратированное; б – гидратированное; в – прорастающее; г, е – проросшее с одной трубкой; д – с двумя трубками. а – между двумя мешками отчетливо видна борозда – лептома (отмечена стрелкой). Терминальная часть борозды образует тонкую зону (отмечена звездочкой), где экзина в большинстве случаев разрывается. Аналогичное расширение находится на противоположном конце; б – после гидратации борозда становится менее выраженной; в – разрывы образуются в конце борозды с одной или с обеих сторон (звездочки); г – у многих зерен разрывается вся борозда (стрелка) и из разрыва появляется одна трубка; д – во многих зернах два разрыва образуются на концах лептомы, и две трубки растут в разных направлениях; е – в некоторых зернах образуется только один разрыв, а выходит одна трубка.

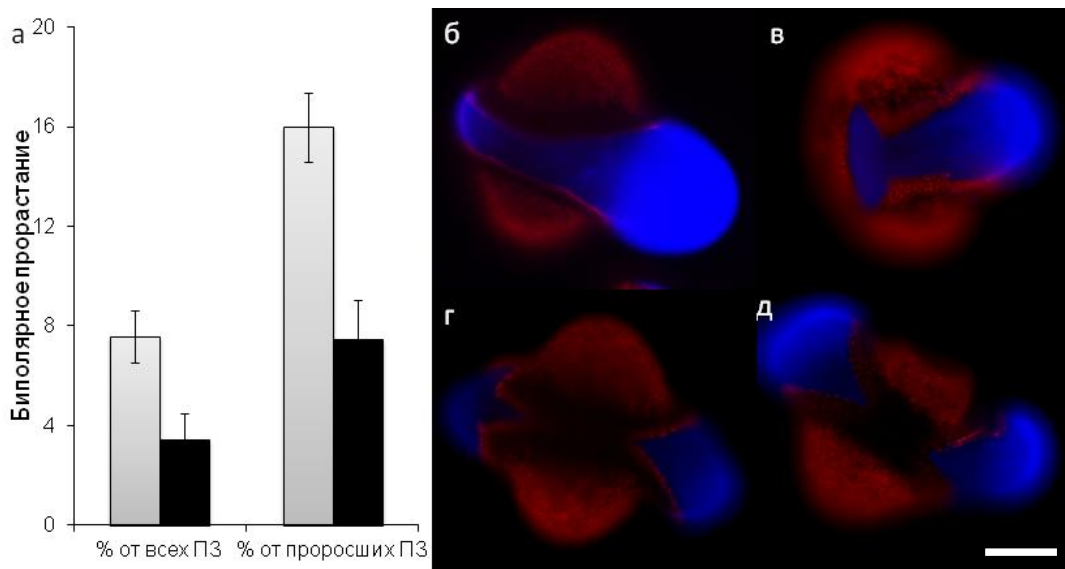


Рисунок 10. Влияние размягчения стенки на частоту биполярного прорастания. Обработка пыльцевых зерен смесью для продукции  $\bullet\text{OH}$  ( $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ) в течении 1 ч в 2 раза снижает процент биполярного прорастания. а – средний процент от общего числа зерен и от числа проросших зерен после 13 ч в контроле (белые столбики) и в суспензии с  $\bullet\text{OH}$  (черные); б-д – пыльцевые зерна с типичными разрывами экзины после 10-11 часов инкубации: один крупный разрыв приводит к появлению одной трубки (б, в), два разрыва приводят к биполярному прорастанию (г, д). Оба типа присутствуют в контрольных и опытных суспензиях, но после воздействия  $\bullet\text{OH}$  процент одиночных разрывов существенно возрастает, приводя к преобладанию униполярного прорастания. Экзина окрашена гидрофобным АФК-чувствительным красителем MitoSOX, интина – Tinopal. Масштабная линейка – 50  $\mu\text{m}$ .

Мы инкубировали пыльцевые зерна ели с компонентами реакции Фентона, в ходе которой продуцируется  $\bullet\text{OH}$ . Их добавляли к суспензии в момент, когда начинается формирование разрывов в экзине (6 часов). Время продукции радикала было ограниченным – 1 час, после чего пыльцу отмывали от смеси и помещали в чистую среду. Мы обнаружили, что размягчение стенки в этот критический период существенно снизило процент биполярного прорастания, не повлияв на общую эффективность прорастания ( $47\pm 4\%$  в контроле,  $44\pm 5\%$  в пробах с  $\bullet\text{OH}$  после 17 ч инкубации). Флуоресцентное окрашивание показало, что в суспензии после воздействия гидроксил-радикала большинство прорастающих зерен имело крупные одиночные разрывы в экзине (Рисунок 10), в то время как в контрольных пробах довольно часто встречались зёрна с двумя небольшими отверстиями (Breugina et al. 2019).

Можно заключить, что основная причина битубулярного прорастания заключается в отсутствии четко установленного места появления трубки и, следовательно, в возможности разрыва экзины в разных местах без жесткого контроля со стороны стеночных ферментов. Это наглядно демонстрирует отличие пыльцы ели и других видов хвойных с биполярным прорастанием от большинства цветковых растений с четко оформленными апертурами, для прорастания которых не требуется разрыв экзины (Stone et al. 2004; Hesse et al. 2009). Полученные данные также показывают значимость АФК (конкретно, гидроксильного радикала)

для определения паттерна прорастания, в данном случае через посредство механических факторов. Значимость других АФК для битубулярного прорастания будет рассмотрена в следующем разделе.

#### 1.4 Влияние экзогенных АФК на прорастание мужского гаметофита

Поскольку реагенты, снижающие продукцию АФК (ДФИ), а также тушители экстраклеточных АФК (Mn-TMPP, СОД) подавляли прорастание, мы предположили, что добавление экзогенных АФК может, напротив, его стимулировать.

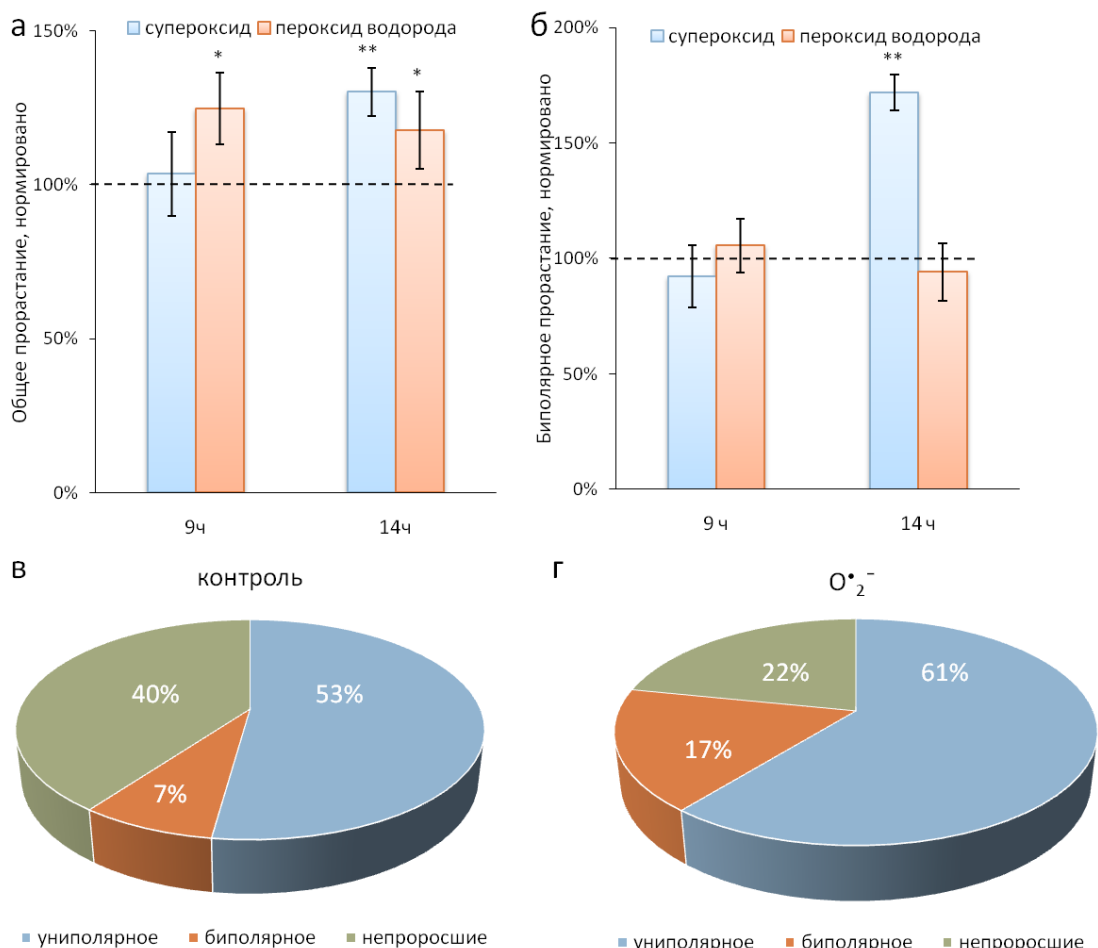


Рисунок 11. Стимуляция прорастания пыльцы *Picea pungens in vitro*  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ) и  $O_2^{\bullet -}$ , сгенерированным в системе ксантин/ксантинооксидаза: а, б – общая эффективность прорастания (а) и доля прорастания биполярной пыльцы (б) через 9 и 14 часов инкубации (каждый результат по эффективности прорастания нормирован к контролю (100%), отмеченному пунктирной линией, поскольку опыты проводились в разное время и контроли различались). Приведены средние значения и стандартные ошибки, значимость указана по критерию Стьюдента: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ ; в, г – доля униполярного и биполярного прорастания после 14 ч инкубации в контроле (в) и в среде с системой генерации супероксид радикала (г).

Чтобы проверить, как пыльцевые зерна реагируют на АФК, были взяты две точки, где процент прорастания в контроле достаточно низкий, с целью выявления возможного стимулирующего эффекта. Мы обнаружили, что пыльца ели чувствительна как к  $H_2O_2$ , так и к

$O_2^{\cdot-}$ , но стимулирующее действие последнего было более выраженным, хотя и проявлялось позже (достоверные изменения отмечались после 14 ч) (Рисунок 11а). При подсчете прорастания учитывали не только его общую эффективность, но и долю биполярного прорастания среди всех проросших зёрен. Воздействие пероксида водорода не изменило соотношение двойных и одиночных трубок (Рисунок 11б), в то время как в среде с  $O_2^{\cdot-}$  процент битубулярного прорастания увеличился более чем вдвое (Рисунок 11 б-г). Поскольку ранее было установлено, что биполярное прорастание зависит от условий инкубации (процент максимален в оптимальных условиях (Рисунок 8)), данные о стимуляции битубулярного прорастания показывают, что среда для прорастания пыльцы с  $O_2^{\cdot-}$  является «более оптимальной» по сравнению со стандартной средой без АФК. Выявленный эффект был объяснен позднее, в ходе исследования АФК в составе опылительных капель (См. VI.6. Содержание АФК в опылительных каплях хвойных растений из разных филогенетических групп).

### **1.5 АФК и жирнокислотный состав пыльцевых зёрен**

В этой части работы, выполненной в соавторстве с биохимиками, мы впервые изучали влияние экзогенного пероксида водорода на жирнокислотный состав прорастающей пыльцы ели (а также табака, но там изменений выявить не удалось). Мы использовали сухую пыльцу в качестве контроля и 2 временные точки – 9 и 14 часов инкубации – для наблюдения и взятия проб на ЖК (или чет такое, ну брали пыльцу после n часов и как-то из нее ЖК тянули) одну точку как контрольную (сухая пыльца) и две временные точки для наблюдения за процессом прорастания пыльцы ели. Обе точки были выбраны в соответствии с нашими наблюдениями и соответствовали определенным физиологическим процессам. Через 9 ч в экзине образуются один или два больших разрыва, через которые выходит пыльцевая трубка (трубки) (Рисунок 2). Таким образом, девять часов можно считать точкой прорастания (запуска полярного роста). К 14 часам пыльцевая трубка (в среднем) достигает в длину диаметра зерна – этот момент условно соответствует процессу поддержания полярного роста.

В первую очередь мы сравнили жирнокислотный состав сухой пыльцы у наших двух основных объектов (табака и ели). Пыльца лилии, которая, хотя прорастает *in vitro* довольно плохо, а также имеет относительно слабую реакцию на пероксид водорода (что будет подробно описано далее), также была включена в исследование на стадии сухого материала с целью сравнения состава, поскольку является представителем другой крупной систематической группы цветковых растений (Breugina et al. 2023b).

Пыльцевые зерна содержат несколько липидных структур, которые играют ключевую роль в их развитии. Толстая наружная оболочка пыльцы, экзина, в значительной степени синтезируется из ациллипидов и предшественников фенилпропаноидов, которые вместе



образуют исключительно стабильный биополимер спорополленин (Shi et al. 2015; Li et al. 2016). Дополнительный внеклеточный липидный матрикс, полленкит (у Brassicaceae – *трифина*), покрывает неровности экзины и выполняет функции, связанные с распространением пыльцы и распознаванием в системе «пыльцы-рыльце» (Piffanelli et al. 1998). У голосеменных полленкит не образуется (даже у *Gnetum gnemon* с его относительно продвинутой репродуктивной системой, включающей двойное оплодотворение (Hesse 1980; Carmichael and Friedman 1996)).

Липиды необходимы не только для защиты пыльцевого зерна на стадии высыхания и опыления, но также для адгезии пыльцы на рыльце, последующего прорастания и реализации сигнальных процессов (Pacini and Hesse 2005; Firon et al. 2012; Ischebeck 2016). У покрытосеменных предшественники спорополленина и полленкита синтезируются в тапетуме — специализированном слое питательных клеток внутри пыльника — под контролем спорофитного генома, но на разных стадиях развития (Li et al. 2016). Предшественники спорополленина экспортируются из клеток тапетума и откладываются на поверхности пыльцевого зерна (Ischebeck 2016). Позже, во время развития пыльцы, клетки тапетума разрушаются, высвобождая накопленные липиды и белки; эти вещества покрывают экзину и образуют полленкит. В последний период развития пыльца также накапливает клеточные компоненты, в том числе полярные липиды в виде плотно упакованных мембран и нейтральные липиды, такие как триацилглицериды (ТАГ) в липидных каплях (масляных тельцах) (Ischebeck 2016). Синтез внутриклеточных липидов в пыльцевом зерне контролируется гаметофитным геномом (Piffanelli et al. 1998). Следовательно, зрелая пыльца содержит два типа липидов: липиды-компоненты полленкита, имеющие спорофитное происхождение, и внутриклеточные и мембранные липиды, синтезированные в гаметофите (Ischebeck 2016). При прорастании соотношение этих групп меняется: увеличивается доля мембранных липидов, которые требуются в больших количествах для роста пыльцевой трубки (Ischebeck 2016). У покрытосеменных растений углеводы поглощаются прорастающим мужским гаметофитом из апопласта тканей пестика и метаболизируются в липиды (Mellema et al. 2002). В пыльце табака количество белков, участвующих в синтезе жирных кислот, увеличивается по мере роста трубки, пока не достигнет ~1% всех белков (Ischebeck et al. 2014). Однако изменение жирнокислотного состава мужского гаметофита при прорастании не изучалось. Важными вопросами, которые мы подняли в этом исследовании, были (а) аналогична ли динамика жирнокислотного состава в пыльце хвойных и цветковых растений; и (б) могут ли АФК, стимулирующие прорастание, влиять на состав жирных кислот прорастающей пыльцы?

Для сухой пыльцы набор основных жирных кислот был вполне типичен для пыльцы представителей сосновых: кислоты 16:0, 9-18:1 и 9,12-18:2 (

Таблица 1). Для сравнения, основные компоненты у *Pseudotsuga* были 16:0, 9-18:1 и 9,12-18:2, тогда как у *Pinus* это были 16:0, 18:0, 9-18:1 и 9,12-18:2 кислоты (Ching and Ching 1962). При сравнительном анализе липидов и жирных кислот пяти видов сосны, гинкго и ольхи были обнаружены сходные закономерности: доля насыщенных 16:0 кислот и моноенов 9-18:1 во всех видах *Pinus* была примерно в два раза выше, чем в пыльце покрытосеменного растения (*Alnus japonica*); 9,12,15-18:3, напротив, была минорной в пыльце всех видов сосны (1-11%), а у ольхи на её долю приходилось более 26% (Chung and Lee 1977).

Из менее представленных ЖК в пыльце *Picea* мы обнаружили 5,9,12-18:3 – одну из  $\Delta 5$  кислот, которая ранее была обнаружена в пыльце других голосеменных растений, в т.ч. *Pinus yunnanensis* (Mei et al. 2021) и *Cycas revoluta* (Sidorov et al. 2016), причем в первом случае ее содержание уменьшалось при хранении и стерилизации параллельно с потерей качества пыльцы (Mei et al. 2021). Для липидов семян голосеменных растений также характерно наличие своеобразных жирных кислот с  $\Delta 5$ -этиленовой связью, редко встречающихся у покрытосеменных (Wolff et al. 1997). Половину из таких ЖК, описанных ранее, мы обнаружили в пыльце ели, которая этим явно отличалась от пыльцы табака и лилии. Покрытосеменные, за некоторыми исключениями (например, представителей Ranunculaceae), утратили способность синтезировать такие ЖК. Обсуждение данных по жирным кислотам в пыльце табака и лилии подробно описаны в оригинальной публикации (Breygina et al. 2023b).

Таблица 1 Жирнокислотный состав пыльцы ели, табака и лилии (мас. % от суммы метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК)).

№	ЖК	Пыльца ели	Табак			Лилия		
			Целая	Отмытая	ПК	Целая	Отмытая	ПК
1	10:0	-	0.01±0.01	-	0.08±0.02 $\beta$	trace <sup>f</sup>	-	0.19±0.01 $\alpha$
2	12:0	0.10±0.01A	0.03±0.01b	0.06±0.02B	0.29±0.04 $\beta$	0.22±0.08a	0.04±0.01B	2.97±0.04 $\alpha$
3	13:0	-	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01 $\alpha$	trace	-	0.03±0.01 $\alpha$
4	14:0	0.53±0.06A	0.49±0.05b	0.42±0.07A	1.22±0.14 $\beta$	0.75±0.08a	0.44±0.08A	5.56±0.27 $\alpha$
5	15:0	0.30±0.03A	0.36±0.05a	0.29±0.06A	0.26±0.02 $\alpha$	0.10±0.01b	0.08±0.01B	0.28±0.01 $\alpha$
6	16:0	23.12±1.57C	24.91±0.10b	26.93±0.76B	11.65±1.12 $\beta$	30.25±1.09a	37.35±3.00A	23.68±1.01 $\alpha$
7	7-16:1	0.57±0.05A	0.53±0.14a	0.42±0.06B	0.50±0.06 $\alpha$	0.25±0.01b	0.17±0.05C	0.55±0.01 $\alpha$
8	9-16:1	0.23±0.01A	0.14±0.01b	0.12±0.01C	0.13±0.03 $\beta$	0.23±0.01a	0.19±0.01B	0.25±0.02 $\alpha$
9	14-16:1	0.44±0.04A	0.07±0.02a	0.02±0.01B	0.12±0.01 $\alpha$	0.01±0.01b	-	0.04±0.01 $\beta$
10	7,10-16:2	0.01±0.01A	trace	0.03±0.01A	-	-	-	-
11	10-17:1	0.09±0.02A	-	-	-	0.02±0.01	0.01±0.01B	0.07±0.03

12	18:0	3.48±0.26A	1.75±0.23b	1.68±0.17C	4.82±0.07β	2.89±0.37a	2.61±0.14B	11.98±0.90α
13	9-18:1	21.47±0.94A	4.32±0.83b	1.36±0.09C	11.82±0.91β	7.68±0.53a	4.75±0.26B	25.11±1.18α
14	11-18:1	1.21±0.28A	0.83±0.03a	0.86±0.03B	0.61±0.09β	0.68±0.19a	0.65±0.05C	0.91±0.11α
15	5,9-18:2	0.33±0.10	-	-	-	-	-	-
16	9,12-18:2	33.79±3.74B	47.47±1.80a	54.10±0.50A	17.46±1.54α	23.97±0.68b	24.04±1.44C	10.99±0.07β
17	10,13-18:2	0.05±0.01	0.07±0.02a	-	0.79±0.10	0.04±0.04a	-	trace
18	10,12-18:2	0.58±0.09A	0.60±0.75	0.36±0.06A	-	trace	-	0.13±0.01
19	9,11-18:2	0.73±0.09	-	-	-	-	-	-
20	5,9,12-18:3	3.56±0.49	-	-	-	-	-	-
21	9,12,15-18:3	2.53±0.28C	10.68±1.64b	10.97±0.51B	6.92±0.39α	27.69±0.80a	24.80±0.84A	5.79±0.42α
22	9,11,13-18:3	-	trace	0.02±0.02A	0.08±0.01α	trace	0.02±0.01A	0.13±0.05α
23	9,11,13,15-18:4	-	trace	-	0.02±0.01	-	-	-
24	19:0	0.26±0.16A	0.13±0.01a	0.10±0.03A	0.06±0.01β	0.07±0.01b	0.04±0.02B	0.13±0.02α
25	20:0	2.71±0.15A	0.92±0.21b	0.30±0.05B	2.70±0.14α	2.40±0.41a	2.57±0.34A	2.83±0.17α
26	11-20:1	0.48±0.05B	0.25±0.15b	-	0.38±0.01β	0.71±0.02a	0.62±0.01A	1.19±0.05α
28	11,14-20:2	0.36±0.06A	0.37±0.03a	-	1.11±0.14α	0.15±0.02b	0.15±0.03B	0.25±0.08β
29	5,11,14-20:3	1.05±0.14	-	-	-	-	-	-
30	8,11,14-20:3	0.01±0.01	-	-	-	-	-	-
31	11,14,17-20:3	-	0.12±0.09a	-	0.35±0.02α	0.03±0.01a	0.02±0.01	0.08±0.02β
32	21:0	-	trace	0.05±0.03A	0.77±0.09α	0.10±0.05	0.09±0.03A	0.18±0.03β
33	22:0	0.86±0.14A	3.77±0.73a	0.87±0.09A	29.77±1.81α	0.87±0.31b	0.89±0.19A	3.71±0.16β
34	13-22:1	-	-	-	-	trace	-	0.14±0.01
35	13,16-22:2	-	0.20±0.05	-	0.75±0.08α	trace	-	0.11±0.01β
36	23:0	-	0.16±0.01a	0.08±0.03A	1.40±0.16α	0.14±0.01a	0.06±0.01A	0.47±0.08β
37	24:0	0.76±0.12A	1.59±0.40a	0.93±0.08A	5.29±0.55α	0.42±0.11b	0.35±0.07B	1.34±0.07β
38	25:0	0.07±0.03A	0.09±0.06a	0.01±0.01B	0.13±0.01α	0.05±0.05a	0.02±0.01B	0.09±0.01β
39	26:0	0.16±0.03A	0.13±0.07a	0.01±0.01C	0.47±0.08α	0.08±0.06a	0.04±0.01B	0.54±0.04α
40	27:0	-	-	-	-	trace	-	0.01±0.01
41	28:0	0.15±0.12	0.01±0.01a	-	0.03±0.01β	0.14±0.24a	-	0.23±0.05α
42	30:0	0.01±0.01	-	-	-	0.02±0.01	-	0.04±0.01

Таблица 2 Жирнокислотный состав пылицы табака и ели при проращивании с и без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (мас. % от суммы МЭЖК).

№	ЖК	Вид	Стан.среда			Стан.среда+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
			Сухая	Проращивание	Рост ПТ	Проращивание	Рост ПТ
1	10:0	Ель	-	-	-	-	-
		Табак	-	0.03±0.03a	-	0.01±0.01	-
2	12:0	Ель	0.10±0.01a	0.06±0.04a	0.05±0.02b	0.01±0.01A	0.04±0.02A
		Табак	0.06±0.02a	0.04±0.01a	0.01±0.01b	0.06±0.04A	0.03±0.01A
3	13:0	Ель	-	-	-	-	-
		Табак	0.01±0.01a	0.01±0.01a	-	-	-
4	14:0	Ель	0.53±0.06a	0.67±0.26a	0.60±0.19a	0.34±0.06A	0.40±0.06A
		Табак	0.42±0.07b	0.41±0.04b	0.32±0.04a	0.42±0.18A	0.36±0.03A
5	15:0	Ель	0.30±0.03a	0.50±0.23a	0.40±0.15a	0.21±0.02A*	0.22±0.05A
		Табак	0.29±0.06a	0.29±0.03a	0.24±0.02a	0.29±0.07A	0.27±0.03A
6	16:0	Ель	23.12±1.57a	23.13±1.18a	23.21±1.21a	21.35±0.56A	20.31±2.80A
		Табак	26.93±0.76a	27.62±1.25a	25.90±1.59a	27.24±0.69A	26.75±0.37A
7	7-16:1	Ель	0.57±0.05a	0.93±0.51a	0.80±0.39a	0.37±0.07A	0.39±0.09A
		Табак	0.42±0.06a	0.87±0.48a	0.30±0.01b	0.39±0.07A	0.36±0.05A
8	9-16:1	Ель	0.23±0.01ab	0.20±0.02b	0.25±0.01a	0.19±0.01A	0.21±0.02A
		Табак	0.12±0.01a	0.12±0.01a	0.12±0.01a	0.13±0.03A	0.14±0.03A
9	14-16:1	Ель	0.44±0.04a	0.42±0.06a	0.40±0.02a	0.36±0.02A	0.37±0.01A
		Табак	0.02±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.01A	0.03±0.01A
10	7,10-16:2	Ель	0.01±0.01b	0.10±0.01a	0.03±0.01b	0.04±0.02A*	0.01±0.01A
		Табак	0.03±0.01a	0.03±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.01B	0.04±0.01A
11	10-17:1	Ель	0.09±0.02a	0.18±0.11a	0.13±0.04a	0.02±0.01B*	0.06±0.02A•
		Табак	-	-	-	-	-
12	18:0	Ель	3.48±0.26a	4.33±0.45	3.41±0.17a	3.36±0.07A*	3.34±0.84A
		Табак	1.68±0.17a	1.72±0.20a	1.96±0.16a	3.24±2.22A	1.71±0.11A
13	9-18:1	Ель	21.47±0.94a	19.64±1.03	21.23±0.76a	22.47±0.56A*	21.77±0.30A
		Табак	1.36±0.09a	1.25±0.16a	1.45±0.06a	2.21±1.29A	1.37±0.09A
14	11-18:1	Ель	1.21±0.28a	1.10±0.20a	1.29±0.07a	0.89±0.06A	1.01±0.33A

		Табак	0.86±0.03a	0.83±0.07a	0.87±0.03a	1.33±0.95A	0.86±0.06A
15	5,9-18:2	Ель	0.33±0.10a	0.53±0.16a	0.43±0.04a	0.46±0.01A	0.52±0.09A
		Табак	-	-	-	-	-
16	9,12-18:2	Ель	33.79±3.74a	31.32±2.28a	34.15±1.30a	35.60±0.53A*	35.31±1.60A
		Табак	54.10±0.50a	53.29±0.28a	54.66±1.53a	50.97±5.00A	53.92±1.09A
17	10,13-18:2	Ель	0.05±0.01a	0.11±0.01b	0.16±0.02a	0.12±0.02A	0.10±0.01A•
		Табак	-	0.07±0.04b	0.15±0.01a	0.10±0.03B	0.24±0.08A
18	10,12-18:2	Ель	0.58±0.39ab	0.50±0.21a	0.19±0.07b	0.20±0.05A*	0.21±0.04A
		Табак	0.36±0.06a	0.36±0.05a	0.39±0.10a	1.10±1.01A	0.46±0.06A
19	9,11-18:2	Ель	0.73±0.41a	1.09±0.54a	0.02±0.01b	0.17±0.03A*	0.02±0.01B
		Табак	-	-	-	-	-
20	5,9,12-18:3	Ель	3.56±0.49a	3.56±0.61a	3.73±0.15a	3.93±0.21A	4.26±0.77A
		Табак	-	-	-	-	-
21	9,12,15-18:3	Ель	2.53±0.28a	2.55±0.38a	2.76±0.11a	2.74±0.16A	3.06±0.33A
		Табак	10.97±0.51a	11.01±0.40a	11.04±0.35a	10.02±0.85A	10.92±0.26A
22	9,11,13-18:3	Ель	-	-	-	-	-
		Табак	0.02±0.02a	0.05±0.01a	0.04±0.02a	0.09±0.02A	0.07±0.02A
24	19:0	Ель	0.26±0.16a	0.23±0.07a	0.25±0.11a	0.13±0.01B*	0.21±0.04A
		Табак	0.10±0.03a	0.11±0.02a	0.11±0.01a	0.11±0.01A	0.13±0.02A
25	20:0	Ель	2.71±0.15a	3.67±0.09a	2.63±0.45b	2.85±0.11A*	2.80±0.54A
		Табак	0.30±0.05a	0.30±0.06a	0.32±0.03a	0.33±0.08A	0.29±0.04A
26	11-20:1	Ель	0.48±0.05b	0.63±0.14ab	0.65±0.02a	0.79±0.06A	0.49±0.12B•
		Табак	-	-	-	-	-
27	6,11-20:2	Ель	-	-	0.04±0.01	0.06±0.01A	0.11±0.03A•
		Табак	-	-	-	-	-
28	11,14-20:2	Ель	0.36±0.06a	0.46±0.13a	0.39±0.09a	0.45±0.05A	0.42±0.04A
		Табак	-	-	0.05±0.01	0.06±0.02A	-
29	5,11,14-20:3	Ель	1.05±0.14a	0.83±0.05b	1.05±0.09a	0.91±0.61A	1.16±0.09A
		Табак	-	-	-	-	-
30	8,11,14-20:3	Ель	0.01±0.01c	0.08±0.02b	0.19±0.01a	0.06±0.01B	0.15±0.01A•

		Табак	-	-	-	-	-
		Ель	-	-	-	-	-
32	21:0	Табак	0.05±0.03a	0.04±0.01a	0.03±0.01a	0.03±0.01A	0.04±0.02A
		Ель	0.86±0.14a	1.20±0.51a	0.59±0.13a	0.68±0.06A	0.88±0.24A
33	22:0	Табак	0.87±0.09a	0.83±0.14a	0.93±0.03a	0.87±0.01A	1.01±0.26A
		Ель	-	-	-	-	-
36	23:0	Табак	0.08±0.03a	0.06±0.02a	0.07±0.03a	0.05±0.02A	0.03±0.01A
		Ель	0.76±0.12a	1.11±0.49a	0.66±0.09a	0.78±0.07A	1.39±0.79A
37	24:0	Табак	0.93±0.08a	0.61±0.35a	0.99±0.09a	0.91±0.18A	0.97±0.22A
		Ель	0.07±0.03a	0.16±0.07a	0.02±0.01b	0.08±0.01A	0.13±0.08A•
38	25:0	Табак	0.01±0.01a	0.01±0.01a	0.01±0.01a	-	-
		Ель	0.16±0.03a	0.24±0.08a	0.19±0.07a	0.15±0.05A	0.28±0.14A
39	26:0	Табак	0.01±0.01a	0.02±0.01a	-	-	-
		Ель	0.15±0.12a	0.47±0.40a	0.10±0.04a	0.22±0.02A	0.34±0.20A
41	28:0	Табак	-	-	-	-	-
		Ель	0.01±0.01	-	-	0.01±0.01A	0.03±0.01A
42	30:0	Табак	-	-	-	-	-

Данные представлены в таблицах и на графике в виде среднего ± SEM. Статистический анализ был выполнен с использованием одностороннего ANOVA с последующим апостериорным анализом с использованием честной значимой разницы Тьюки (HSD) для неравных N тестов. Различные буквы и символы показывают существенно разные значения. Средние значения считались значительно отличающимися при  $P < 0,05$ . Анализ проводили отдельно для среды, среды+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и стадии прорастания или роста.

При прорастании и росте пыльцы ели в стандартной среде культивирования достоверных различий по содержанию основных жирных кислот не зафиксировано, достоверно выше только содержание 20:0 в момент прорастания (9 ч). Выявлены достоверные различия в содержании минорных кислот: 12:0, 9-16:1, 9,11-18:2, 11-20:1, 5,11,14-20:3, 8,11,14-20:3, 25:0 кислот (Таблица 2). Кроме того, в растущих пыльцевых трубках зарегистрировано присутствие цис-6,11-эйкозодиеновой кислоты (6.11-20:2); при прорастании и росте мы не обнаружили мелиссовой (30:0) кислоты, которая была в сухой пыльце.

При добавлении пероксида водорода в среду культивирования жирнокислотный состав липидов пыльцы ели достоверно менялся. Так, среди основных жирных кислот значительно уменьшилась доля насыщенных 18:0 и 20:0 и увеличилось содержание ненасыщенных 9-18:1 и 9,12-18:2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> значительно снизил содержание 15:0, 7,10-16:2, 10-17:1, 10,12-

октадекадиеновой (*транс*, *цис*-10,12-18:2), 9,11-18:2, 19:0 кислот. Зарегистрированы и качественные изменения: в образцах, обработанных пероксидом, обнаружены 6,11-20:2 и 30:0 (Таблица 2). При этом все изменения, вызванные H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не оказали существенного влияния на индекс ненасыщенности, который составил 1,123 и 1,214 для контрольного и опытного образцов соответственно.

При добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среду культивирования в процессе роста пыльцевых трубок изменения касались только минорных жирных кислот. Относительное содержание 10-17:1, 10,13-18:2, 11-20:1 и 8,11,14-20:3 кислот значительно уменьшилось, в то время как доля 6,11-20:2 и 25:0 значительно увеличились. Также H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> инициировал появление 30:0, которой не было в контрольных образцах (Таблица 2). Индекс ненасыщенности на этой стадии также существенно не изменился (1,188 в контроле и 1,236 в опыте).

Пыльца табака прорастает гораздо быстрее, чем пыльца ели, поэтому соответствующие временные точки были сдвинуты: 1 ч для прорастания и 3 ч для роста трубок. Достоверных различий в качественном или количественном содержании основных и минорных жирных кислот между всеми временными точками, а также между контрольной и обработанной пылью обнаружено не было (Таблица 2). Влияние удалось обнаружить только на уровне суперминорных жирных кислот<sup>2</sup>: суммарно такие изменения затронули не более 1% от общего липидного состава.

Изучая динамику жирнокислотного состава в ходе прорастания пыльцы, а также влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на жирнокислотный состав, мы обнаружили принципиальные различия между пылью ели и табака. Основное отличие состояло в том, что жирнокислотный состав пыльцы табака как в контрольных, так и в обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> образцах был абсолютно стабильным. В то же время профиль жирных кислот в пыльце ели менялся как в контрольных образцах, так и при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации, стимулировавшей прорастание. Среди основных жирных кислот значительно уменьшилось относительное количество насыщенных и увеличилось содержание ненасыщенных жирных кислот. Увеличение доли ненасыщенных жирных кислот хорошо согласуется с увеличением скорости прорастания – стимуляция всех синтетических процессов, по-видимому, затрагивает и метаболизм липидов, включая десатурацию жирных кислот. Что касается стабильности жирнокислотного состава пыльцы табака, то ее спекулятивно можно считать эволюционным приобретением, хотя это утверждение требует дальнейших исследований. Далее в этой главе мы рассмотрим вполне явные эффекты пероксида водорода в той же или на порядок более низкой концентрации, чем примененная здесь.

---

<sup>2</sup> 10:0 регистрировалась только на стадии прорастания, 13:0 отсутствовала при прорастании в суспензиях, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и при росте трубок, 10,13-18:2 отсутствовала в сухой пыли и проявлялась при прорастании и росте во всех образцах, 11,14-20:2 была зафиксирована при прорастании пыльцы с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и при росте в контрольной среде, 25:0 отсутствовала при прорастании пыльцы и росте трубок с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 26:0 присутствовала только в сухой пыли и при стандартном прорастании.

## III.2. Начальные этапы прорастания у табака

Значение эндогенных АФК для прорастания пыльцы покрытосеменных растений было в общих чертах описано на табаке и киви (Смирнова et al. 2009; Speranza et al. 2012), многие параметры сходны с таковыми у ели: оказалось, что эндогенные АФК необходимы для прорастания и продуцируются преимущественно НАДФН-оксидазой на плазмалемме, а также в митохондриях. Локализованы внеклеточные АФК преимущественно в апертурных областях интины, они также выделяются в окружающую среду (как и у ели, см. 1.1 Выделение АФК во внеклеточную среду пыльцой ели). Экзогенный пероксид водорода, однако, действовал иначе: низкие концентрации стимулировали, а высокие ингибировали прорастание табака (Smirnova et al. 2013). Подробнее эти данные рассмотрены в Обзоре литературы.

Неизученным оставался механизм действия экзогенных АФК. Чтобы выявить возможные механизмы ответа на пероксид водорода, мы изучили изменения протеома пыльцы табака, которая подвергалась действиям стимулирующей концентрации  $H_2O_2$  на начальном этапе прорастания (100  $\mu M$   $H_2O_2$ , 30 минут) (Breugina et al. 2021b). С помощью безметочной квантификации нам удалось идентифицировать 1540 белков (Рисунок 12).

Чтобы повысить точность анализа, мы сконцентрировали внимание на белках, которые были идентифицированы по крайней мере в двух биологических повторностях по минимум 2 уникальным пептидам; в этом случае речь шла о 733 белках. Из них 20 относились к группе дифференциально представленных белков (ДПБ), 50 были уникальны для проб, обработанных пероксидом, и 4 для контрольных суспензий (Рисунок 12, Таблица 3). Среди ДПБ, 11 в присутствии пероксида накапливались в больших количествах, 9 – в меньших. Проведенный анализ GO (Gene ontology enrichment) был сделан для всех групп, и наиболее информативные результаты были получены для уникальных белков в обработанной пыльце.

Протеом прорастающей пыльцы покрытосеменных растений, по данным литературы, включает 3 части: пресинтезированные в процессе созревания пыльцы, транскрибируемые в процессе активации пыльцы из пресинтезированных мРНК и транскрибируемые *de novo* (Holmes-Davis et al. 2005; Noir et al. 2005; Dai et al. 2006; Zou et al. 2009). Давая АФК-сигнал в период активации пыльцы, мы предполагали повлиять на вторую и третью группы, т.е. увидеть активацию трансляции определенных мРНК, которые в контроле могут быть запущены позже, и транскрипции генов, вовлеченных в ответ на АФК-сигнал.

Белки были сгруппированы по биологическим процессам, клеточным компонентам и молекулярной функции. Мы обнаружили, что среди «уникальных» белков в присутствии 100  $\mu M$   $H_2O_2$  были представлены три основных группы биологических процессов: метаболизм тРНК, метаболизм органических кислот, аминокислотилирование тРНК (Рисунок 12). По крайней мере, две из этих групп входят аппарат белкового синтеза, что указывает на его существенную



стимуляцию в присутствии АФК. Метаболизм органических кислот является важной частью синтетических процессов, таких, как перестройка углеводных скелетов и синтез аминокислот.

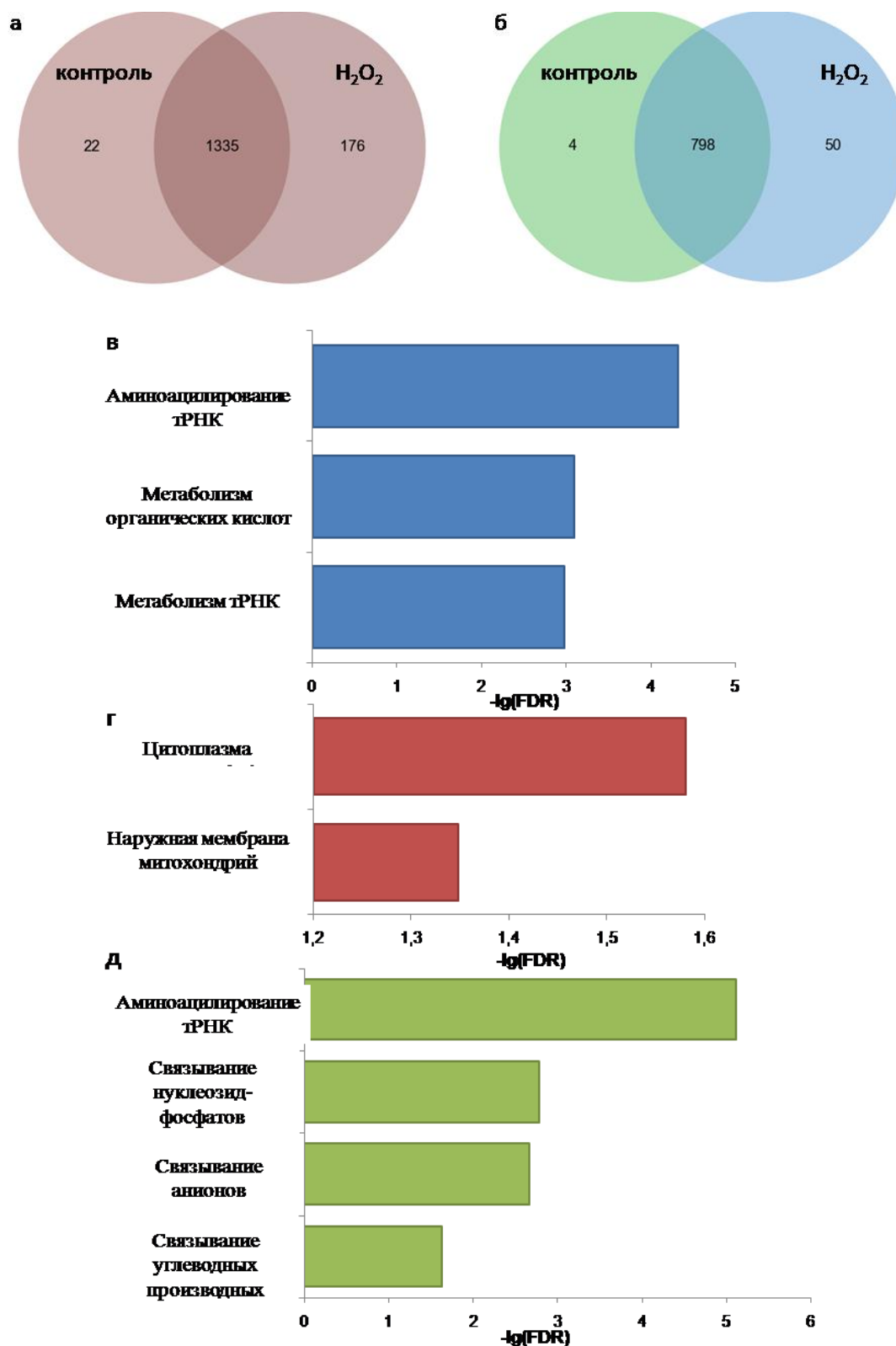


Рисунок 12. Диаграмма Венна и обогащение пыльцевыми белками GO (gene ontology) в присутствии 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (воздействие в течение 30 мин). а – диаграмма Венна первоначально обнаруженных белков; б – диаграмма Венна белков, идентифицированных не менее чем по 2 пептидам; в-д – GO обогащение уникальными белками в обработанной пыльце, классифицируемых как биологические процессы (в); клеточный компонент (г); молекулярная функция (д).

Клеточные компоненты, наиболее вовлеченные в ответ на 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , – это цитоплазма (трансляция, метаболизм) и внешняя мембрана митохондрий (перенос синтезированных белков в митохондрии) (Рисунок 12), что также указывает на интенсификацию синтеза белков (в том числе митохондриальных). В категории молекулярной функции наиболее представленными были связывание углеводов производных, связывание нуклеозид фосфатов и лигазная активность в отношении аминоксил-тРНК (Рисунок 12).

Чтобы прояснить функции уникальных белков, мы провели дополнительный анализ «вручную» (без привлечение специального программного обеспечения). Уникальные белки мы разделили на несколько групп в соответствии с аннотациям к этим белкам в базе данных Uniprot. Такие функциональные группы интуитивно понятнее, т.к. непосредственно указывают на ту работу, которую «уникальный» белок выполняет в клетке. Наиболее представленными группами были Энергетика (гликолиз, цикл Кребса, окисление жирных кислот, дыхание), Метаболизм (синтез аминокислот, перестройка углеводов скелетов, пентозофосфатный цикл), Шапероны, Трансляция и Регуляторные белки (Рисунок 13). Первые две группы, предположительно, активируются для ускорения прорастания и мобилизации углеводов ресурсов, регуляторные белки, трансляция и шапероны перепредставлены, видимо, в связи с усилением белкового синтеза и его регуляции, что хорошо согласуется с данными GO-анализа (Breygina et al. 2021b).

Таблица 3. Уникальные белки в пыльце после обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

ИД белка	Название	Функция
A0A1S4APR3_TOBAC	luminal-binding protein 4-like	Облегчает сборку белковых комплексов в ЭПР
A0A1S4AUN8_TOBAC	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial-like	Основная субъединица НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи митохондрий
A0A1S3XTB8_TOBAC	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	шаперон
A0A1S4D3H6_TOBAC	triosephosphate isomerase, cytosolic-like	Компонент гликолиза и глюконеогенеза (обратимая реакция изомеризации)
A0A1S3X6A4_TOBAC	pyruvate kinase	Катализирует последнюю реакцию гликолиза (необратимая)
A0A1S3WYM6_TOBAC	actin-101	актин
A0A1S3YIE9_TOBAC	S-formylglutathione hydrolase	Детоксикация формальдегида
A0A1S4ALJ9_TOBAC	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	Синтез крахмала. Катализирует синтез активированного донора глюкозных остатков
A0A1S4AJF9_TOBAC	serine-tRNA ligase-like	Катализирует присоединение серина к

		тРНК
A0A1S3YDT5_TOBAC	At2g39795, uncharacterized protein, mitochondrial-like	Положительный регулятор трансляции в митохондриях
A0A1S4BBV8_TOBAC	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Деградация неправильно свернутых белков
A0A1S4A0H0_TOBAC	FAM10 family protein At4g22670-like	Димеризация белков, пересворачивание с участием шаперонов-кофакторов
W8R6T6_TOBAC Cys	cysteine synthase	Биосинтез цистеина из серина
A0A1S3XVM3_TOBAC	20 kDa chaperonin, chloroplastic-like	Ко-шаперон
A0A1S3XU77_TOBAC	heat shock cognate protein 80-like	Шаперон
A0A1S4CRI6_TOBAC	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog isoform X2	Компонент протеасомы
A0A1S4DMJ0_TOBAC	uncharacterized protein At2g34160-like	Процессинг рРНК
A0A0M4JNG5_TOBAC	NADH dehydrogenase subunit 7	Основная субъединица НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи митохондрий
A0A1S4C4G8_TOBAC	60S ribosomal protein L38	Структурный компонент рибосомы
A0A1S3ZJS3_TOBAC	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like	Синтез сорбита
A0A1S3XVZ1_TOBAC	carbonyl reductase [NADPH] 1-like	НАДФН-зависимая редуктаза с широкой субстратной специфичностью
A0A1S4B9Y3_TOBAC	uncharacterized protein At2g27730, mitochondrial-like	Субъединица дыхательного комплекса I
A0A1S4AV83_TOBAC	leucine aminopeptidase 2, chloroplastic-like	Процессинг и круговорот внутриклеточных белков
A0A1S4CJ13_TOBAC	pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	Гликолиз (регуляторная субъединица)
A0A1S3XST0_TOBAC	rho GDP-dissociation inhibitor 1-like	Регулирует обмен GDP/GTP в Rho ГТФазах
A0A1S3Y729_TOBAC	malic enzyme	Компонент ЦТК
A0A1S3Z2Y1_TOBAC	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like isoform X2	Биогенез рибосом, процессинг
A0A1S4BT67_TOBAC	UBP1-associated protein 2C-like	Регулирует обмен мРНК в ядре
A0A1S4DNE8_TOBAC	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein AIM1-like	$\beta$ -окисление липидов
A0A1S4CUN3_TOBAC	2-dehydro- <sup>3</sup> -deoxyphosphooctonate aldolase 1	Биосинтез липополисахаридов
A0A1S4B4V0_TOBAC	coatomer subunit zeta-1-like	Транспорт белков из ЭПР через Гольджи и транс-Гольджи-сеть (упаковка везикул)
A0A1S3Z1B3_TOBAC	pectinesterase	Деметилирование пектинов клеточной

		стенки
A0A1S4AI50_TOBAC	mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	Созревание предшественников белков в митохондриях
A0A1S3XD32_TOBAC	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	Компонент рибосомы
A0A1S4C023_TOBAC	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56-like isoform X1	Сплайсинг пре-мРНК. Вынос мРНК из ядра
A0A1S3ZDB0_TOBAC	probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD8	Транспорт везикул из ЭПР в Гольджи
A0A1S3YBC0_TOBAC	COP9 signalosome complex subunit 5b-like	Регулятор присоединения убиквитина
A0A1S3ZK66_TOBAC	dihydroxy-acid dehydratase, chloroplastic-like	Биосинтез аминокислот
A0A1S3ZZR4_TOBAC	ATP phosphoribosyltransferase 2, chloroplastic-like	Биосинтез аминокислот
Q9S820_TOBAC NTG	NTGP2	Передача сигнала с помощью маленьких ГТФаз
A0A1S4DA91_TOBAC	translationally-controlled tumor protein homolog	Связывание кальция и стабилизация микротрубочек
A0A1S3YD94_TOBAC	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM10-like	Внутримембранный шаперон митохондрий
A0A1S4C7I8_TOBAC	$\beta$ -galactosidase	Гидролиз остатков $\beta$ -D-галактозы
A0A1S4CDD3_TOBAC	fumarylacetoacetase-like	Деградация аминокислот
A0A1S4D3E9_TOBAC	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12-like isoform X2	Деубиквитинирование
A0A1S4C2I0_TOBAC	60S ribosomal protein L31-like	Структурный компонент рибосомы
A0A1S4ASH4_TOBAC	xylulose kinase-like	Метаболизм ксилозы
A0A1S3XAI9_TOBAC	ADP/ATP carrier protein, mitochondrial	Мембранный транспорт

Список уникальных белков (Таблица 3) демонстрирует интенсификацию энергетического метаболизма на всех этапах, включая гликолиз (2 белка), цикл Кребса (1), дыхательную цепь (3), а также активацию синтеза белка и транслокации белков в митохондрии (2). Список включает белки, которые участвуют в регуляции клеточных функций, например, ингибитор диссоциации ГДФ (GDI-like) и NTGP2 (член семейства RAC/ROP ГТФаз), которые входят в систему ГТФазного сигналинга (Kost 2008). Маленькие ГТФазы из этого семейства представляют собой важные регуляторы роста пыльцевой трубки, координирующие многочисленные сигнальные пути, включая динамику актина в апексе и кальциевый градиент (Kost 2008; Zhang and McCormick 2010). Показано, что Nt-RhoGDI2 коэкспрессируется с ГТФазой Nt-Rac5 в пыльцевых трубках табака, взаимодействие двух белков в той же работе показано в гибридной системе на дрожжах (Klahre et al. 2006). Предполагают, что НАДФН-

оксидаза в пыльце контролируется ГТФазами Rac/Rop, т.к. в пыльцевых трубках с оверэкспрессией NtRac5 дикого типа был обнаружен повышенный уровень эндогенных АФК, а с оверэкспрессией dominant-negative NtRac5 – сниженный уровень АФК (Potocký et al. 2012). Таким образом, два участника ГТФазного сигналинга образуются при помещении пыльцу в редокс-активную среду и, в свою очередь, могут модулировать продукцию АФК в пыльце, поддерживая систему обратной связи.

Стоит отметить, что антиоксидантные ферменты среди уникальных белков отсутствуют, показывая, что пыльца, получающая «умеренный» АФК сигнал, находится в нормальном физиологическом состоянии и не нуждается в снижении уровня АФК.

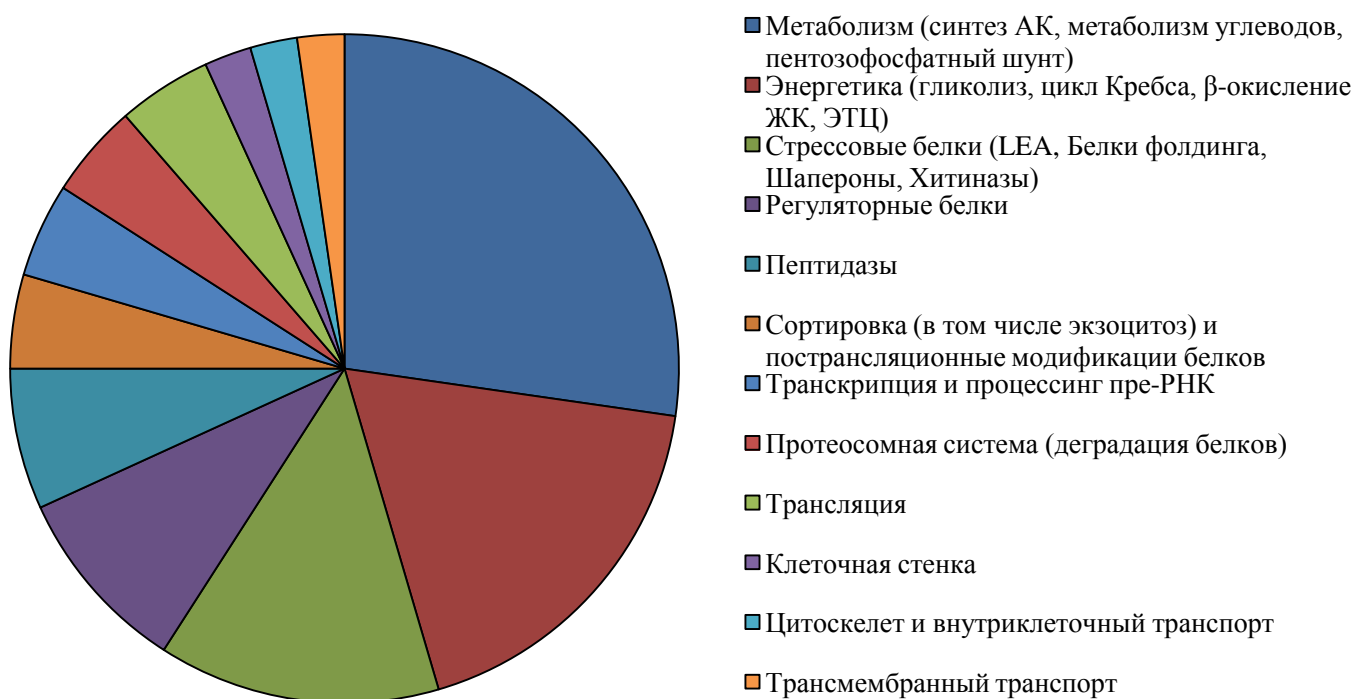


Рисунок 13. Функциональная классификация уникальных белков в пыльце, обработанной 100 μM пероксидом водорода, в соответствии с аннотациями в базе данных Uniprot.

Таблица 4. Белки, количество которых изменялось в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ДПБ).

Недопредставленные белки		
Protein IDs	FC	Название
tr A0A1S4AEJ0 A0A1S4AEJ0_TOBAC	0,63	uncharacterized protein At4g13230-like
tr A0A1S3YWJ5 A0A1S3YWJ5_TOBAC	0,64	alpha-1,4-glucan-protein synthase 2-like
tr A0A1S3YSC8 A0A1S3YSC8_TOBAC	0,65	uncharacterized protein At4g13230-like
tr A0A1S4CJD2 A0A1S4CJD2_TOBAC	0,72	Peptidylprolyl isomerase
tr A0A1S4CH81 A0A1S4CH81_TOBAC	0,73	glycine-rich RNA-binding protein-like
tr A0A1S3YMF9 A0A1S3YMF9_TOBAC	0,76	protein transport protein SEC13 homolog B

tr A0A1S4DLP4 A0A1S4DLP4_TOBAC	0,76	uncharacterized protein LOC107831122
tr A0A1S4A451 A0A1S4A451_TOBAC	0,77	60S ribosomal protein L36
tr A0A1S3XQR5 A0A1S3XQR5_TOBAC	0,83	Fructose-bisphosphate aldolase
<b>Перепредставленные белки</b>		
<b>Protein IDs</b>	<b>FC</b>	<b>Название</b>
tr A0A1S3YA02 A0A1S3YA02_TOBAC	1,21	subtilisin-like protease SBT4.15 isoform X2
tr A0A0S0N610 A0A0S0N610_TOBAC	1,25	Tubulin beta chain
tr A0A1S3YM69 A0A1S3YM69_TOBAC	1,29	eukaryotic initiation factor 4A-9-like
tr A0A1S4BEA5 A0A1S4BEA5_TOBAC	1,30	phosphoenolpyruvate carboxylase 4-like
tr A0A1S3XQI7 A0A1S3XQI7_TOBAC	1,31	aspartate--tRNA ligase 2, cytoplasmic-like
tr A0A1S4D3T4 A0A1S4D3T4_TOBAC	1,39	T-complex protein 1 subunit beta
tr A0A1S4ANT6 A0A1S4ANT6_TOBAC	1,43	Proteasome subunit alpha type
		glucose and ribitol dehydrogenase homolog
tr A0A1S4C5G5 A0A1S4C5G5_TOBAC	1,48	1-like
		Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl
tr A0A140G1S4 A0A140G1S4_TOBAC	1,50	transferase subunit beta
tr A0A1S4DJT5 A0A1S4DJT5_TOBAC	1,60	60S ribosomal protein L18-2-like
tr A0A1S3YPV0 A0A1S3YPV0_TOBAC	1,69	polcalcin Nic t 1-like

Рассмотрим ДПБ (Таблица 4). Среди 9 белков со сниженным уровнем 3 неохарактеризованы, оставшиеся 6 вовлечены в модификацию клеточной стенки, транспорт мРНК, модификацию белков, образование и процессинг РНК, структуру рибосом, но из-за малого количества классифицировать их как следует невозможно. 11 пере-представленных белков являются представителями тех же функциональных групп, которые выделялись в массиве белков, «уникальных для обработки»: Энергетика, Метаболизм, Трансляция и Фолдинг. В целом, список белков также указывает на повышенное потребление энергии и активацию синтетических процессов. Мы также обнаружили сильно перепредставленный белок из семейства пыльцевых аллергенов (полкальцин). Эти белки содержат пару высококонсервативных EF-рук и характерны для многих однодольных и двудольных растений (Rozwadowski et al. 1999). Полкальцины изучают преимущественно в связи с медицинскими проблемами (Magler et al. 2010), но иммунолокализация в ряде модельных объектов показала, что это низкомолекулярные белки цитозоля, локализованные на поверхности пыльцевой трубки или близко к ней (Rozwadowski et al. 1999). Связывая кальций, они меняют конформацию; в связи с этим им приписывают регуляторную функцию; возможно, они являются участниками

важных для прорастания сигнальных путей (Ledesma et al. 1998). Активируясь в присутствии  $H_2O_2$ , полкальцин может играть роль посредника между АФК, кальцием и последующими эффекторами, регулируя скорость прорастания.

Таким образом, основные группы уникальных и перепредставленных белков были те же, которые участвуют в нормальной активации метаболизма и запуске полярного роста (Dai et al. 2006; Zou et al. 2009). Мы предполагаем, что  $H_2O_2$  при относительно длительном воздействии приводит к ускорению процессов, которые готовят пыльцу к прорастанию, за счет более раннего синтеза соответствующих белков, но не вызывают синтеза каких-либо антиоксидантов, белков ионных каналов или каких-либо других факторов специфического ответа. Похоже, что специфический локальный ответ на АФК функционирует главным образом на посттрансляционном уровне, через активность ионных каналов, и эта тема будет подробно рассмотрена в Главе V.

### **III.3. Рост пыльцевой трубки лилии и ели**

#### **3.1 Значение эндогенных и экзогенных АФК для роста пыльцевых трубок**

Мартин Потоцки с коллегами показали, что рост пыльцевой трубки табака требует активности НАДФН-оксидазы плазмалеммы, производящей АФК (Potocký et al. 2007). В этой работе было показано, что тушитель АФК Mn-TMPP и ингибитор фермента ДФИ ингибировали рост пыльцевой трубки, снижая уровень генерации АФК по данным окрашивания нитросиним тетразолием (NBT). Уменьшение количества NtNOX с помощью антисенс-олигонуклеотидов ингибировало рост трубки и подавляло окрашивание NBT. Эти результаты подтвердили, что значительную часть АФК в апексе растущих трубок табака продуцирует НАДФН-оксидаза плазмалеммы (Potocký et al. 2007). В этой же работе было изучено влияние экзогенного  $H_2O_2$  на пыльцевые трубки, и обнаружено, что он восстанавливает рост, подавленный из-за выключения фермента. Это позволило предположить, что  $O_2^-$ , который продуцирует НАДФН-оксидаза на мембране пыльцевой трубки, дисмутирует до пероксида водорода, что необходимо для быстрого полярного роста. Роль НАДФН-оксидазы *OeRbohH* была более подробно изучена на пыльце оливы европейской. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* подтвердили, что данный фермент локализован в плазматической мембране кончика трубки оливы с момента ее появления, а также в цитоплазме и мембранах эндоплазматического ретикулума (Jimenez-Quesada et al. 2019) (речь идет о белке, встроенном в мембрану и преодолевающим этапы секреторного пути). С помощью NBT было показано накопление АФК в кончике трубки, а с помощью азидата натрия (ингибитора активности пероксидаз) и ДФИ было доказано, что обнаруженные АФК (главным образом, супероксид радикал) продуцирует НАДФН-оксидаза, а не пероксидазы.

Поскольку в общих чертах важность АФК для роста трубок уже была показана, мы решили детализировать свое исследование, применяя различные АФК, и определить, какие из них обладают стимулирующим действием, какие – ингибирующим, а также какие эндогенные АФК наиболее важны для роста трубок. В качестве объекта была выбрана лилия и ряд веществ, изменяющих редокс-среду, в которой растут трубки: Mn-TMPP, элиминирующий эндогенные  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , экзогенный  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  (рибофлавин/УФ облучение),  $OH\cdot$  ( $H_2O_2/FeSO_4$ ). Все компоненты присутствовали в среде инкубации в течение последних 15 минут (Podolyan et al. 2021).

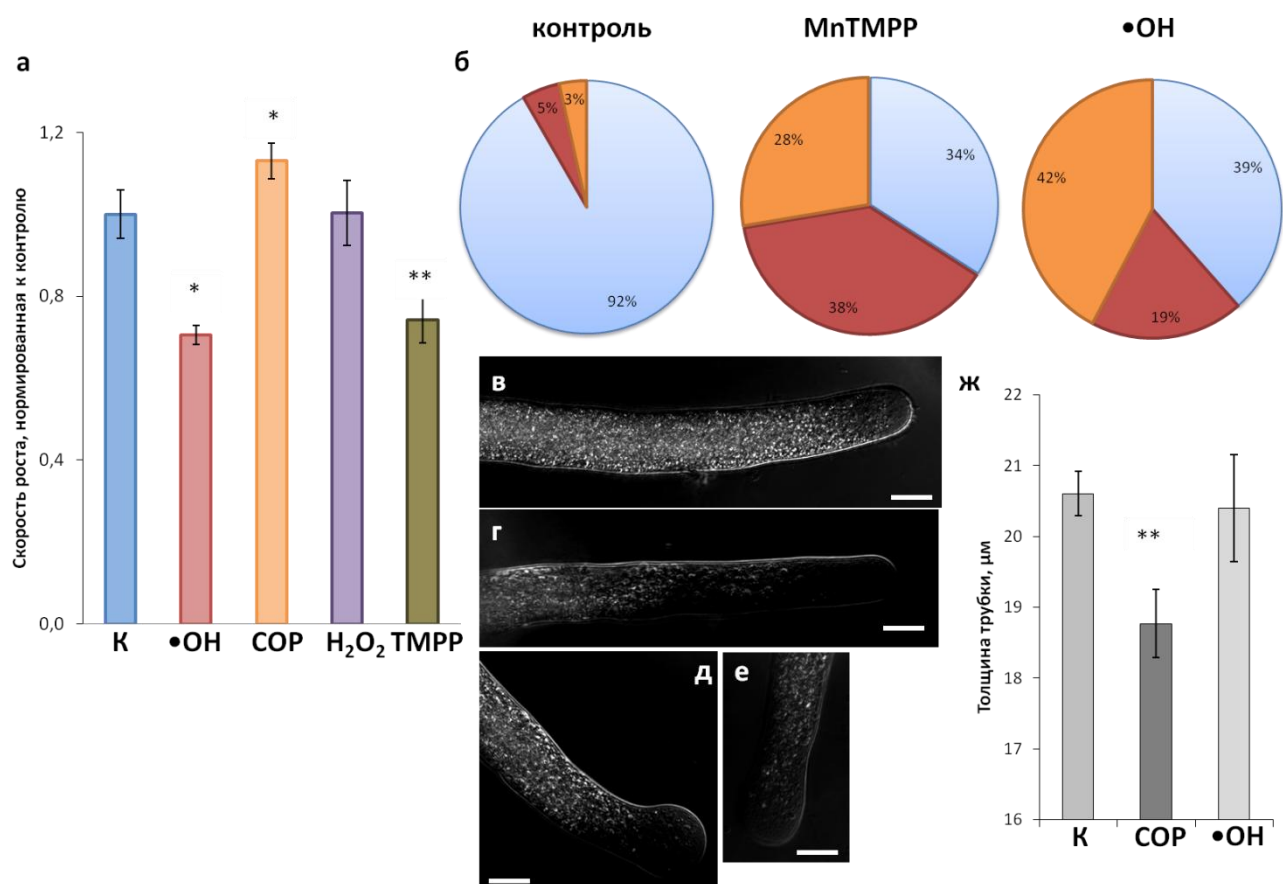


Рисунок 14. Эффект различных АФК на рост пыльцевых трубок лилии. а – скорость роста пыльцевой трубки в контроле, в присутствии Mn-TMPP, который тушит эндогенные  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , а также экзогенных  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  (рибофлавин/УФ) и  $OH\cdot$  ( $H_2O_2/FeSO_4$ ) (абсолютные значения нормированы к контролю).  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ) не оказывает действия на скорость роста,  $OH\cdot$  и Mn-TMPP его замедляют,  $O_2^{\cdot-}$  стимулирует рост пыльцевых трубок; б-е – форма трубок, на которую влияет изменение редокс-статуса: б – средние значения для популяции трубок (голубой – нормальные трубки, красный – утолщенный кончик, оранжевый – шаровидный кончик); и Mn-TMPP, и  $OH\cdot$  влияют на форму апекса трубки по сравнению с контролем (в), но наиболее распространенный тип кончика в суспензии с TMPP – «расширенный кончик» (е), а в пробах с  $OH\cdot$  – «шаровидный кончик» (д); ж – средняя толщина пыльцевых трубок. В контроле и суспензиях с  $O_2^{\cdot-}$  измеряли толщину всех трубок, что позволило выявить «утончающий» эффект SOP (пример трубки – г); в суспензиях с  $OH\cdot$  измеряли только не расширенные части трубки; раздутые и шаровидные кончики рассмотрены в диаграммах (б). Масштабная линейка – 20  $\mu m$ .



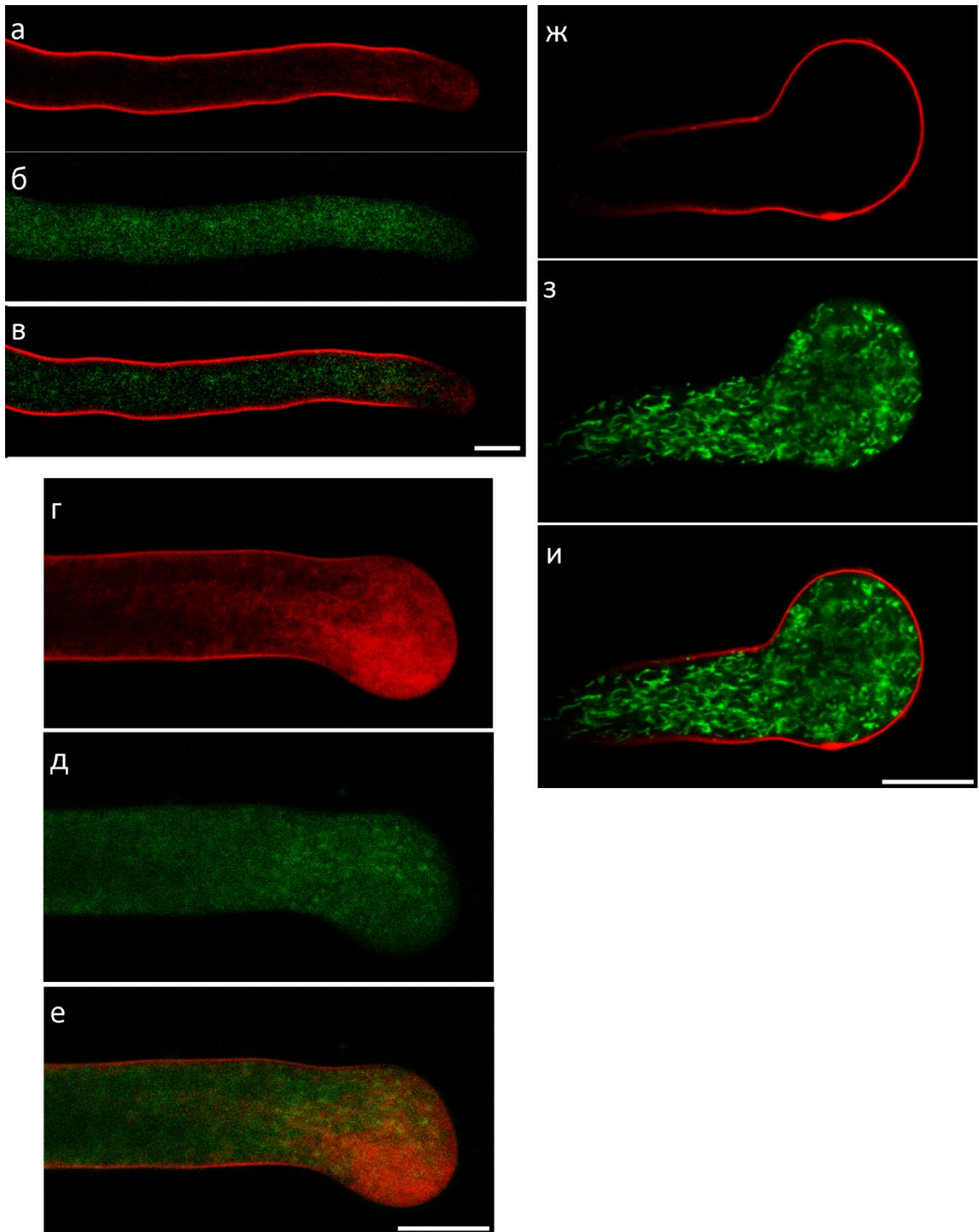


Рисунок 15. Распределение органелл в пальцевых трубках с измененным редокс-статусом. А, г, ж – пальцевые трубки после 2 часов инкубации, окрашенные FM4-64 на мембранный материал; б, д, з – окрашивание NAO на митохондрии; в, з, и – колокализация органелл. В контрольной трубке можно наблюдать типичное окрашивание (а-в) везикул в апикальной части и митохондрий, распределенных вдоль трубки. Mn-TMPP (15 мин) меняет форму трубки, однако везикулярный транспорт остается активным (г), митохондрии реже встречаются в апикальной зоне (д), в целом, паттерн распределения органелл не изменен (е). OH• полностью подавляет везикулярный транспорт (ж), митохондрии распределены в цитоплазме равномерно, включая шаровидный кончик (з). Колокализация показывает потерю полярности (и). Масштабная линейка – 20  $\mu\text{m}$ .

Были обнаружены различные эффекты от применяемых воздействий (Рисунок 14а).  $\text{OH}\cdot$  и  $\text{MnTMPP}$  снижали скорость роста трубок, а  $\text{O}_2^{\cdot-}$  его ускорял.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1 мМ) достоверно не действовал на рост, что согласуется с результатами для трубок табака (Potocký et al. 2007).

Интересно, что трубки, на которые воздействовал супероксид-радикал, были не только длинее, но и тоньше, чем в контроле (Рисунок 14ж). Более половины трубок, растущих в присутствии  $\text{OH}\cdot$  или  $\text{MnTMPP}$ , наоборот, образовывали раздутые кончики (в 1.1 – 1.5 раз толще базальной части) или даже шаровидные кончики (более чем в 1.5 толще) (Рисунок 14): в обеих суспензиях всего около 35% трубок имели нормальную форму по сравнению с 92% до обработки. Таким образом, различные АФК могут рассматриваться как активирующие или ингибирующие рост пыльцевой трубки, что вполне может играть важную роль при прорастании *in vivo*, где АФК могут выступать в качестве простых локальных сигналов от спорофита.

Мы обнаружили, что на первый взгляд противоположные влияния (добавление  $\text{OH}\cdot$  и тушение АФК) могут оказывать сходное действие на рост пыльцевых трубок. Но на самом деле одинаковы ли эти эффекты? Цитологический анализ позволил глубже проанализировать нарушения полярного роста. Мы использовали липофильный краситель FM4-64, чтобы оценить мембранный транспорт (эндо- и экзоцитоз), и NAO (связывающийся с кардиолипином) для окрашивания митохондрий и визуализации их распределения в пыльцевых трубках. Типичный паттерн окрашивания двумя красителями наблюдается в контрольных трубках (Рисунок 15а-в). FM4-64 окрашивает плазмалемму по длине трубки и апикальный конус секреторных везикул, а митохондрии расположены по длине трубки, кроме апикального домена, с меньшей плотностью в апикальной части. В присутствии  $\text{Mn-TMP}$  апикальная зона трубки расширена и содержит многочисленные митохондрии, хотя лишь немногие из них входят в самый кончик. Апикальное скопление везикул даже более выражено, чем в контроле, что указывает на активный мембранный транспорт и экзоцитоз, который, по-видимому, и вызывает расширение кончика. В целом, распределение органелл в этих трубках не нарушено (Рисунок 15г-е).

В трубках, обработанных  $\text{OH}\cdot$ , кончик также увеличен, а митохондрии равномерно распределены в цитоплазме. Окрашивание FM выявляет серьезные нарушения мембранного транспорта во всех этих трубках: окрашена только плазматическая мембрана. Нет ни интернализации, ни рециклирования красителя. Таким образом, зонирование цитоплазмы у этих трубок отсутствует: кончик ничем не отличается от дистальной части (Рисунок 15ж-и).

Мы использовали ЭПР спектроскопию, чтобы оценить содержание радикалов в суспензии пыльцы с помощью спиновой ловушки DMPO. Мы обнаружили, что реакция Фентона дает хороший сигнал, а при добавлении любой из суспензий, табака или лилии, происходит тушение сигнала (Рисунок 16), что показывает антиоксидантную активность пыльцы. Кроме того, мы проверили, идет ли образование  $\text{OH}\cdot$  из 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии

пыльцы лилии. Мы обнаружили, что в отсутствие  $\text{FeSO}_4$  сигнал не регистрируется даже на высокой чувствительности. Значит, пыльца способна тушить  $\text{OH}\cdot$ , но не может его образовывать в заметных количествах.

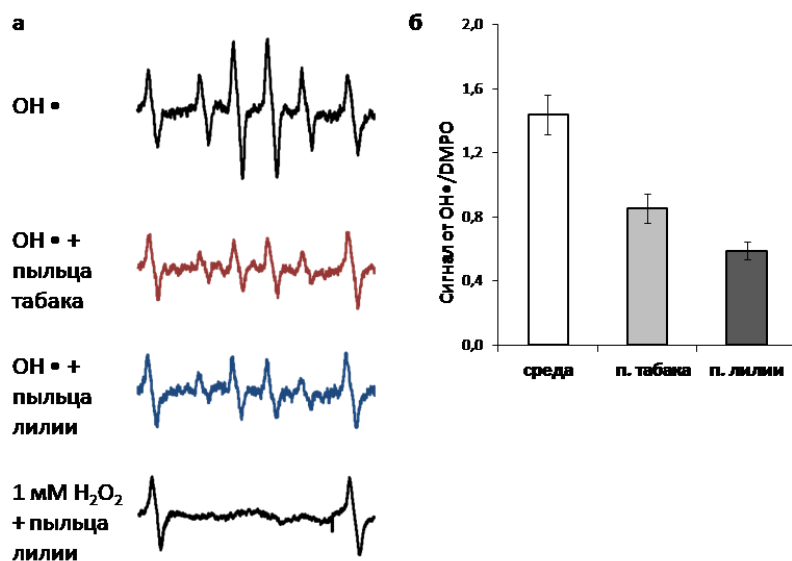


Рисунок 16. Уровень  $\text{OH}\cdot$  в среде инкубации и суспензиях пыльцы, измеренный с помощью ЭПР спектроскопии. А – типичный сигнал ЭПР от аддукта  $\text{OH}\cdot$ , полученного с помощью спиновой ловушки DMPO. Внешние два пика относятся к эталону  $\text{Mn}^{2+}$  (стандартизация). В среде без пыльцы мы можем видеть относительно высокий уровень сигнала в присутствии  $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ ; пыльца табака и лилии снижают сигнал, демонстрируя антиоксидантные свойства. В присутствии пыльцы (без добавления  $\text{FeSO}_4$ ) заметных количеств  $\text{OH}\cdot$  из  $\text{H}_2\text{O}_2$  не образуется; б – усредненный сигнал ЭПР от аддуктов  $\text{OH}\cdot$  со спиновой ловушкой DMPO. Все сигналы нормированы по амплитуде к сигналу от эталона  $\text{Mn}^{2+}$ .

### 3.2 Локализация АФК в пыльцевых трубках

Субклеточную локализацию АФК мы изучали в пыльцевых трубках лилии и ели с использованием конфокальной микроскопии. Сравнить распределение двух АФК в клетках позволило применение двух флуоресцентных красителей: высокоспецифичный пентафлуоробензен сульфонилфлуоресцеин (PFBSF) использовали для визуализации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Maeda et al. 2004), а MitoSOX маркировал супероксид анион радикал (СОР), продуцируемый в митохондриях (Robinson et al. 2008). В целом, распределение АФК в трубках двух видов имело много общего, но были и различия. Рассмотрим сначала пыльцевые трубки лилии.

$\text{H}_2\text{O}_2$  в основном локализован в цитозоле и крупных сферических органеллах (предположительно, пластидах) (Рисунок 17а, г, ж). Уровень цитозольного пероксида водорода и количество пластид могут различаться в отдельных трубках, но картина довольно стабильна: в большинстве трубок  $\text{H}_2\text{O}_2$  концентрируется в апикальной области. Следует отметить, что при изучении нескольких популяций трубок нам встречались экземпляры с равномерно высоким уровнем  $\text{H}_2\text{O}_2$  от кончика до примерно  $50 \mu\text{m}$  от кончика (Рисунок 17ж).

Митохондрии, продуцирующие  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , располагались вдоль трубки, за исключением апикального домена (Рисунок 17б, д, з). Мы обнаружили, что в пыльцевых трубках  $\text{H}_2\text{O}_2$  слабо

колокализуется с митохондриальным  $O_2^{\bullet-}$ , таким образом, митохондрии являются минорным источником цитозольного пероксида водорода (Podolyan et al. 2021).

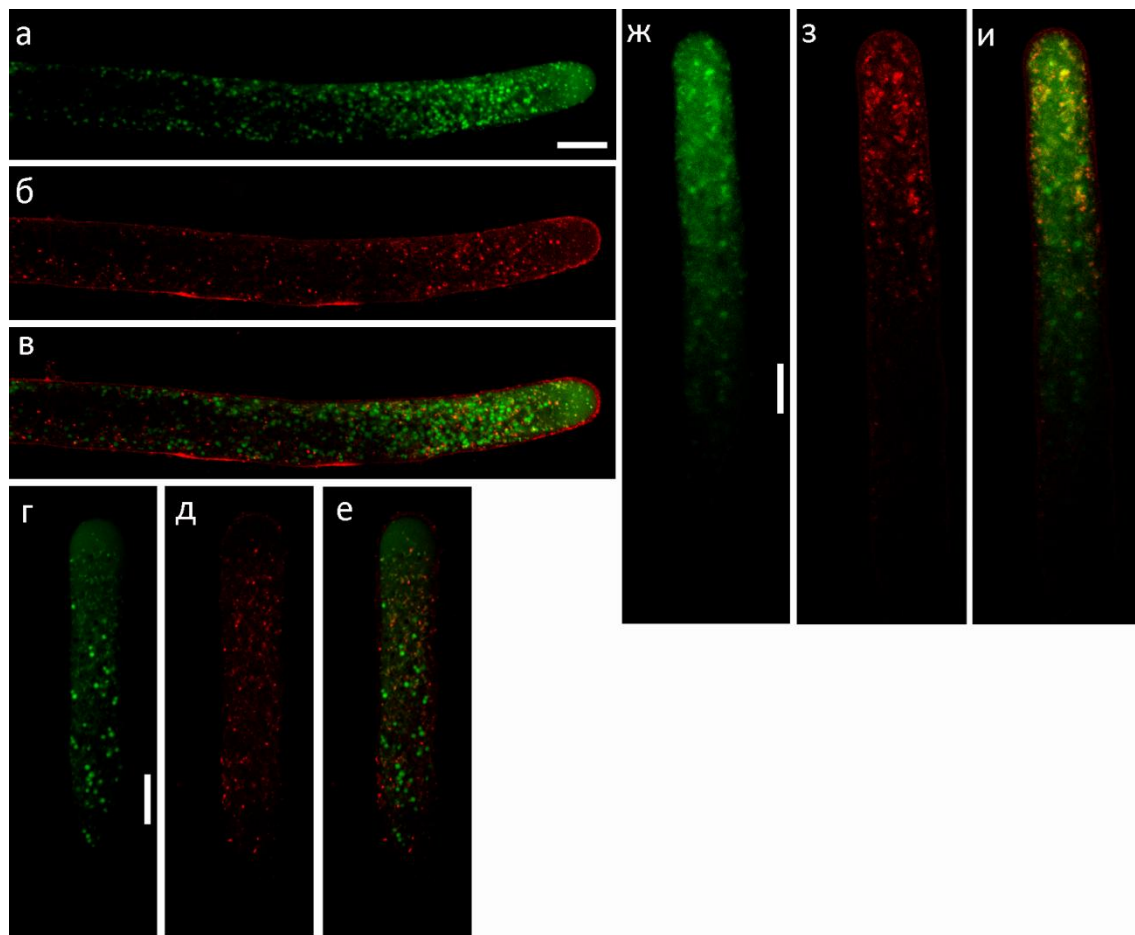


Рисунок 17. Локализация  $H_2O_2$  и митохондриального  $O_2^{\bullet-}$  в пыльцевых трубках лилии. Три случайно выбранные пыльцевые трубки после 2 часов инкубации: а, г, ж – окрашенные PFBSF; б, д, з – окрашенные MitoSOX; в, е, и – локализация двух АФК друг относительно друга. Трубка на (в) имеет более высокий уровень АФК, чем трубка на (е) (индивидуальные различия между клетками), но локализация та же: митохондрии, продуцирующие  $O_2^{\bullet-}$ , накапливаются в субапикальной части,  $H_2O_2$  слабо колокализуется с митохондриями, но значительные уровни пероксида также обнаруживаются в апикальной цитоплазме и в пластидах. Трубка на (и) имеет самый высокий уровень АФК, и апикальное накопление  $H_2O_2$  не выражено. Масштабная линейка – 20  $\mu m$ .

Двойное окрашивание трубок ели выявило сходное распределение АФК: митохондрии, продуцирующие  $O_2^{\bullet-}$ , были локализованы вдоль всей трубки, за исключением апикального домена и зоны, занятой амилопластами (Рисунок 18б, д). В отличие от лилии, в у ели  $H_2O_2$  частично колокализован с  $O_2^{\bullet-}$ , что указывает на митохондрии как один из важных источников цитоплазматических АФК (Рисунок 18в, е). Но мы можем видеть  $H_2O_2$  и снаружи митохондрий, в том числе, значительные количества в апексе трубки. Амилопласты также содержат много  $H_2O_2$  (Рисунок 18а, г) (Maksimov et al. 2018).

Чтобы выяснить, происходит ли накопление  $H_2O_2$  в апикальной зоне на этапе запуска полярного роста, или оно проявляется на более поздней стадии, мы окрашивали пыльцевые зёрна лилии и ели на начальном этапе полярного роста. У лилии как в носиках, так и в очень

коротких трубках апикальная часть трубки ярко окрашена, что свидетельствует о высокой концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Рисунок 19а, г, е). В коротких трубках супероксид-радикал, продуцируемый митохондриями, окрашивали MitoSOX, и при этом было обнаружено, что колокализация  $\text{H}_2\text{O}_2$  с митохондриями отсутствует (Рисунок 19б, в). Таким образом, в пыльце лилии две эндогенные АФК продуцируются и накапливаются в разных субклеточных компартментах (Podolyan et al. 2021).

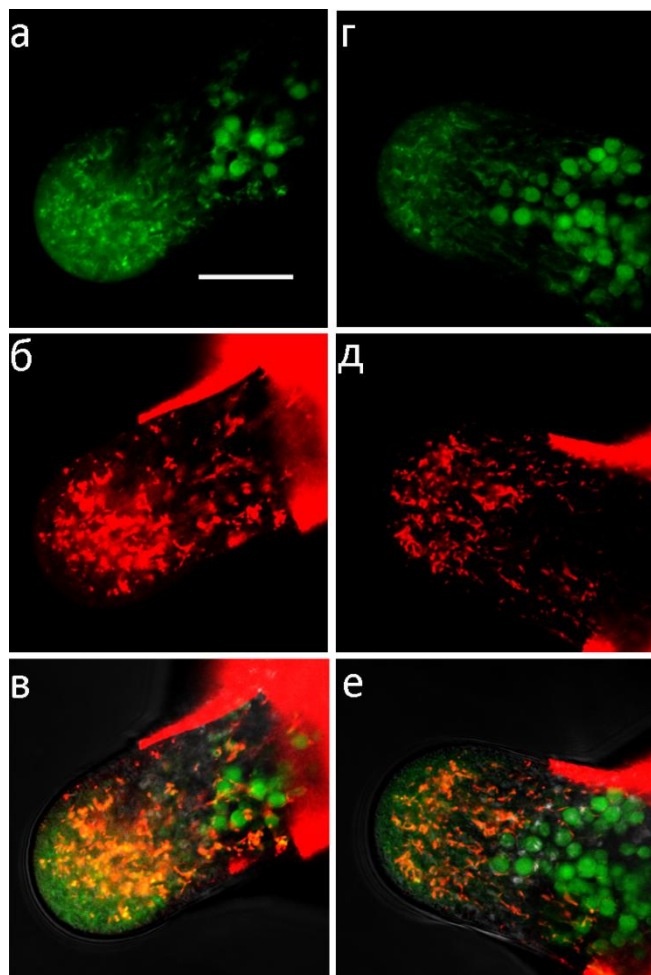


Рисунок 18. Локализация  $\text{H}_2\text{O}_2$  и митохондриального  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в пыльцевых трубках ели (*Picea pungens*). Две случайно выбранные пыльцевые трубки после 18 часов инкубации: а, г – окрашенные PFBSF; б, д – окрашенные MitoSOX; в, е – наложение двух каналов и частичная колокализацию двух АФК. Трубка в первом столбце имеет более высокий уровень эндогенных АФК, чем трубка во втором (индивидуальные различия между клетками), однако локализация вполне совпадает. Митохондрии, производящие  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , накапливаются в субапикальной части,  $\text{H}_2\text{O}_2$  частично колокализуется с митохондриями, но значительный уровень также виден в апикальном домене и в амилопластах. Масштабная линейка – 20  $\mu\text{m}$ .

У ели в инициалах пыльцевых трубок и очень коротких трубках накопление красителя в апикальной зоне также было ярко выражено, что указывает на раннее становление градиента  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Рисунок 20). В случаях биполярного прорастания, накопление можно видеть в обеих инициалах (Рисунок 20г), что согласуется с нашим представлением об одновременном формировании точек роста и их потенциальном равноправии (Maksimov et al. 2018).

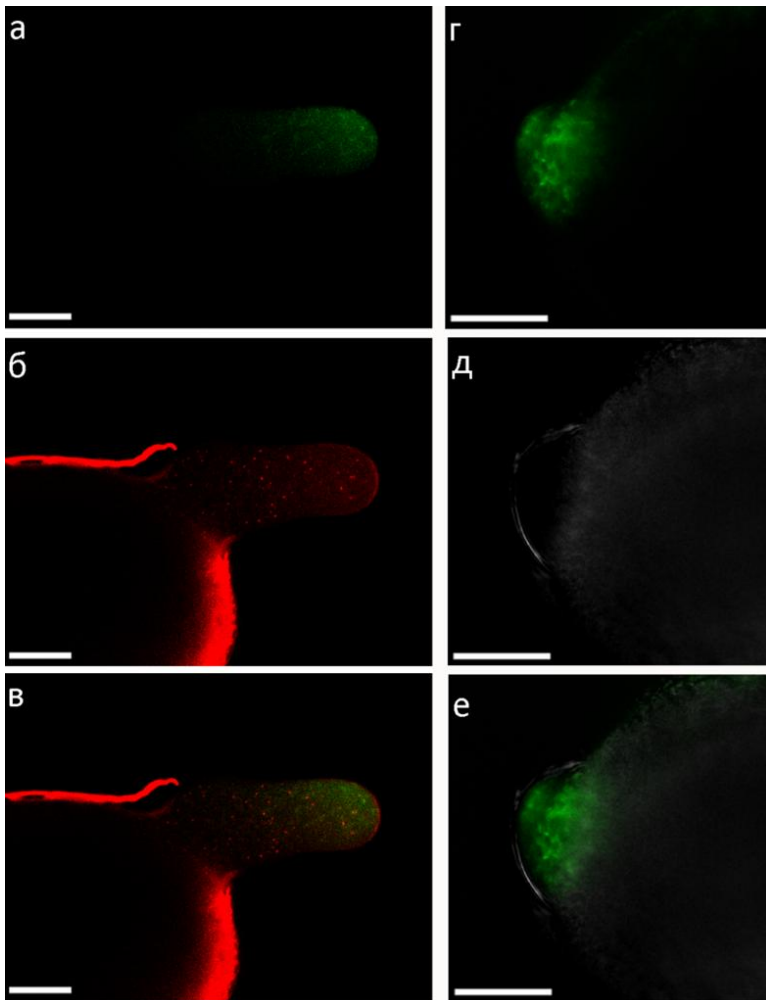


Рисунок 19. Локализация АФК в инициалах пыльцевых трубок лилии и коротких пыльцевых трубках. а-в – типичная короткая пыльцевая трубка; г-е – инициаль пыльцевой трубки, окрашенные PFBSF (а, г, е) и MitoSOX (б). PFBSF демонстрирует апикальное накопление  $H_2O_2$  в цитоплазме обеих структур; (в) показывает отсутствие колокализации  $H_2O_2$  с митохондриальным  $O_2^{\cdot -}$  в короткой пыльцевой трубке. В инициалах пыльцевых трубок не приводится окрашивание MitoSOX из-за малого количества митохондрий; д показывает соответствующее изображение DIC. Масштабная линейка – 20  $\mu m$ .

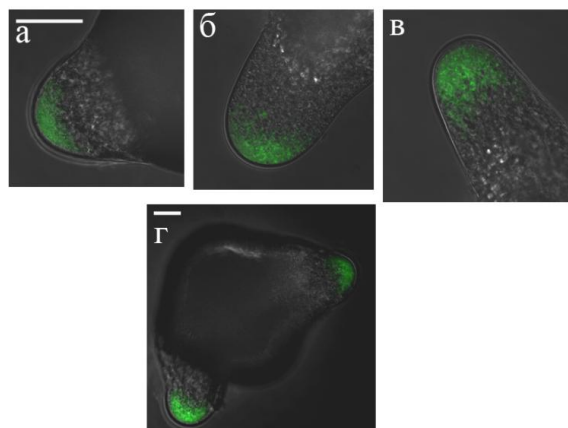


Рисунок 20. Локализация  $H_2O_2$  в инициалах и коротких пыльцевых трубках ели. Инициали пыльцевых трубок в процессе: а – униполярного; г – биполярного прорастания (13 часов инкубации), окрашенные PFBSF. Видно накопление  $H_2O_2$  в цитоплазме в апикальной зоне. б, в – аналогичное распределение пероксида в двух случайно выбранных пыльцевых трубках (15 часов инкубации). Масштабная линейка – 20  $\mu m$ .

На основании описанных результатов мы можем сделать три заключения по локализации АФК в пыльцевых трубках:

1. Апикальное скопление  $H_2O_2$  обнаруживается в пыльцевой трубке представителей как покрытосеменных, так и голосеменных растений.

2. Скопление пероксида водорода в апикальной зоне появляется уже при запуске полярного роста и сохраняется на более поздних его этапах. Ранее накопление  $H_2O_2$  также было недавно показано для *Arabidopsis* (Do et al. 2019).

3. У лилии митохондрии не являются значимым источником пероксида, хотя они продуцируют  $O_2^{\cdot-}$ .

Локализация заметных количеств  $H_2O_2$  в апексе, где митохондрий почти нет, свидетельствует о том, что основной источник цитозольного пероксида – НАДФН-оксидаза плазмалеммы, продуцирующая супероксид радикал, и/или апопластный фермент полиаминоксидаза (Wu et al. 2010), по-видимому, локализованные преимущественно в апикальной зоне трубки.

Сходство в распределении АФК у лилии и ели указывает на консервативный характер их продукции и накопления. Сравнивая градиенты  $H_2O_2$  в апексах трубок двух видов, мы можем наблюдать более обильное накопление пероксида у лилии, которое можно связать с высокой скоростью роста и крутым кальциевым градиентом у данного вида. Однако полностью корректное сравнение невозможно из-за кратно отличающихся размеров пыльцевых трубок, да и вряд ли имеет смысл, поскольку апикальные компартменты у хвойных и цветковых растений устроены по-разному. Также среди отличий можно указать участие митохондрий в продукции АФК в трубках ели, которое, опять же, коррелирует с их наличием в апикальном компартменте, в отличие от лилии, где скопление пероксида совпадает с прозрачной зоной, в которую митохондрии практически не заходят.

Пластиды в трубках обоих видов были маркированы красителем, специфичным к  $H_2O_2$ , что указывает на продукцию в них пероксида. Крупные амилопласты характерны для пыльцевых трубок голосеменных, включая ель, а про их роль в пыльцевых трубках цветковых растений известно меньше, однако, по многочисленным микроскопическим данным, они являются наиболее крупными органеллами в них (Southvorth and Dickinson 1981; Staff et al. 1989; Fujiwara et al. 2012). Синтез пероксида водорода может быть побочным результатом происходящих в пластидах синтетических процессов. Любопытно, что  $O_2^{\cdot-}$  при этом не образуется, хотя MitoSOX способен выявлять АФК в любых ДНК-содержащих органеллах. По-видимому, пероксид образуется в результате работы пероксидаз.

Ранее по поводу пыльцевых трубок покрытосеменных высказывались различные предположения: накопление АФК в апексе (Potocký et al., 2012) или их колокализация с

митохондриями в субапикальной зоне (Cárdenas et al. 2006). Ранее митохондриальное происхождение АФК постулировалось также для пыльцевых зёрен табака (Смирнова et al. 2009). Полученные этими авторами данные, как и точки зрения, казалось, противоречили друг другу. В настоящей работе мы показали, что, по крайней для изученных нами видов, обе точки зрения верны, однако речь идет о разных АФК: если за продукцию  $O_2^{\bullet -}$  отвечают митохондрии, то накопление  $H_2O_2$  происходит в области апикальной цитоплазмы, а также пластид и митохондрий (у ели). Эти данные хорошо согласуются с ранее показанным суммарным накоплением АФК в трубках ели Мейера (Liu et al., 2009), однако проясняют и уточняют эти данные, показывая, что разные активные формы распределены по-разному.



## Глава IV. Роль ионного транспорта в регуляции прорастания мужского гаметофита<sup>3</sup>

По данным литературы, одним из основных мишеней для АФК на плазмалемме соматических клеток являются ион-транспортные системы. Для установления возможной роли ионных каналов в восприятии сигнала АФК в мужском гаметофите необходимо было изучить динамику их работы и значение для активации пыльцевого зерна.

### IV.1. Начальные этапы прорастания у цветковых растений

Для пыльцевых зёрен табака, проходящих гидратацию и активацию в суспензии *in vitro*, методами спектрофотометрии по тушению флуоресценции внеклеточного сенсора MEQ, который реагирует на увеличение концентрации  $Cl^-$ /анионов в растворе тушением флуоресценции, и пламенной фотометрии оценивали, соответственно, выход суммарных анионов и ионов калия в среду инкубации в процессе активации пыльцевых зёрен (Брейгина et al. 2012). Оказалось, что на начальный этап активации приходится массированный выход как анионов, так и калия.

В контрольных препаратах после первых 2 мин инкубации пыльцы в присутствии красителя наблюдали существенное снижение интенсивности его флуоресценции. В последующие 8 минут интенсивность флуоресценции раствора MEQ не изменялась, т.е. процесс выхода анионов был уже завершён (Рисунок 21а). В присутствии блокатора анионных каналов NPPB тушения флуоресценции не происходило (Брейгина et al. 2012). Эти данные позволяют сделать вывод об участии NPPB-чувствительных анионных каналов в

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала (при наличии), объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **Брейгина М.А.**, Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Роль  $Cl^-$  в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки // Онтогенез.— 2009.—Vol40. —№3.—Р. 199-207 (0,8/0,7)
2. **Брейгина М.А.**, Смирнова А.В., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. // Цитология. — 2009.— Vol 51. — № 10. — Р. 815-823 (0,75/0,6)
3. **Брейгина М.А.**, Смирнова А.В., Масленников М.В., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Действие ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака. // Цитология.— 2010.—Vol. 52. — № 4. —Р. 334-341( 0,8/0,6)
4. **Брейгина М.А.**, Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Трансмембранный перенос  $K^+$  и  $Cl^-$  в процессе активации пыльцевого зерна *in vivo* и *in vitro*. // Онтогенез. — 2012. — Vol. 43. — № 2.—Р. 103-112 (0,8/0,6)
5. **Брейгина М.А.**, Смирнова А.В., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Еще раз об изменениях мембранного потенциала в растущей пыльцевой трубке. // Цитология. — 2012. — Vol 54. —№ 1.—Р. 85-88 (0,4/0,3).
6. **Breygina M.A.**, Klimenko E.S., Podolyan A.O., Voronkov A.S. Dynamics of pollen activation and the role of  $H^+$ -ATPase in pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*). // Plants.— 2020. – Vol. 9. – № 12. ( IF =4.5, 0,9/0,7).

трансмембранном переносе анионов в процессе гидратации пыльцевых зерен. Результаты этих экспериментов (Рисунок 21а) хорошо согласуются с данными о выходе  $\text{Cl}^-$ , полученными ранее с помощью ионоселективных электродов (Матвеева et al. 2003b). Таким образом, двумя независимыми методами установлен факт выхода  $\text{Cl}^-$  и, возможно, других анионов из пыльцевых зерен через NPPB-чувствительные анионные каналы плазмалеммы. Следует отметить, что краситель MEQ чувствителен не только к хлорид-иону, но и к органическим анионам, которые также могут вносить свой вклад в этот процесс (Брейгина et al. 2009a). С помощью пламенной фотометрии было установлено, что вместе с анионами из пыльцевых зёрен в среду инкубации выходит  $\text{K}^+$ . Динамика выхода не отличалась: он также происходил в первые минуты после начала инкубации (Рисунок 21б). В случае выхода калия блокирование с помощью ингибитора TEA не было полным, независимо от концентрации. По-видимому, в выходе калия участвуют различные ион-транспортные системы.

Наблюдения за пыльцевыми зёрнами, в которых с помощью ингибитора подавлен выход  $\text{K}^+$ , показали важное физиологическое значение этого процесса.

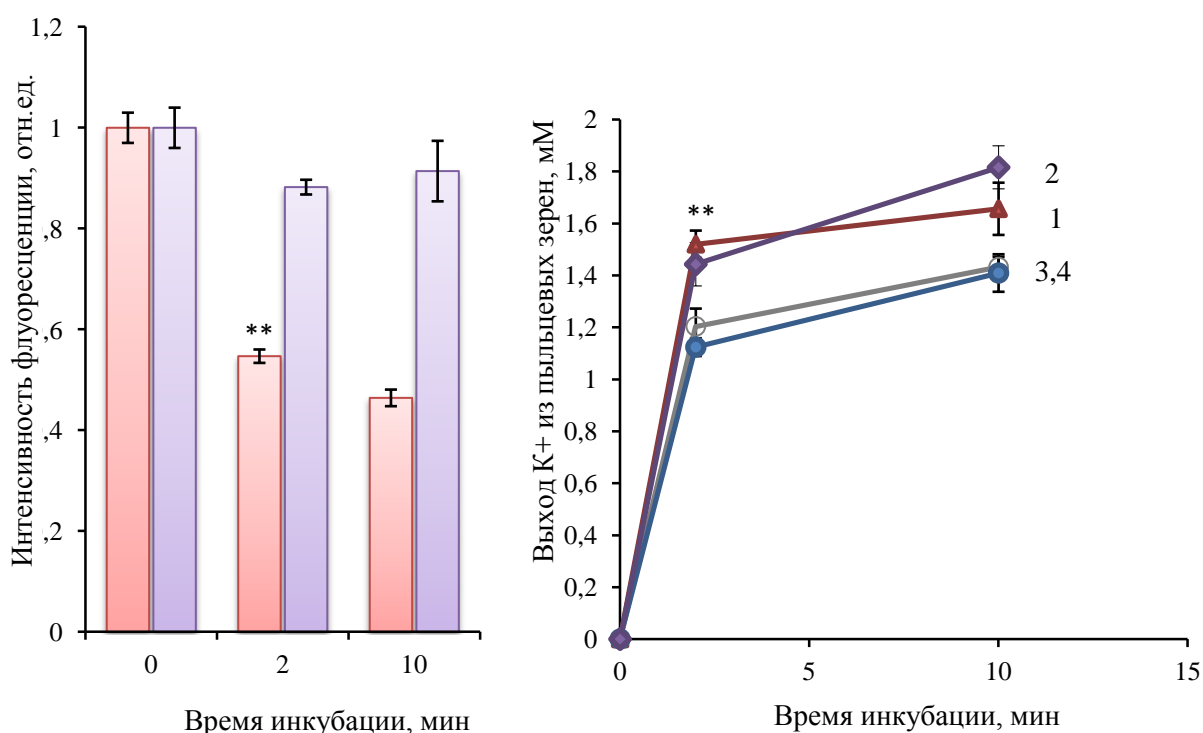


Рисунок 21. Выход анионов (а) и  $\text{K}^+$  (б) в среду инкубации из пыльцевых зерен *in vitro* (точка 2 мин соответствует стадии полностью гидратированной пыльцы): а – тушение флуоресценции MEQ, отражающее выход анионов: красные столбики – контроль, сиреневые – в среду добавлен ингибитор анионных каналов NPPB, 40  $\mu\text{M}$ ; б – выход  $\text{K}^+$ : контроль – красный (1); ингибитор хлоридных каналов NPPB (40  $\mu\text{M}$ ) – фиолетовый (2), ингибитор калиевых каналов TEA: 10 мМ – серый (3), 20 мМ – синий (4).

Так, оказалось, что ингибитор  $\text{K}^+$ -проводящих каналов  $\text{Ba}^{2+}$  нарушает осморегуляцию в пыльцевых зернах (Рисунок 22): пыльцевые зерна в присутствии  $\text{Ba}^{2+}$  гидратировались,

достигая такого же объема, как и пыльца в контроле, но уже через 1 мин начинали сжиматься. С увеличением времени инкубации этот эффект становился еще более выраженным. Анализ показал, что сжатие пыльцевых зерен, по-видимому, обусловленное выходом из них осмотически активных веществ, прежде всего  $K^+$ , завершается в среднем за 2 мин (Рисунок 23).

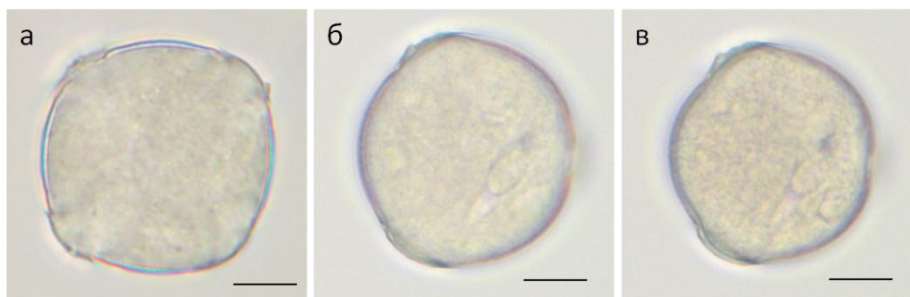


Рисунок 22. Уменьшение объема пыльцевого зерна под действием  $Ba^{2+}$ : а – пыльцевое зерно, гидратированное в среде без  $Ba^{2+}$  (1 мин); б, в – изменение объема пыльцевого зерна при его гидратации в присутствии 5 мМ  $Ba^{2+}$  в течение 1 мин (б) и 5 мин (в). Масштабная линейка – 10 мкм.

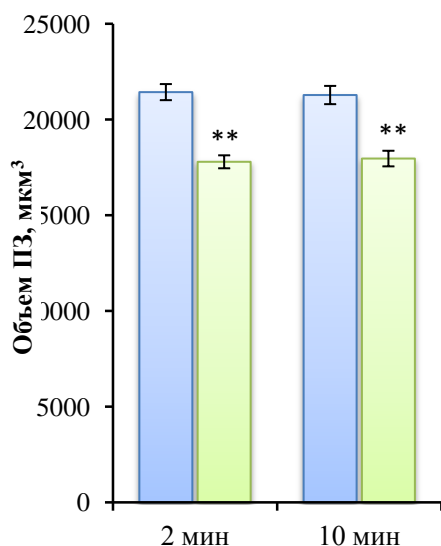


Рисунок 23. Действие  $Ba^{2+}$  на объем пыльцевых зерен в культуре *in vitro*. Голубые столбики – контроль, зеленые – 5 мМ  $Ba^{2+}$ .

Представлялось маловероятным, что пыльца, претерпевшая такие изменения, может приступить к активации метаболизма. Проверка на жизнеспособность с помощью стандартного ФДА-теста показала, что на препаратах, обработанных  $Ba^{2+}$ , подавляющее большинство составляют слабо флуоресцирующие пыльцевые зерна (Рисунок 24б,г). Для сравнения представлен снимок контрольной суспензии, где после 2 минут инкубации достаточно много ярко флуоресцирующих клеток (Рисунок 24а). ТЕА не вызывал быстрого сжимания клеток, однако после 2 мин инкубации доля интенсивно флуоресцирующих клеток была ниже, чем в контроле (Рисунок 24в,г) (Брейгина et al. 2012).

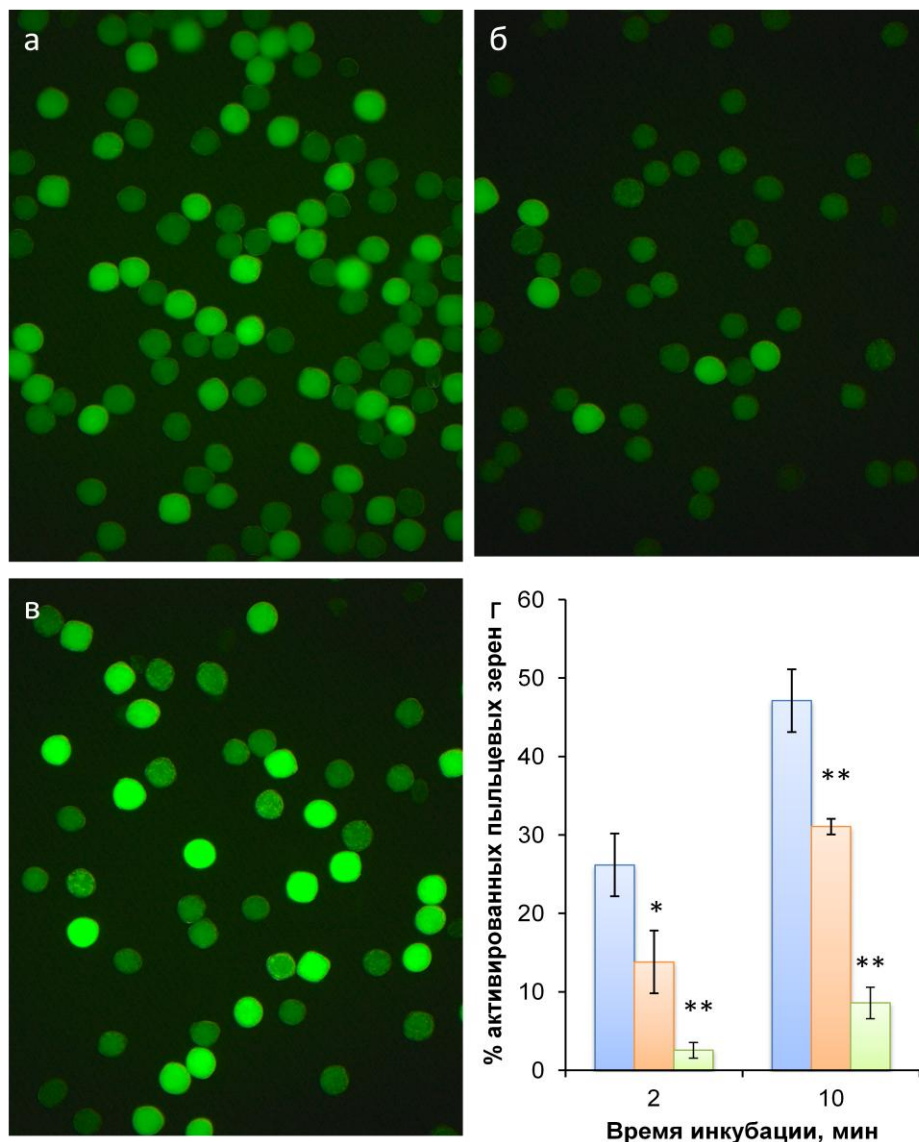


Рисунок 24. Действие ингибиторов калиевых каналов  $Ba^{2+}$  и ТЕА на флуоресценцию пыльцевых зерен, окрашенных ФДА, которая отражает их функциональное состояние: а – контрольная суспензия без ингибиторов; б – 5 мМ  $Ba^{2+}$ ; в – 10 мМ ТЕА; г – процентное содержание в суспензии пыльцевых зерен, приступивших к активации: голубые столбики – контроль, оранжевые – 10 мМ ТЕА, зеленые – 5 мМ  $Ba^{2+}$ .

Значение концентрации  $K^+$  в среде инкубации для эффективности прорастания пыльцы *in vitro* было показано давно (Weisenseel and Jaffe 1976). Позже было показано, что концентрации  $K^+$  в среде  $> 1$  мМ ингибируют прорастание пыльцы, хотя для роста пыльцевой трубки оптимальной является концентрация  $K^+$  30 мМ (Fan et al. 2001). Исходя из этих данных, а также принимая во внимание высокую цитозольную концентрацию  $K^+$  в зрелом пыльцевом зерне, снижение которой необходимо для запуска синтеза белка (Bashe and Mascarenhas 1984), Fan с сотрудниками (2001) предположили, что входные потоки  $K^+$  нужны для регуляции роста пыльцевой трубки, но они могут подавлять процесс активации пыльцевого зерна. Например, такой эффект может достигаться за счет снижения движущей силы для выходящего тока. Это

предположение косвенно подтверждается полученными данными:  $K^+$  действительно выходит из пыльцевых зёрен (Рисунок 21б).

До начала нашей работы было установлено, что специфичные ингибиторы анионных каналов блокируют прорастание пыльцевого зерна и рост пыльцевой трубки (Zonia et al. 2002; Матвеева et al. 2003b). Было высказано предположение о том, что важную роль в этих процессах играет трансмембранный перенос  $Cl^-$ . Поскольку анионные каналы не обладают высокой специфичностью, чтобы проверить это предположение, мы анализировали поведение пыльцевых зерен и трубок в условиях избирательного блокирования выхода  $Cl^-$  из клеток. С этой целью в среду для культивирования клеток добавляли  $Cl^-$  в такой концентрации, чтобы выровнять электрохимический потенциал для этого иона по обе стороны плазматической мембраны. Для расчетов внеклеточной концентрации  $Cl^-$  ( $C_{Out}$ ) использовали уравнение:

$$\Delta\mu = \mu_{in} - \mu_{Out} = RT \ln [C_{in}/C_{Out}] + zFE,$$

из которого при условии  $\Delta\mu = 0$  получаем:

$$C_{Out} = C_{in} e^{zFE/RT},$$

где  $\mu_{in}$ ,  $\mu_{Out}$  – значения электрохимического потенциала для иона по обе стороны мембраны;  $C_{in}$  – концентрации иона в цитоплазме (М);  $E$  – электрический потенциал на мембране (В);  $R$  – газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура (К);  $F$  – число Фарадея;  $z$  – заряд иона.

Значения мембранного потенциала ( $E$ ) были получены в предварительных экспериментах и составляли -37 и -77 мВ для пыльцевого зерна на начальном этапе активации и трубки, соответственно. Внутриклеточная концентрация  $Cl^-$  в гидратированном пыльцевом зерне табака составляла примерно 50 мМ (Андреюк et al. 2001), для трубки экспериментальные данные отсутствуют, поэтому, основываясь на данных для других растительных клеток (Taiz et al. 2015), было выбрано значение  $C_{in} = 5$  мМ. Расчёты показали, что для подавления выхода  $Cl^-$  из пыльцевого зерна нужно наличие в среде 200 мМ  $Cl^-$ ; для пыльцевой трубки достаточно 100 мМ. Эти концентрации были проверены в экспериментах. Чтобы исключить изменение осмотических условий, в средах с равновесной концентрацией  $Cl^-$  уменьшали концентрацию сахарозы. При этом в контрольных пробах также снижали ее содержание, добавляя маннит. Таким образом, во всех вариантах среды суммарное содержание углеводов и осмотиков становилось на одном уровне.

NPPB, в соответствии с ранее полученными данными, полностью подавлял прорастание (Матвеева et al. 2003a). Так же действовало добавление хлорид-ионов: прорастание снижалось с увеличением их концентрации и доходило практически до нуля в присутствии 200 мМ  $Cl^-$  (Рисунок 25а). Рост трубок был полностью подавлен в присутствии NPPB и 100 мМ  $Cl^-$  (Рисунок 25б).

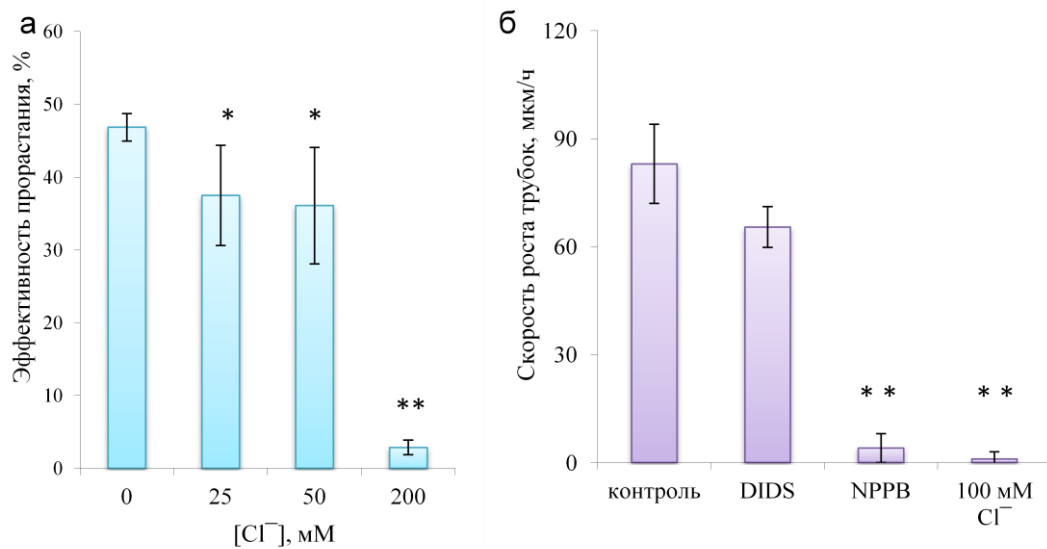


Рисунок 25. Влияние блокирования выхода анионов и избирательного подавления трансмембранного переноса Cl<sup>-</sup> на ростовые процессы в мужском гаметофите табака *in vitro*: а – концентрационная зависимость действия Cl<sup>-</sup> на эффективность прорастания пыльцевых зерен (хлорид-ионы присутствовали в среде прорастания на протяжении всей инкубации); б – скорость роста пыльцевых трубок в присутствии 40 μM NPPB, 20 μM DIDS или 100 mM Cl<sup>-</sup> (действующие вещества добавлялись после прорастания).

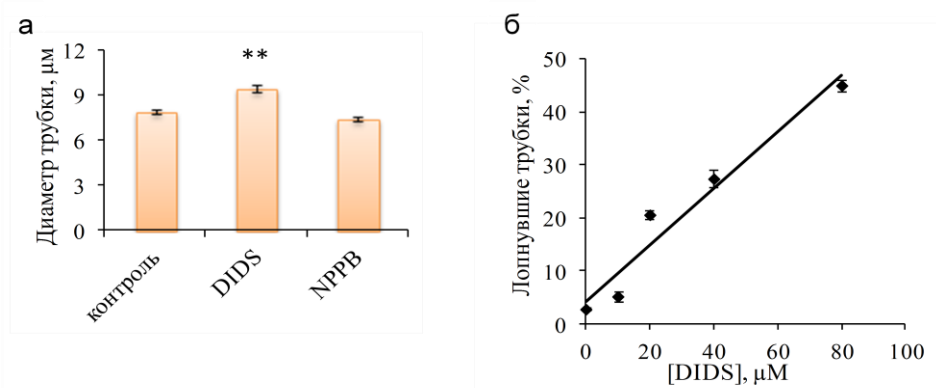


Рисунок 26. Влияние блокаторов анионных каналов на осмотический баланс пыльцевых трубок: а – диаметр апикальной части пыльцевых трубок, которые кратковременно инкубировали в присутствии 40 μM NPPB или 20 μM DIDS; б – увеличение числа трубок с разрывами плазматической мембраны с увеличением концентрации DIDS в среде инкубации.

Другой ингибитор анионных каналов, DIDS, в концентрации 20 μM не снижал скорость роста трубок (Рисунок 25б), но при этом вызывал набухание, то есть, увеличивал диаметр трубок (Рисунок 26а). Это приводило к разрыву мембран значительной части трубок, при этом наблюдалась концентрационная зависимость (Рисунок 26б). NPPB и хлорид-ионы не вызывали набухания и разрыва трубок (Брейгина et al. 2009а).

Таким образом, изучая различные воздействия на анионный транспорт, мы установили, что для прорастания необходима не только активность анионных каналов, т.е. суммарный транспорт анионов, но в первую очередь выход хлорид-ионов из пыльцевого зерна (Breugina et al. 2010а). Мы также предположили, что DIDS в пыльцевой трубке действует на другие мишени, нежели NPPB, причем это могли быть как анионные каналы плазмалеммы, так и

каналы, локализованные в мембранах органелл. Это предположение было проверено в экспериментах с выделенными митохондриями (Брейгина et al. 2010).

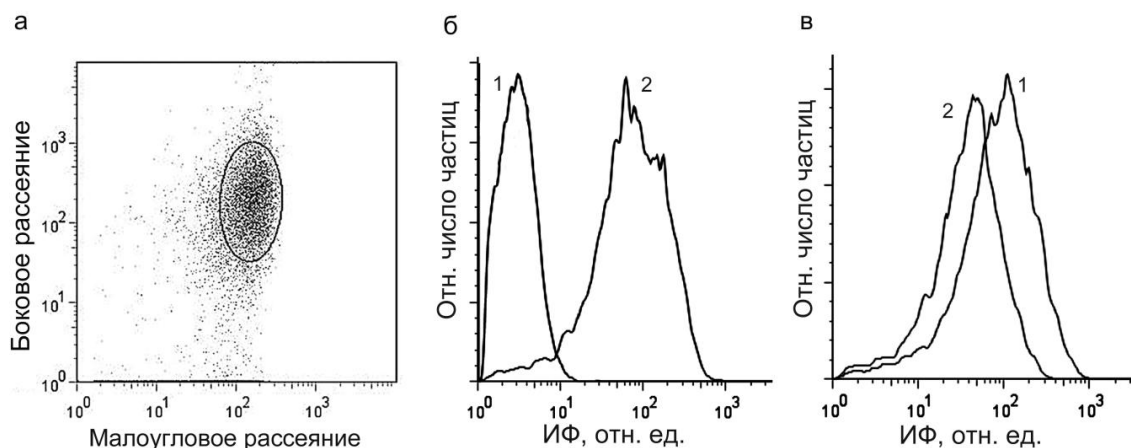


Рисунок 27. Выделение популяции митохондрий, анализируемой с помощью проточной цитометрии, и оценка жизнеспособности органелл: а – популяция митохондрий, выделенная на диаграмме малоуглового и бокового рассеяния; б – распределение по интенсивности флуоресценции (ИФ) неокрашенных митохондрий (1) и митохондрий, окрашенных NAO (2); в – деполаризация (2) по сравнению с контролем (1) в ответ на добавление разобщителя электрон-транспортной цепи CCCP.

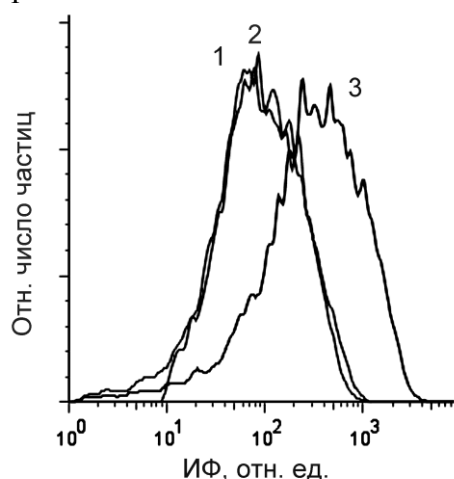


Рисунок 28. Действие ингибиторов анионных каналов на мембранный потенциал изолированных митохондрий, изменения которого интенсивность их окрашивания DiOC<sub>5</sub>(3). Распределения митохондрий по интенсивности флуоресценции (ИФ) в контрольных пробах (1), в присутствии 40 μM NPPB (2) или 80 μM DIDS (3).

Популяцию частиц для анализа выделяли с использованием показателей бокового и прямого (малоуглового) рассеяния, а также сигнала от митохондриального красителя NAO, нечувствительного к изменениям потенциала (

Рисунок 27а,б). Популяция изолированных митохондрий обладала определенными параметрами, стабильными во всех анализируемых пробах. О функциональном состоянии органелл судили по их окрашиванию потенциал-зависимым красителем DiOC<sub>5</sub>(3) и по деполаризации в ответ на добавление разобщителя дыхательной цепи CCCP (20 μM) (

Рисунок 27в).

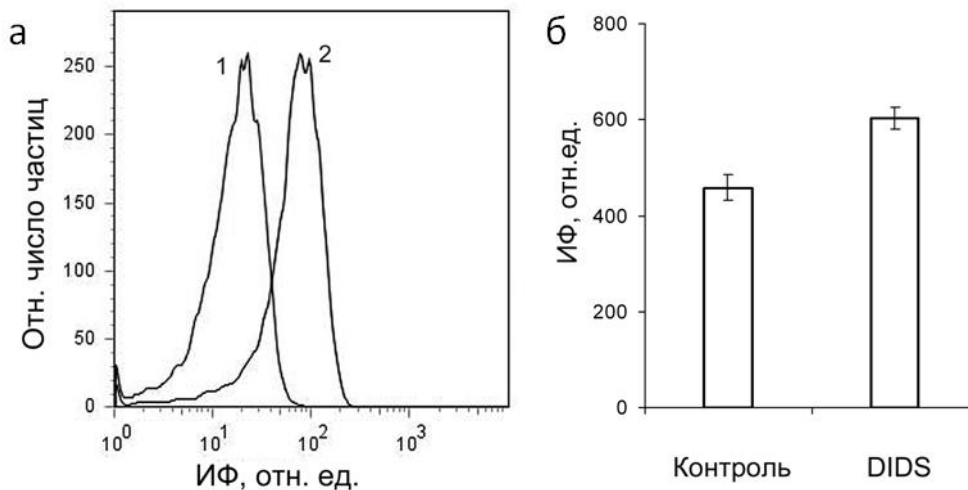


Рисунок 29. Действие DIDS на содержание АФК в изолированных митохондриях (а) и выход из них АФК в окружающий раствор (б): а – внутримитохондриальные АФК выявляли с помощью проточной цитометрии (окрашивание DCFH-DA): (1) – распределение митохондрий по интенсивности флуоресценции (ИФ) в присутствии 80  $\mu$ M DIDS, (2) – распределение митохондрий в контроле; б – выход АФК в раствор обнаруживали по увеличению интенсивности флуоресценции DCFH методом кюветной флуориметрии.

Определить значение анионных каналов митохондрий для функционирования этих органелл удалось с помощью ингибиторного анализа. Известно, что процессы, протекающие в митохондриях, сопряжены с созданием на их внутренней мембране отрицательного заряда, а также с генерацией АФК, что особенно важно для выполнения прорастающим пыльцевым зерном генеративных функций (Deng et al. 2012; Nie et al. 2020). О потенциале на внутренней митохондриальной мембране судили по интенсивности флуоресценции митохондрий, окрашенных DiOC<sub>5</sub>(3) и обнаружили, что этот показатель не изменялся в присутствии NPPB, а DIDS вызывал увеличение интенсивности флуоресценции митохондрий, т.е., гиперполяризацию мембраны (Рисунок 28). Окрашивание митохондрий АФК-чувствительным красителем DCFH показало, что в присутствии DIDS существенно изменялось содержание АФК как в изолированных митохондриях (

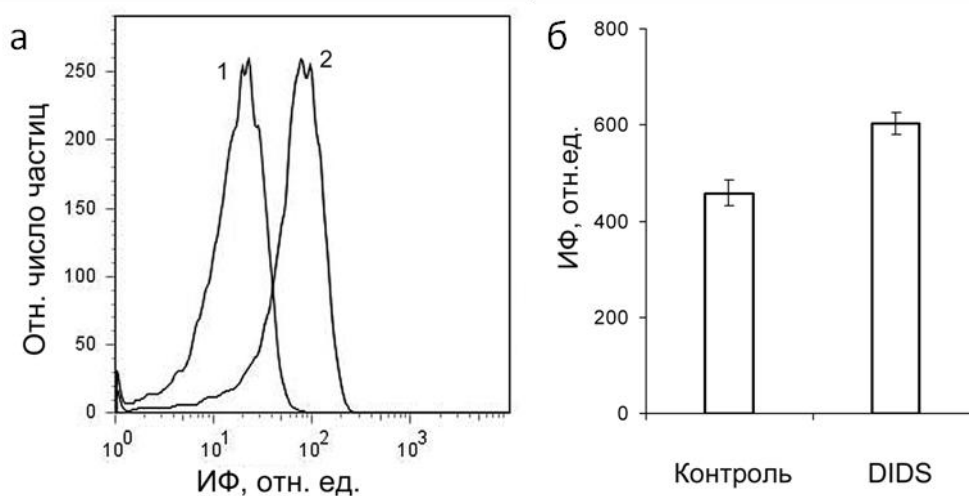




Рисунок 29а), так и в окружающем растворе (

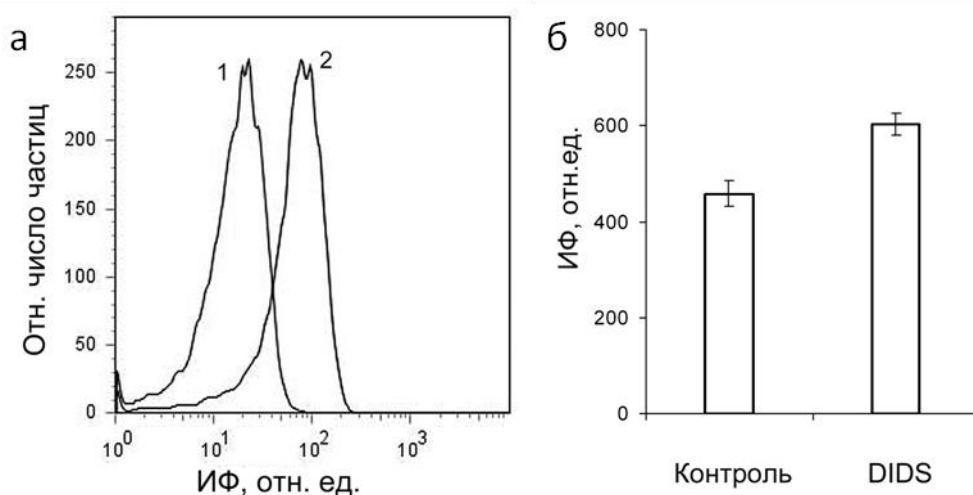


Рисунок 29б), что говорит об активной генерации АФК и может указывать на их выделение в цитоплазму при изменении активности анионных каналов органелл.

В целом полученные на изолированных митохондриях данные указывают на присутствие в этих органеллах DIDS-чувствительных анионных каналов. В то же время, полученный результат позволил исключить участие анионных каналов митохондрий в реализации эффектов NPPВ на пыльцевые зёрна и трубки (Брейгина et al. 2010).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что гидратация пыльцевого зерна сопровождается выходом из него ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  (и, возможно, других анионов). Важную роль в этих процессах играют NPPВ-чувствительные анионные каналы, а также калиевые каналы. При этом активность как калиевых, так и анионных каналов необходима для эффективной осморегуляции и перехода пыльцевых зерен из состояния покоя к активному метаболизму и полярному росту. Важное значение также имеет активность внутриклеточных DIDS-чувствительных анионных каналов.

В совокупности перемещение через мембрану  $K^+$  и  $Cl^-$  создает электрохимический потенциал, который может, соответственно, изменяться в ходе прорастания пыльцевого зерна. Поскольку мембранный потенциал является важным физиологическим показателем, а также доступен для изучения, мы анализировали изменения этого параметра в ходе активации и прорастания пыльцевых зёрен *in vitro*.

В экспериментах по изучению активации пыльцы табака мы измеряли мембранный потенциал в двух точках, соответствующих началу активации пыльцевого зерна табака (10 минут инкубации *in vitro*) и ее завершению (30 минут). Для этой цели использовался медленный краситель DiBAC<sub>4</sub>(3), который позволяет вычислять абсолютную величину потенциала, но не предназначен для картирования и выявления быстрых сдвигов, так как принцип его работы

основан на процессах диффузии. Величина мембранного потенциала в ходе активации двигалась в сторону отрицательных значений (Рисунок 30) (Брейгина et al. 2009b).

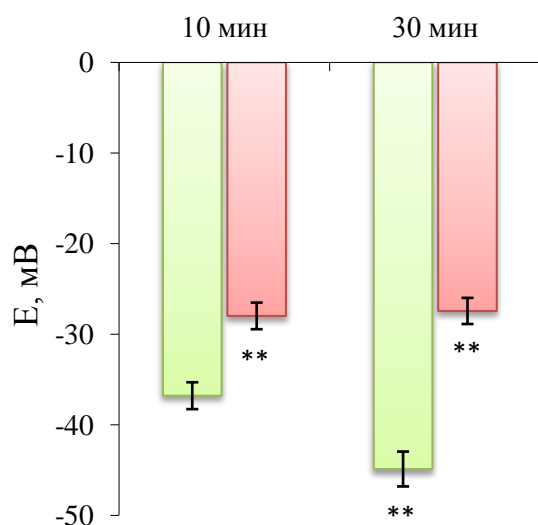


Рисунок 30. Гиперполяризация плазматической мембраны вегетативной клетки в процессе активации пыльцевого зерна табака (после 10 и 30 мин инкубации пыльцы *in vitro*), выявленная с помощью медленного красителя DiBAC<sub>4</sub>(3), и ее подавление под действием NPPB. E – величина потенциала на плазматической мембране вегетативной клетки пыльцевого зерна. Зеленые столбики – контроль, малиновые – добавлен 40 мМ NPPB.

Выявленные изменения мембранного потенциала в процессе активации пыльцевого зерна (Рисунок 30) можно связать с увеличением активности Н<sup>+</sup>-АТФазы плазматической мембраны (Sze et al. 2006; Falhof et al. 2016). В пользу этого предположения свидетельствуют данные литературы об изменениях рН в ходе активации пыльцевого зерна. Показано, что внутриклеточный рН вегетативной клетки сдвигается в сторону щелочных значений (Матвеева et al. 2002), а внеклеточный рН – в сторону кислых значений (Rodriguez-Rosales et al. 1989). Установлено также, что воздействия, ингибирующие (ортованадат) или стимулирующие (фузикоцин) работу Н<sup>+</sup>-АТФазы, соответствующим образом изменяют эффективность прорастания пыльцы (Rodriguez-Rosales et al. 1989).

Под действием NPPB в гидратированном и активированном пыльцевом зерне происходила деполяризация мембраны (Рисунок 30), а гиперполяризация, сопутствующая активации метаболизма в контрольных зёрнах, отсутствовала (Брейгина et al. 2009a). Скорее всего, данный эффект является опосредованным, поскольку блокирование выхода анионов, напротив, могло бы вызвать гиперполяризацию. По-видимому, в условиях полного блокирования выхода анионов блокируется активации метаболизма в пыльцевых зёрнах, а деполяризация является маркером этого нарушения. Следствием же является то, что пыльца не прорастает.

Таблица 5. Величина мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна, определенная с помощью медленного красителя DiBAC<sub>4</sub>(3).

Объект		Величина мембранного потенциала, мВ
Непроросшее пыльцевое зерно	табака	$-37 \pm 1,5$
	лилии	$-23 \pm 1,0$
Пыльцевая трубка табака	апикальная часть	$-61 \pm 3,0$
	на расстоянии 25 $\mu$ м от кончика	$-80 \pm 4,0$

Проведенный нами сравнительный анализ пыльцевых зерен табака и лилии, а также протопластов (Таблица 5), выявил видовые различия, которые, однако, могут быть связаны и с более медленным процессом активации у лилии – трубки у нее появляются позднее, чем у табака, хотя и растут быстрее. Кроме того, у лилии низкий процент прорастания, поэтому часть зёрен заведомо не прорастёт. В пыльцевой трубке мембрана была еще более гиперполяризована, чем в пыльцевом зерне (Таблица 5), причем значения для разных частей трубки различались: апикальная часть была деполяризована относительно стержневой части. Этот факт был обнаружен впервые, и мы решили изучить распределение мембранного потенциала вдоль трубки подробнее. С этой целью было проведено картирование с помощью другого метода, а именно окрашивания быстрым ратиометрическим потенциал-зависимым красителем Di-4-ANEPPS, которое будет рассмотрено в Разделе IV.3. Рост пыльцевой трубки.

## IV.2. Начальные этапы прорастания у ели

Для изучения динамики ионного гомеостаза в пыльцевых зёрнах ели применяли в основном те же подходы, которые ранее позволили изучить активацию у табака. Одним из основных показателей активации метаболизма является уровень дыхания. Поглощение кислорода пыльцевыми зёрнами ели не регистрировалось после 30 минут инкубации, незначительно возрастало после 2 часов, сильно возрастало после 6 часов и достигало пика после 9 часов, а далее несколько снижалось, оставаясь на уровне 6 часов (Рисунок 31а). Таким образом, наибольшего потребления кислорода требует процесс выхода пыльцевой трубки из зерна, когда образуются крупные разрывы и происходит запуск полярного роста (Breuquina et al. 2020).

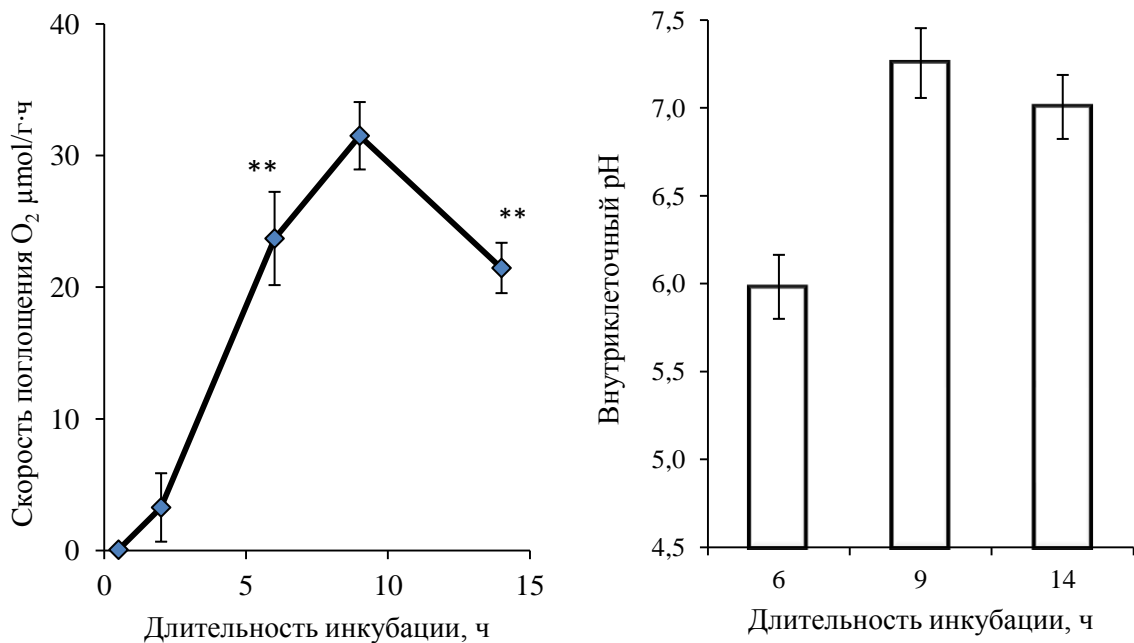


Рисунок 31. Динамика активации в пыльцевых зёрнах ели (*Picea pungens*): а – изменения скорости поглощения кислорода по данным полярографии; б – изменение внутриклеточного рН по результатам окрашивания ратиометрическим красителем BCECF в суспензии пыльцевых зерен.

Интересно сравнить эту динамику с таковой для покрытосеменных растений, например, для лилии: у лилии поглощение кислорода фиксируется после 10 минут инкубации, резко возрастает примерно до 30 минут, а затем замедляется (Dickinson 1965). При этом пыльцевые трубки у лилии появляются примерно после 50-60 минут инкубации, то есть замедление происходит до начала роста трубок. Противоположная тенденция была отмечена у горной сосны (*Pinus mugo*), которая, как и другие сосны, характеризуется очень медленным прорастанием даже по сравнению с елью (Nygaard 1969): поглощение кислорода также происходило с разной скоростью, но до появления трубок оно было меньше, а после – усиливалось. Похоже, паттерн поглощения кислорода достаточно сильно отличается у растений разных видов. По данным литературы, на это сильно влияет клеточный состав пыльцевого зерна, т.е. стадия развития, на которой находится мужской гаметофит: у трехклеточной и двухклеточной пыльцы цветковых растений динамика дыхания различается очень сильно (Hoekstra and Bruinsma 1975).

Параллельно с активацией дыхания у ели происходят изменения рН цитоплазмы. К сожалению, измерить внутриклеточный рН до появления разрывов экзины не представляется возможным из-за плотной оболочки и отсутствия апертур, но окрашивание позволило оценить изменения, которые происходят после появления первых разрывов. Оказалось, что после 6 часов рН еще находится далеко в кислой области (6.0), но к 9 часам происходит существенное защелачивание, и после 9 и 14 часов рН достигает 7.2 и 7.0, соответственно (Рисунок 31б), т.е. значений, типичных для цитоплазмы растительной клетки в состоянии активного метаболизма

(Taiz et al. 2015). На табаке динамика внутриклеточного рН была исследована сотрудниками нашей лаборатории более 15 лет назад. Для табака также характерно защелачивание цитоплазмы, которое происходит параллельно с активацией дыхания и также свидетельствует об интенсификации метаболизма (Матвеева et al. 2003a). Основными участниками данного процесса считаются  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы и альтернативная оксидаза (Матвеева et al. 2002).

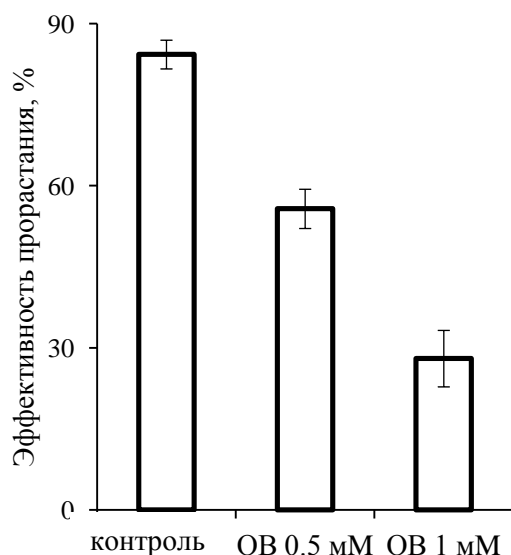


Рисунок 32. Действие на эффективность прорастания ели (*Picea pungens*) ингибитора  $H^+$ -АТФазы ортованадата натрия (ОВ). Время инкубации – 20 ч.

Об изменениях внутриклеточного рН в пыльце голосеменных растений данных в литературе нет. Чтобы проверить значимость вклада протонной помпы в ранние изменения ионного гомеостаза, предшествующие прорастанию, мы инкубировали пыльцу ели в присутствии ингибитора АТФаз Р-типа ортованадата натрия (

Рисунок 32). При этом было выявлено ингибирующее действие ортованадата с концентрационной зависимостью, которое доказало роль  $H^+$ -АТФазы в прорастании пыльцевых зёрен. Дальнейшие наши эксперименты, доказывающие её участие в росте пыльцевой трубки, будут обсуждены в Разделе IV.3. Рост пыльцевой трубки.

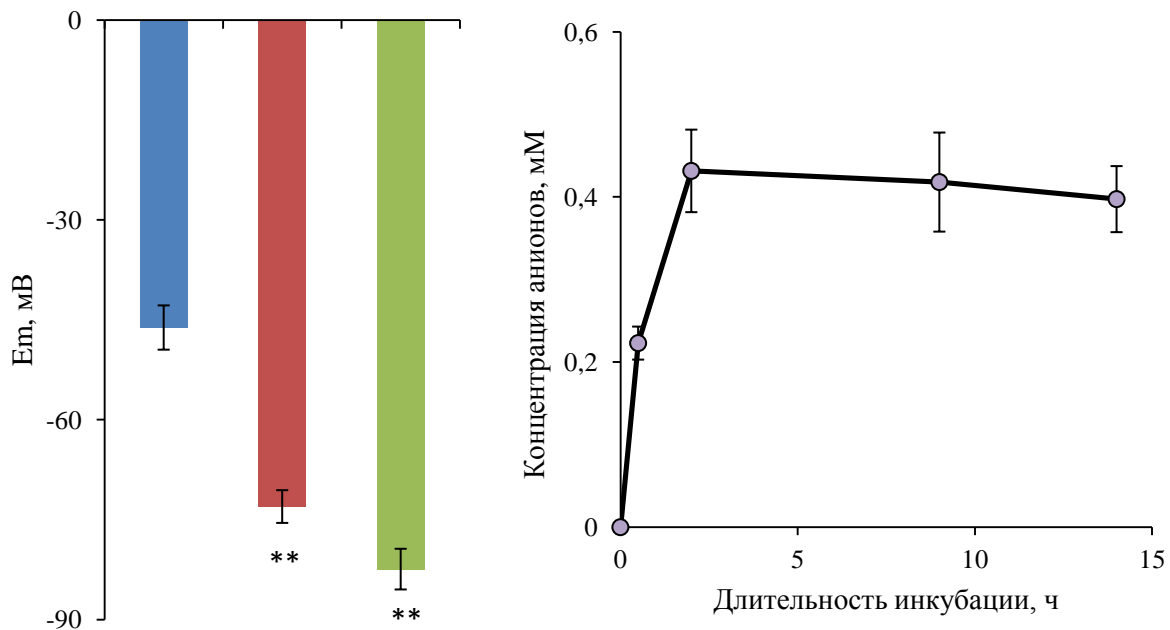


Рисунок 33. Динамика: а – мембранного потенциала; б – выхода анионов из пыльцевых зёрен ели в процессе активации. Мембранный потенциал измерен оптическим методом с красителем DiBAC<sub>4</sub>(3), анионы – с использованием внеклеточного сенсора MEQ. Время инкубации пыльцы ели – 2, 9 и 14 часов (синий, красный и зелёный столбцы, соответственно).

Поскольку параллельно с защелачиванием цитоплазмы H<sup>+</sup>-АТФаза плазмалеммы создает и мембранный потенциал, мы предполагали увидеть гиперполяризацию, которая проходила бы в тех же временных рамках. Действительно, оказалось, что в пыльцевых зернах в процессе активации происходит гиперполяризация плазмалеммы (Рисунок 33а): 6 часов – первая точка, которую удалось измерить из-за разрывов в экзине, – соответствовала -46 мВ, на 9 часов потенциал уже достигал -73 мВ, после 14 часов составлял -82 мВ. Сравнивая эту динамику с таковой у табака и лилии (Рисунок 30, Таблица 5), мы видим, что у ели потенциал меняется сильнее до выхода трубки, хотя значения относительно близки. Сопоставив наблюдаемую динамику с изменениями внутриклеточного рН, мы можем заключить, что если потенциал возрастает в интервале 9-14 часов, то рН уже не меняется, а дыхание даже несколько снижается в этот период. Интересная закономерность, которая также наблюдается у табака и лилии, по-видимому, свидетельствует о комплексном характере регуляции мембранного потенциала, который представляет собой сумму активностей целого ряда ион-транспортных систем, одной из которых, по крайней мере, в пыльце цветковых растений, являются анионные каналы.

Внутренним изменениям, типичным для активации метаболизма, предшествовали изменения ионного статуса. С помощью внеклеточного флуоресцентного индикатора MEQ был обнаружен выход анионов из пыльцевых зерен, предшествующий активации: через 30 минут уровень внеклеточных анионов был уже существенно выше, а после 2 часов инкубации возрастал еще в 2 раза, и далее не изменялся (Рисунок 33б). Таким образом, у ели, как и у

табака (Рисунок 21), выход анионов завершается до начала прорастания. Это свидетельствует о принципиальном сходстве ионного транспорта в процессе активации мужского гаметофита у цветковых и хвойных растений.

### IV.3. Рост пыльцевой трубки

Пыльцевая трубка – полярная структура и неравномерно распределенными ионными токами (Guan et al. 2013; Malhó et al. 2015). Предположения о существовании градиента мембранного потенциала высказывались в литературе (Holdaway-Clarke and Hepler 2003; Robinson and Messerli 2003), поскольку к тому моменту уже было известно о неравномерном распределении некоторых ион-транспортных белков и ключевых ионных токов, однако экспериментального подхода к проверке этого предположения тогда не нашли. Мы впервые обнаружили признаки такого градиента в ходе анализа пыльцевых трубок, окрашенных DiBAC<sub>4</sub>(3) (Таблица 5): апикальная часть была деполяризована относительно стержневой части. Поскольку пыльцевая трубка – полярная структура, в отличие от протопласта, и в то же время она покрыта жесткой клеточной стенкой, разрыв которой неизбежно ведет к прекращению роста, измерение потенциала оптическим методом – единственный адекватный подход к решению такого рода задачи. Для экспериментальной проверки существования мембранного потенциала нами был разработан метод «мембранного картирования» с помощью быстрого ратиометрического потенциал-чувствительного красителя Di-4-ANEPPS, который ранее не применялся для исследования клеток растений. Первым модельным объектом стал мужской гаметофит табака. Подробно метод описан в разделе Материалов и методов «Флуоресцентная широкополосная микроскопия», вкратце: красная флуоресценция возбуждается в синем (Fb) и красном (Fg) диапазоне, отношение одного канала к другому Fb/Fg пропорционально величине мембранного потенциала, что было неоднократно показано нами в предварительных исследованиях на протопластах (Брейгина et al. 2009b).

Отношение Fb/Fg на плазмалемме пыльцевой трубки существенно снижается на участке 3 – 20 мкм от апикальной части, что демонстрирует градиентную гиперполяризацию (самый апекс 0 – 3 мкм мы не измеряли, так как быстрый эндоцитоз мембранного материала не позволял провести измерительную кривую четко по мембране). В следующей зоне, на расстоянии 21 – 35 мкм от апекса, показатель выходил на плато (Рисунок 34). Полученный результат соответствовал наблюдениям, ранее сделанным на трубках, окрашенных DiBAC<sub>4</sub>(3) (Таблица 5). Данные, полученные независимых подходов, убедительно показали существование в пыльцевых трубках табака градиента трансмембранного потенциала (Брейгина et al. 2009b).

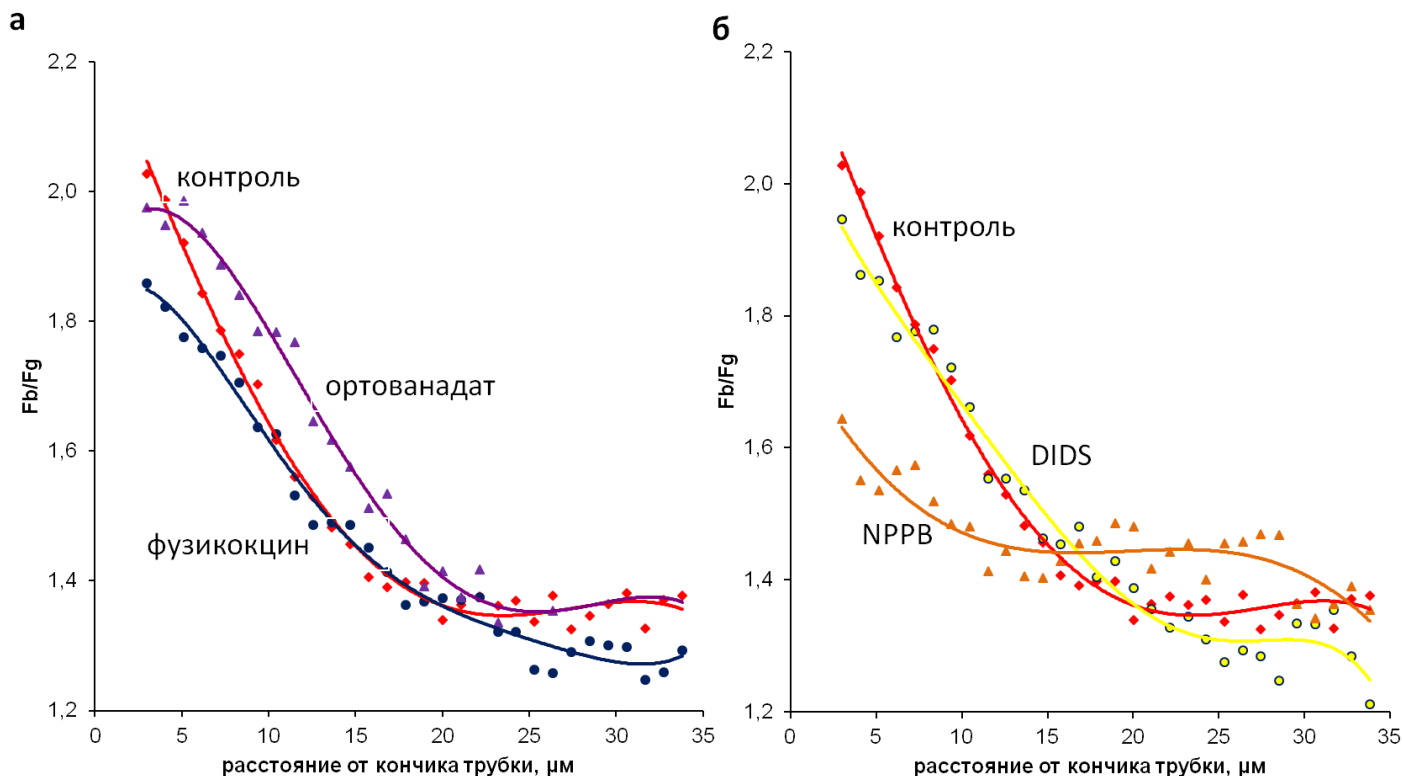


Рисунок 34. Продольный градиент трансмембранного потенциала в пыльцевой трубке табака, выявленный с помощью окрашивания Di-4-ANEPPS. а – влияние на градиент модуляторов активности  $H^+$ -АТФазы (1 мМ ортованадат, 1  $\mu$ М фузикокцин); б – влияние на градиент ингибиторов анионных каналов (20  $\mu$ М DIDS, 40  $\mu$ М NPPB). Отношение Fb/Fg пропорционально величине мембранного потенциала, причем более высокие значения соответствуют деполяризации, а более низкие – гиперполяризации; Fb и Fg – интенсивности флуоресценции при возбуждении в синей и зеленой областях спектра, соответственно.

Поскольку очевидно, что обнаруженный градиент мембранного потенциала поддерживается благодаря работе ион-транспортных систем, мы проверили вклад двух из них, участие которых в регуляции этого показателя было наиболее вероятно:  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы и анионных каналов. Следует отметить, что распределение на мембране пыльцевой трубки белка протонной помпы хорошо соответствует обнаруженному нами градиенту (Cortal et al. 2008), как и описанному ранее градиенту pH (Feijó et al. 1999). О влиянии же анионных каналов на мембранный потенциал мы уже могли судить на основании опытов с пыльцевыми зёрнами (Рисунок 30).

Для установления вклада  $H^+$ -АТФазы в поддержание градиента мембранного потенциала мы изучали влияние на него фузикокцина (1  $\mu$ М), стимулирующего работу протонной помпы, и ее ингибитора ортованадата (1 мМ). Оба воздействия изменяли форму кривой (Рисунок 34а). Фузикокцин вызывал гиперполяризацию в зоне, наиболее близкой к апексу из тех, что мы могли проанализировать ( $p < 0.05$ ), ортованадат – деполяризацию в субапикальной и стержневой части трубки до выхода на плато ( $p < 0.05$ ); по данным литературы, плотность протонных помп в субапикальной зоне наиболее велика (Cortal et al. 2008). Градиент потенциала сохранял свою



форму в обоих случаях. Эксперименты с добавлением к трубкам NPPB в концентрации, которая подавляла гиперполяризацию в ходе активации пыльцевого зерна, и DIDS в концентрации, вызывавшей набухание трубок, показали, что NPPB полностью нивелирует градиент мембранного потенциала, а DIDS на него достоверно не влияет (Рисунок 34б).

Эти данные подтверждают участие протонной помпы и NPPB-чувствительных анионных каналов в регуляции мембранного потенциала в пыльцевой трубке, причем анионные каналы выступают в качестве ключевого фактора поддержания градиента. Отсутствие влияния DIDS служит ещё одним подтверждением того, что мишенями для DIDS и NPPB в пыльцевой трубке являются различные по функциям и, возможно, локализации анионные каналы.

В пыльцевых трубках лилии градиент мембранного потенциала также был обнаружен (Podolyan et al. 2019), он был сходным с таковым у табака и будет рассмотрен ниже в связи с регуляторными эффектами АФК (V.4 Действие различных АФК на градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке *in vitro*).

Третий объект, в котором мы обнаружили градиент мембранного потенциала – пыльцевая трубка ели. Поскольку ель – объект с более древним типом полярного роста, было неочевидно, присутствует ли в нём градиент мембранного потенциала, и если да, то какие ион-транспортные системы участвуют в его поддержании. Оказалось, что градиент в растущих трубках ели присутствует, причем он значительно менее крутой, чем у табака, и в целом его форма отличается (Maksimov et al. 2018); как и у последнего, однако, кончик деполяризован относительно стержневой части трубки (Рисунок 35). На основании полученных результатов мы можем заключить, что градиент мембранного потенциала является достаточно консервативной особенностью полярно растущих клеток, которая появилась в эволюции относительно давно.

Чтобы выяснить, какие ион-транспортные системы участвуют в поддержании градиента, мы применили ингибиторный анализ и те блокаторы, которые ранее использовали для воздействия на мужской гаметофит цветковых растений: хлорид лантана для кальций-проводящих каналов, NPPB для анионных каналов, ТЕА для калиевых каналов, ортованадат натрия для  $H^+$ -АТФазы.

Мы показали, что все ингибиторы действовали на величину мембранного потенциала, причем все, кроме ортованадата, полностью нивелировали градиент (Рисунок 35). Как и у табака, ортованадат натрия вызывал деполяризацию; NPPB, наоборот, вызывал гиперполяризацию. Такой же эффект вызывали ТЕА и  $LaCl_3$ , которые не использовались в опытах с мембранным потенциалом у табака. Обнаруженные закономерности укладываются в существующие представления: ингибирование входных калиевых токов и выходных анионных токов сдвигает мембранный потенциал в сторону более отрицательных значений. Кальций-

проводящие каналы, по данным литературы, из-за небольшого суммарного тока не регулируют мембранный потенциал напрямую, однако, если учитывать их функцию в качестве регулятора ионного транспорта и клеточного метаболизма, эффект  $\text{La}^{3+}$  можно объяснить опосредованным действием (Feijó and Wudick 2018). Поскольку для нашего объекта эффекты ингибиторов кальциевых и анионных каналов очень сходны, можно представить, что в реализации эффекта лантана задействованы анионные каналы, которые, как было показано, регулируются уровнем кальция (Tavares et al. 2011).

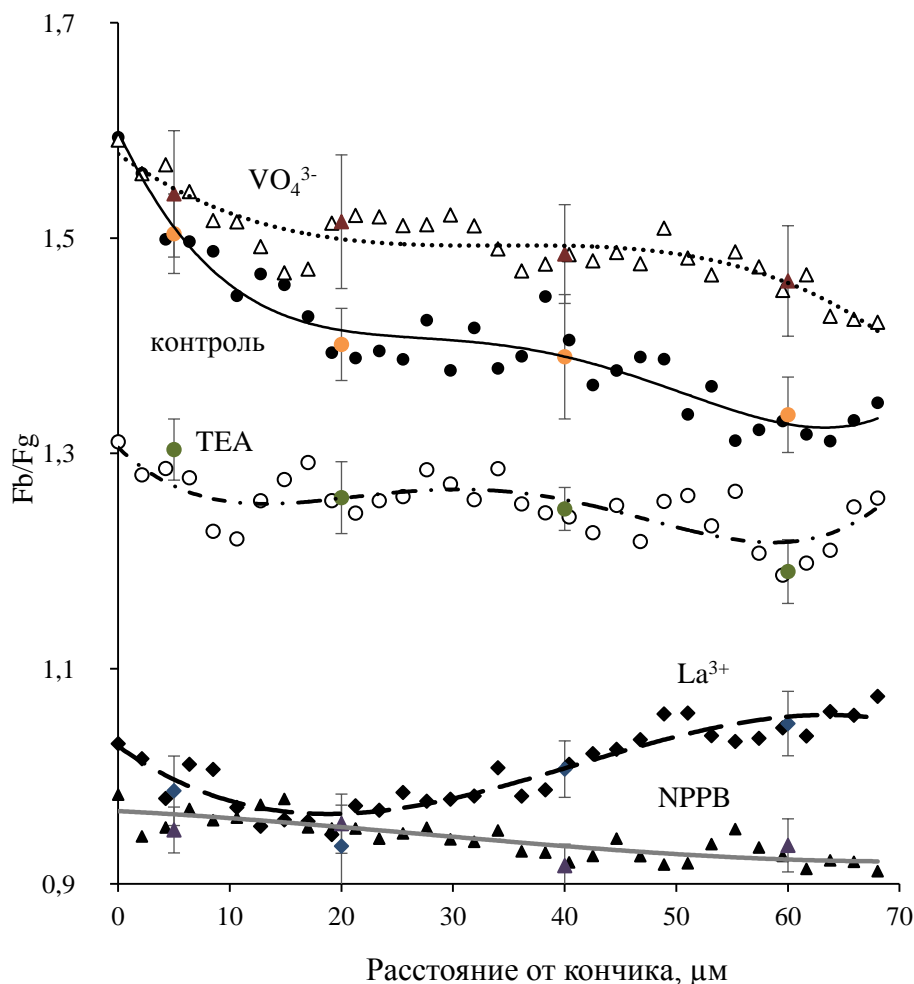


Рисунок 35. Продольный градиент трансмембранного потенциала в пыльцевой трубке ели колючей, выявленный с помощью окрашивания Di-4-ANEPPS. Влияние на градиент ингибиторов ионного транспорта: 100  $\mu\text{M}$  ортованадат, 40  $\mu\text{M}$  NPPB, 10 мМ ТЕА, 100  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ . Отношение  $F_b/F_g$  пропорционально величине мембранного потенциала, причем более высокие значения соответствуют деполяризации, а более низкие – гиперполяризации;  $F_b$  и  $F_g$  – интенсивности флуоресценции при возбуждении в синей и зеленой областях спектра, соответственно.

По данным ингибиторного анализа, которые были рассмотрены выше,  $\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы выступает в качестве важного регулятора, поддерживающего неравномерное распределение мембранного потенциала, как у табака, так и у ели. На цветковых растениях было показано, что этот фермент локализован в стержневой части трубки (Cortal et al. 2008; Hoffmann et al. 2020), у некоторых видов – преимущественно в субапикальной зоне (Ковалева et

al. 2016), что согласуется с распределением протонных токов, градиентом рН (Feijó et al. 1999; Podolyan et al. 2019) и нашими данными по мембранному потенциалу (Рисунок 34). Однако, ничего из этого не было показано для голосеменных растений, у которых распределение ион-транспортных систем на плазмалемме трубки могло быть принципиально иным.

Важность протонной помпы для эффективного прорастания мужского гаметофита у голосеменных растений ранее не изучалась. На нашем модельном объекте – пыльце ели – мы проверили, насколько снижается процент проросших зёрен в присутствии ортованадата. Сильный отрицательный эффект с выраженной концентрационной зависимостью показал, что активность  $H^+$ -АТФазы важна для прорастания пыльцевых зёрен, изученных на данный момент, включая ель (Рисунок 36а).

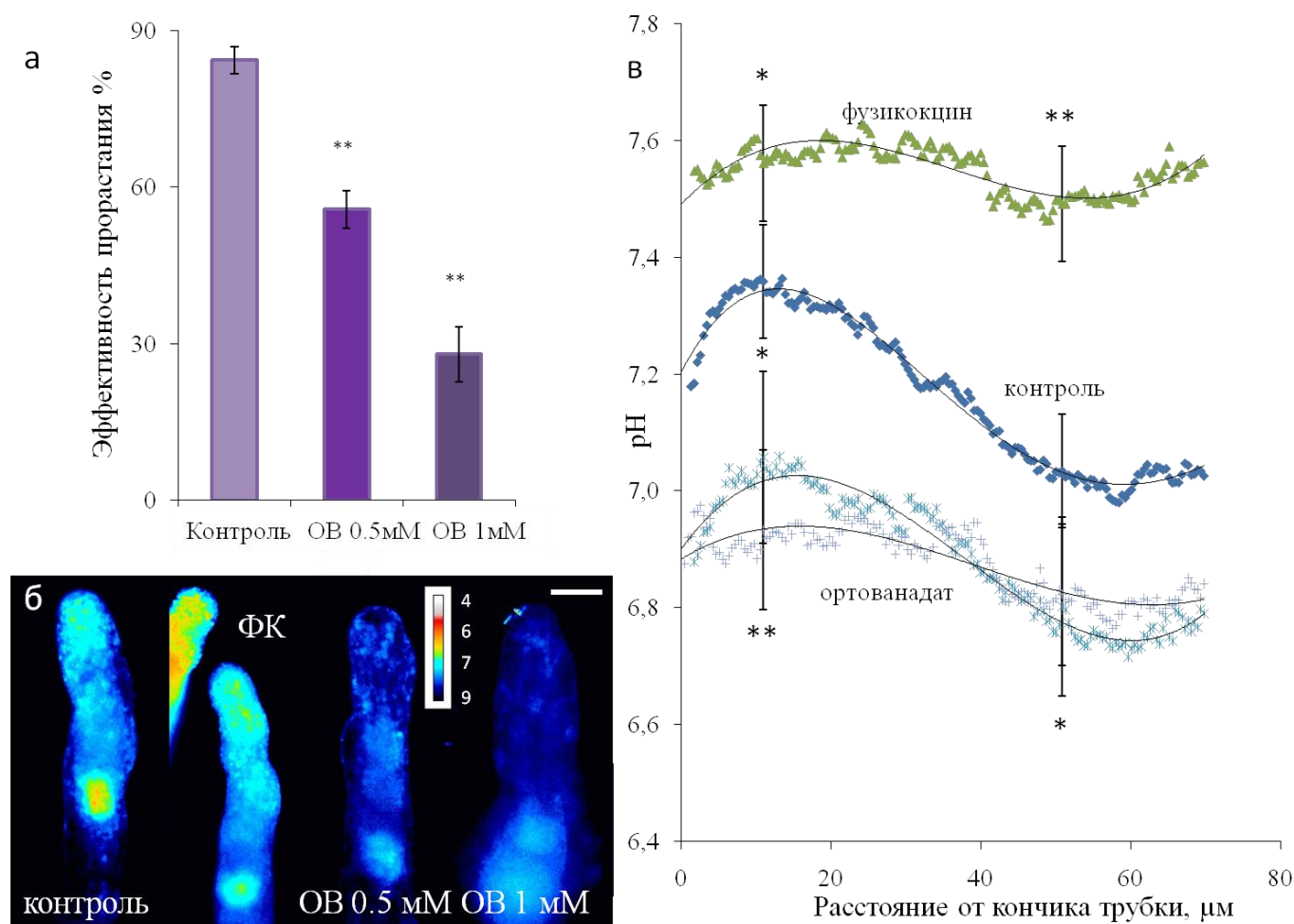


Рисунок 36. Внутриклеточный рН в пыльцевых трубках ели (*Picea pungens*). а – влияние ортованадата на эффективность прорастания; б – распределение рН в типичных пыльцевых трубках, обработанных ингибитором  $H^+$ -АТФазы ортованадатом (ОВ) и активатором фузикоцином (ФК); в – распределение рН в пыльцевых трубках, обработанных ОВ и ФК. Каждая кривая представляет собой среднее значение для 21-53 пыльцевых трубок. Статистика показана для 2 точек – 10 и 50  $\mu\text{m}$  от кончика. Масштабная линейка – 20  $\mu\text{m}$ .

Мы использовали рН-чувствительное ратиометрическое окрашивание BCECF для оценки внутриклеточного распределения рН в пыльцевых трубках и выявления возможных эффектов ингибитора и активатора  $H^+$ -АТФазы на это распределение. Мы обнаружили градиент

pH с максимумом в апикальной области ( $7,36 \pm 0,10$ ) и нейтральным плато в стержневой части ( $7,03 \pm 0,11$ ) (Рисунок 36б). Участие протонной помпы в поддержании градиента было продемонстрировано с использованием ортованадата и фузикоцина: оба воздействия изменяли форму градиента. Ванадат вызывал закисление цитоплазмы пыльцевой трубки, которое было значительным в апикальной области (10  $\mu\text{m}$  от кончика); обе концентрации (500  $\mu\text{M}$  и 1 мМ) имели сходный эффект. ФК вызывал противоположный эффект – защелачивание, которое было более выражено в дистальной части трубки (50  $\mu\text{m}$  от кончика). Оба действия приводили к выравниванию pH по длине трубки, то есть к диссипации градиента. Таким образом, поддержание градиента в значительной степени является результатом активности  $\text{H}^+$ -АТФазы (Breygina et al. 2020).

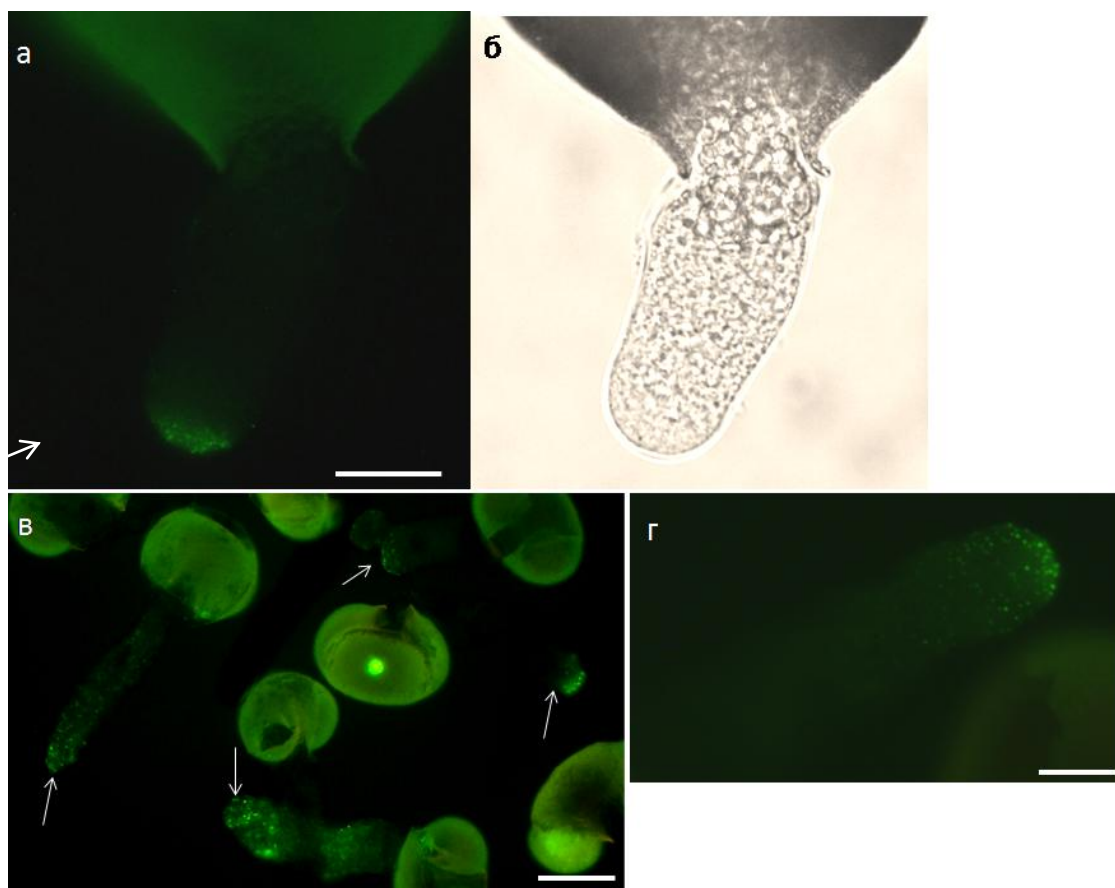


Рисунок 37. Иммунолокализация  $\text{H}^+$ -АТФазы в пыльцевых трубках *Picea*: а – короткая пыльцевая трубка с флуоресцентным сигналом, локализованным в апикальной зоне; б – та же трубка в светлом поле; в – суспензия с более длинными пыльцевыми трубками; г – типичная пыльцевая трубка с выраженным флуоресцентным сигналом вблизи кончика трубки. Масштабная линейка – 20  $\mu\text{m}$ .

Изучение расположения  $\text{H}^+$ -АТФазы в пыльцевой трубке ели с помощью флуоресцентно-меченых антител показало ее преимущественно апикальную локализацию в коротких и более длинных пыльцевых трубках (Рисунок 37). Эта картина хорошо согласуется с профилем pH в пыльцевых трубках той же длины (Рисунок 36): щелочная часть трубки соответствует максимальной плотности фермента на плазмалемме, за исключением первых 3  $\mu\text{m}$ , где,

предположительно, активность  $H^+$ -АТФазы подавляется высокой концентрацией кальция. В трубках, обработанных фузикоцином, эта зона отсутствует, так как благодаря токсину помпа становится невосприимчива к ингибирующим действиям.

В соответствии со стандартами экспериментов по иммулокализации, специфичность первичных антител была проверена в опытах с «пре-сывороткой»: пыльцевые трубки из той же суспензии обрабатывали одновременно сывороткой крови кроликов до иммунизации (Рисунок 38а, б) и иммунной сывороткой против  $H^+$ -АТФазы, а затем в обоих случаях вторичными антителами. В первом случае флуоресценция в пыльцевых трубках не обнаруживалась, а во втором случае мы видим окрашивание почти во всех пыльцевых трубках (Рисунок 38в). Эксперименты с плазмоллизированными пыльцевыми трубками показали отсутствие окрашивания апопласта/клеточной стенки (Рисунок 38г, д) и окрашивание плазматической мембраны и, возможно, экзоцитарных везикул, содержащих  $H^+$ -АТФазу (Breygina et al. 2020).

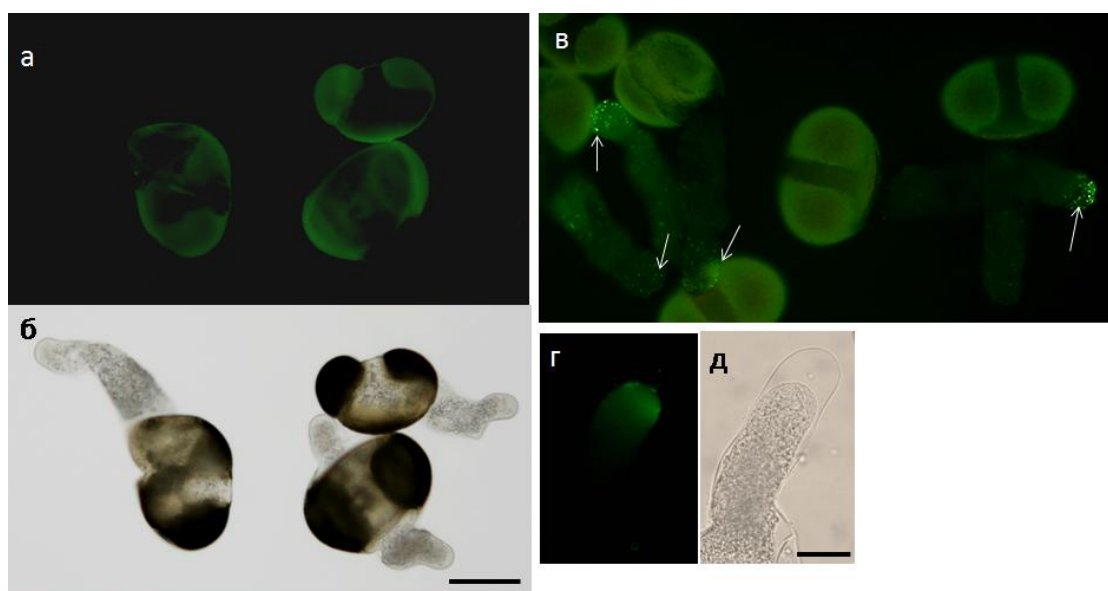


Рисунок 38. Проверка антител на специфичность. а – суспензия пыльцевых зёрен, обработанная преиммунной кроличьей сывороткой + козьими вторичными антителами против кролика, мечеными AlexaFluor, сигнал в пыльцевых трубках не обнаружен, только слабая автофлуоресценция экзины; б – та же пыльца в светлом поле; в – суспензия, обработанная первичными кроличьими антителами против  $H^+$ -АТФазы + козьими вторичными антителами против кролика, мечеными AlexaFluor. Флуоресцентный сигнал можно увидеть почти во всех пыльцевых трубках; г, д – плазмоллизированная пыльцевая трубка, в которой видна локализация сигнала на плазмалемме трубки в апикальной части (фокус на клеточной стенке). Масштабная линейка – 50  $\mu$ м (а-в) и 20  $\mu$ м (г, д).

Таким образом, мы обнаружили, что градиент рН в пыльцевых трубках имеет важные отличия от такового у цветковых растений: если у последних он характеризуется довольно сложной формой: рН на кончике кислый, в субапикальной области – щелочная полоса, в остальной части трубки рН близок к нейтральным значениям (Feijó et al. 1999; Podolyan et al. 2019), то у ели максимум рН примыкает к апикальной области, а в стержневой части трубки рН нейтральный. Это различие согласуется с наблюдаемой локализацией  $H^+$ -АТФазы у *Picea*:

самая высокая плотность белка наблюдалась в апикальной зоне, в то время как у *Arabidopsis* и табака белок был исключен из кончика (Certal et al. 2008; Hoffmann et al. 2020), а у петунии максимальное накопление было в субапикальной области (Ковалева et al. 2016).

Данные по распределению рН, мембранного потенциала и белка протонной помпы у ели хорошо согласуются друг с другом и с чувствительностью обоих показателей к ортованадату (Maksimov et al. 2018; Vreygina et al. 2020). Таким образом, в пыльцевой трубке ели  $H^+$ -АТФаза плазматической мембраны выполняет те же основные функции (поддержание градиента рН в цитоплазме и градиента мембранного потенциала на плазмалемме), что и у цветковых растений (Certal et al. 2008; Lang et al. 2014; Hoffmann et al. 2020), но характер распределения фермента резко отличается.

Таблица 6. Пространственные и временные изменения физиологических параметров при прорастании пыльцы покрытосеменных растений и ели голубой.

<b>Физиологический показатель</b>	<b>Табак/лилия/<i>Arabidopsis</i>/петуния</b>	<b>Ель</b>
Динамика поглощения кислорода	Резкий подъем уровня дыхания с выходом на плато перед появлением трубки (Матвеева et al. 2002)	Кривая с максимумом в момент выхода трубки
Динамика выхода анионов	Ранний выход, предшествует активации (Брейгина et al. 2009a)	
Динамика мембранного потенциала	Гиперполяризация в процессе активации и выхода трубки (Брейгина et al. 2009b)	
Динамика внутриклеточного рН	Защелачивание в процессе активации, выход на плато в момент появления трубки (Матвеева et al. 2002)	
Градиент рН в пыльцевой трубке	Максимум в субапикальной области, минимум в апексе (Feijó et al. 1999; Podolyan et al. 2019)	Максимум в апексе
Локализация $H^+$ -АТФазы	Отсутствует в апексе, локализована в стержневой части трубки (Certal et al. 2008; Ковалева et al. 2016; Hoffmann et al. 2020)	Локализована преимущественно в апикальной области

Обнаруженные особенности градиента рН хорошо согласуются и со свойствами пыльцевых трубок хвойных, связанными с зонированием цитоплазмы. Это важные различия между пыльцевыми трубками хвойных и цветковых растений, в том числе: апикальная зона, обогащенная митохондриями и компонентами эндомембранной системы вместо перевернутого конуса везикул (Fernando et al. 2005), плавный апикальный градиент  $[Ca^{2+}]$  (Lazzaro et al. 2005) движение органелл по траектории «прямого фонтана» (Justus et al. 2004), наличие целлюлозы и каллозы в стенке кончика трубки (Derksen et al. 1999). Можно предположить, что феномен сегрегированного апикального компартмента «покрытосеменного типа», заполненного везикулами, демонстрирующего крутой градиент  $[Ca^{2+}]$ , отделенного от остальной цитоплазмы

актиновым кольцом и покрытого мягкой пектиновой стенкой, связан с отсутствием  $H^+$ -АТФазы в апикальной мембране, за счёт которого возникает «кислый кончик», граничащий с субапикальным «щелочным пояском». Мы можем предположить, что альтернативный характер распределения вдоль трубки протонной помпы и цитоплазматического рН является одним из факторов, вызывающих более быстрый рост трубок у цветковых растений по сравнению с хвойными. Важнейшие различия между двумя типами прорастания суммированы в Таблице 6.

Таким образом, мы изучили изменения ионного гомеостаза на начальных этапах прорастания пыльцевого зерна у модельных объектов табака и ели, выявили сходства и различия динамики этих процессов. Мы также обнаружили градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках представителей цветковых и хвойных растений, исследовали его с помощью ингибиторного анализа. Наша работа, посвященная роли  $H^+$ -АТФазы в регуляции полярного роста в мужском гаметофите ели, выявила важные различия между механизмами поддержания этого процесса у цветковых и хвойных растений. На следующем этапе нам предстояло выяснить, в какой мере ионный транспорт участвует в реализации сигнала от АФК.

## Глава V. Влияние АФК на ионный транспорт в мужском гаметофите<sup>4</sup>

Получив результаты, демонстрирующие влияние баланса АФК на прорастание пыльцевых зёрен и рост трубок *in vitro*, а также определив особенности ионной регуляции этих процессов у голосеменных и цветковых растений, мы перешли к объединению двух компонентов и выявлению участие ион-транспортных систем в восприятие сигнала АФК мужским гаметофитом. В этих исследованиях мы применяли две группы количественных методов и подходящие для них модельные системы. Для исследования ионных каналов методом пэтч-кламп мы использовали протопласты из пыльцевых зёрен лилии, для количественной флуоресцентной микроскопии – субпротопласты из пыльцевых трубок табака и интактные пыльцевые трубки.

### V.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-чувствительные Ca<sup>2+</sup>-проводящие каналы

Измерения трансмембранного Ca<sup>2+</sup> тока в протопластах из пыльцевых зёрен лилии проводили методом фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «whole cell» на оборудовании кафедры физиологии человека и животных с участием Абрамочкина Д.В. (Breygina et al. 2016). Каналы, через которые осуществляется ток, по механизму регуляции относятся к потенциал-зависимым: они активируются гиперполяризацией мембраны. При добавлении к протопластам 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ток Ca<sup>2+</sup> усиливается в 1.5–2 раза (Рисунок 39). Для подтверждения специфичности измерения проводился стандартный ингибиторный анализ, который показал, что ток высокочувствителен к La<sup>3+</sup>, что типично для Ca<sup>2+</sup> токов, в частности, ранее описанных в протопластах из пыльцевых зерен лилии (Shang et al., 2005). В целом, активация кальциевого тока была ожидаемым эффектом, подтверждавшим нашу гипотезу о том, что ионные каналы могут быть участниками передачи сигнала от АФК в мужском гаметофите. Однако этот эффект был описан впервые, поэтому необходимо было проверить и другие возможные объяснения, такие, как окислительный стресс. Чтобы убедиться в

---

<sup>4</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **Breygina M.A.**, Matveyeva N.P., Polevova S.V., Meychik N.R., Nikolaeva Y. I., Mamaeva A.S., Yermakov I.P. Ni<sup>2+</sup> effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. // *BioMetals*. – 2012. – Vol. 25. – № 6. – P. 1221- 1233 (IF =3.5, 0,95/**0,8**)
2. Максимов Н.М., **Брейгина М.А.**, Ермаков И.П. Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода. // *Цитология*. – 2015. – Vol. 57. – № 10. – P. 720-726 (0,75/**0,5**)
3. **Breygina M.A.**, Abramochkin D.V., Maksimov N.M., Yermakov I.P. Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. // *Plant Biology*. – 2016. – Vol. 18. – № 5. – P. 761-767 (IF =3.9, 0,8/**0,6**)
4. **Breygina M.A.**, Abramochkin D.V., Maksimov N.M., Yermakov I.P.. Effects of Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> currents in lily pollen protoplasts. // *Functional plant Biology*. – 2017. – Vol. 44. – № 12. – P. 1171-1177 (IF =3.0, 0,75/**0,5**).



жизнеспособности протопластов, обработанных пероксидом водорода в различных концентрациях, мы проводили стандартный тест с красителем FDA. На Рисунок 40 показано окрашивание при крайних концентрациях исследуемого диапазона. В присутствии  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  жизнеспособность остается на уровне контроля, хотя эта же концентрация достоверно усиливает кальциевый ток. При повышении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 100 раз (до  $10 \text{ mM}$ ) происходит некоторое снижение интенсивности флуоресценции FDA, отражающее закисление цитоплазмы, и тем самым свидетельствующее о падении жизнеспособности. Такие концентрации мы в своих экспериментах не применяли.

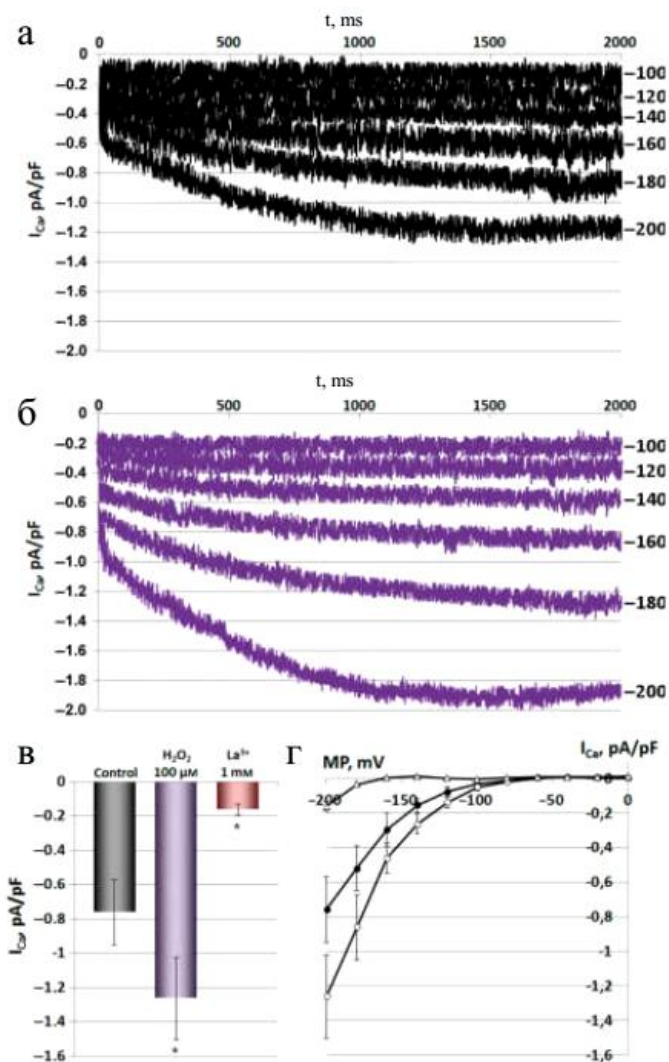


Рисунок 39. Входящий  $\text{Ca}^{2+}$  ток в протопластах лилии и его модуляция  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{LaCl}_3$ . Типичные оригинальные записи ионных токов при различных значениях потенциала в а – контроле; б – после 5-минутной инкубации с  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; в – сравнение средних пиковых значений  $\text{Ca}^{2+}$  тока, записанного при  $-200 \text{ mV}$  в контроле, при действии  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $1 \text{ mM}$   $\text{LaCl}_3$ . Количественные показатели приводятся после вычета тока утечки,  $n=8$ . \* - статически значимые отличия от контроля ( $p < 0.05$ , U-критерий Манна-Уитни); г – Вольт-амперные характеристики пикового входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока в контроле (●), с  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (○) и с  $1 \text{ mM}$   $\text{La}^{3+}$  (Δ). Из приведенных значений также вычтен линейный ток утечки.

Хотя ранее Ву с соавторами использовали высокие концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  для активации кальциевого тока в протопластах из пыльцевых зёрен груши (Wu et al. 2010), вряд ли в этом

случае можно говорить о регуляторной роли пероксида водорода. Мы использовали концентрации на 2-3 порядка ниже (стандартные концентрации 10  $\mu\text{M}$  для табака, 100  $\mu\text{M}$  для других объектов; 1 мМ – максимальная концентрация во всех опытах).

Хотя мы контролируем концентрацию пероксида во внешней среде, у нас нет уверенности в том, что он не проникает внутрь клетки и действует именно на внешней стороне мембраны. Чтобы проверить такую возможность, мы провели оценку внутриклеточного уровня АФК в зависимости от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среде инкубации (Рисунок 41). Для этого был использован стандартный неспецифичный АФК-чувствительный зонд DCFH. Мы показали, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  проникает в клетку, повышая уровень АФК в цитоплазме, что может объясняться как ограниченной диффузией через липидный бислой вследствие отсутствия заряда, так и участием в переносе  $\text{H}_2\text{O}_2$  аквапоринов (Bienert et al. 2006, 2007; Miller et al. 2010). Аквапорины в мужском гаметофите имеют специфические функции, связанные с гидратацией при попадании на рыльце, выходом из физиологического покоя и полярным ростом. Однако, они также могут участвовать в проникновении в вегетативную клетку  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У некоторых экспрессируемых в мужском гаметофите аквапоринов (AtTIP1;3, AtTIP5;1) была обнаружена пропускная способность в отношении  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bienert et al. 2007).

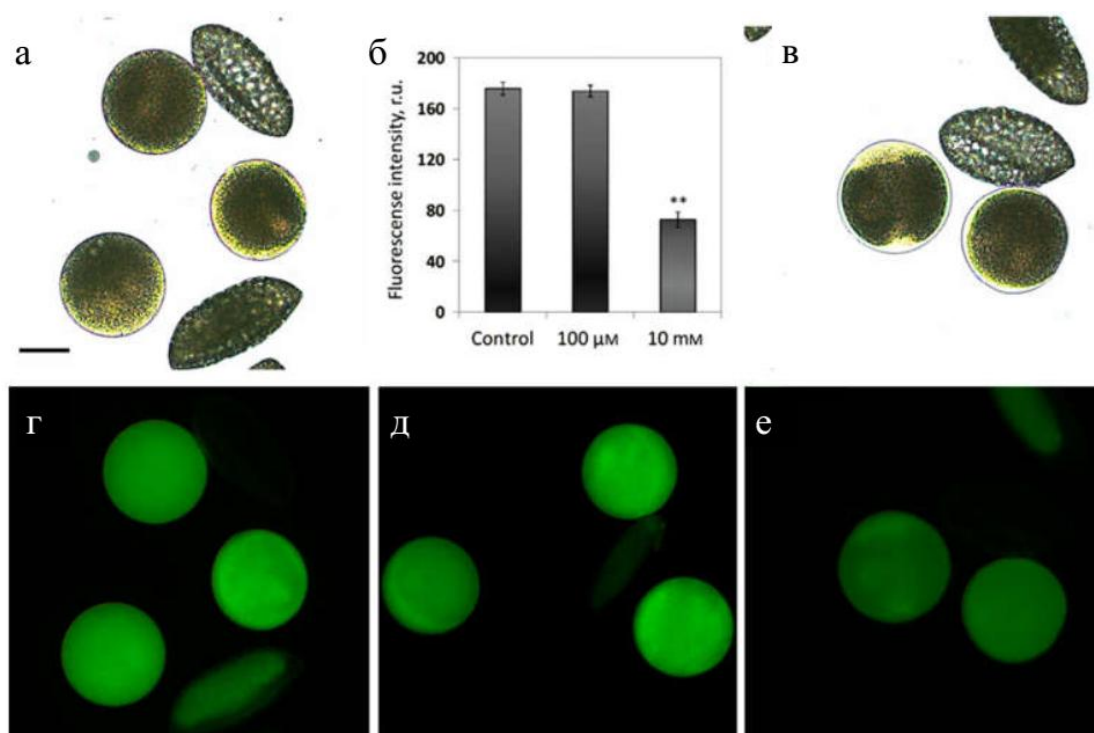


Рисунок 40. Протопласты лилии в тесте на жизнеспособность с FDA. а, г – контроль; д – воздействие 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; в, е – 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На рисунке (б) представлено изменение среднего сигнала флуоресценции FDA в контроле, а также при действии 10  $\mu\text{M}$  и 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $n = 350$ , \*\* -  $P < 0.01$  по t-критерию Стьюдента).

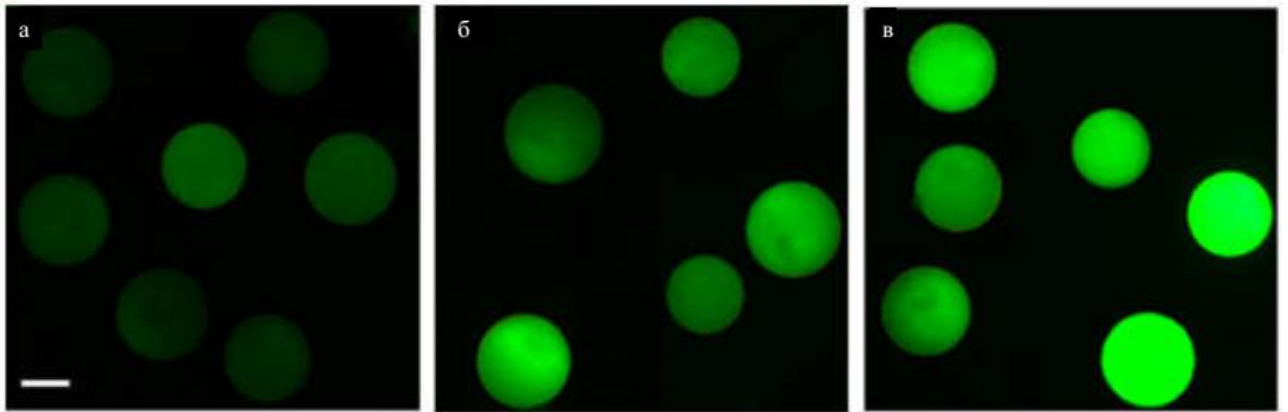


Рисунок 41. Повышение концентрации внутриклеточных АФК в протопластах лилии при воздействии экзогенным пероксидом водорода в концентрации 100 (б) и 500 (в)  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  по сравнению с контролем (а). Характерные изображения, сделанные при одинаковой экспозиции.

Полученный нами результат подтверждает, что на молекулярном уровне  $\text{H}_2\text{O}_2$  может действовать на каналы и другие ион-транспортные системы не только с внешней стороны мембраны, но и после поступления внутрь клетки, модифицируя части белка, экспонированные в цитоплазму. Это делает картину АФК-сигналинга еще более сложной для интерпретации.

На вопрос о возможных функциях обнаруженного нами  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительного входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока может быть более одного ответа. Наиболее очевидная функция – восприятие сигнала от женских тканей спорофита, который, как мы позже установили, включает в себя АФК и будет подробно рассмотрен в Главе VI. Другая возможная роль заключается в поддержании токов через мембрану пыльцевого зерна и трубки за счет регуляции эндогенными АФК, то есть теми, которые генерируются мужским гаметофитом самостоятельно (III.2. Начальные этапы прорастания у табака). Эти функции не являются взаимоисключающими и, скорее всего, в ситуации *in vivo* дополняют друг друга.

Естественно, для подтверждения предположения о том, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  является мессенджером в системе спорофит-гамеофит, требуются дальнейшие эксперименты в системе *in vivo*, которые были проведены и описаны в Главе VI, однако, в данной части работы мы уделяли основное внимание установлению возможных механизмов регуляции физиологических параметров пыльцевого зерна экзогенным  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким образом, АФК-индуцированная активация входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока – один из ключевых регуляторных механизмов.

Физиологическое следствие активации входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока – повышение внутриклеточной  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , которое можно зарегистрировать оптическими методами. Участие АФК в регуляции этого показателя подтверждают эксперименты, проведенные на субпротопластах из пыльцевых трубок табака. Для мониторинга  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  был использован флуоресцентный краситель Fluo-3. Полученные результаты иллюстрирует Рисунок 42а: на нём представлена динамика интенсивности флуоресценции красителя в клетках, обработанных  $\text{H}_2\text{O}_2$

(10  $\mu\text{M}$ ), нормированная к интенсивности флуоресценции контрольных клеток. Видно, что пероксид водорода индуцирует увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в субпротопластах, которая достигает максимума в течение нескольких минут после воздействия (Максимов et al. 2015). Аналогичная динамика  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  наблюдалась на корневых волосках, однако в этом случае речь шла о воздействии  $\cdot\text{OH}$  (Foreman et al. 2003). Чтобы связать обнаруженные эффекты  $\text{H}_2\text{O}_2$  на динамику кальция, мы провели ингибиторный анализ. В присутствии нифедипина (100  $\mu\text{M}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного увеличения  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  не происходило, т.е., ингибитор полностью блокировал эффект пероксида водорода в данной модельной системе. Следует отметить, что чувствительность каналов к ингибиторам различается в протопластах табака и лилии, что было обнаружено нами в эксперименте и, вероятно, отражает видовую специфику. В экспериментах с пылью *Arabidopsis* нифедипин также использовался в качестве ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих каналов: в концентрации 100  $\mu\text{M}$  он нарушал градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в прорастающем пыльцевом зерне и подавлял рост трубки (Iwano et al. 2004).

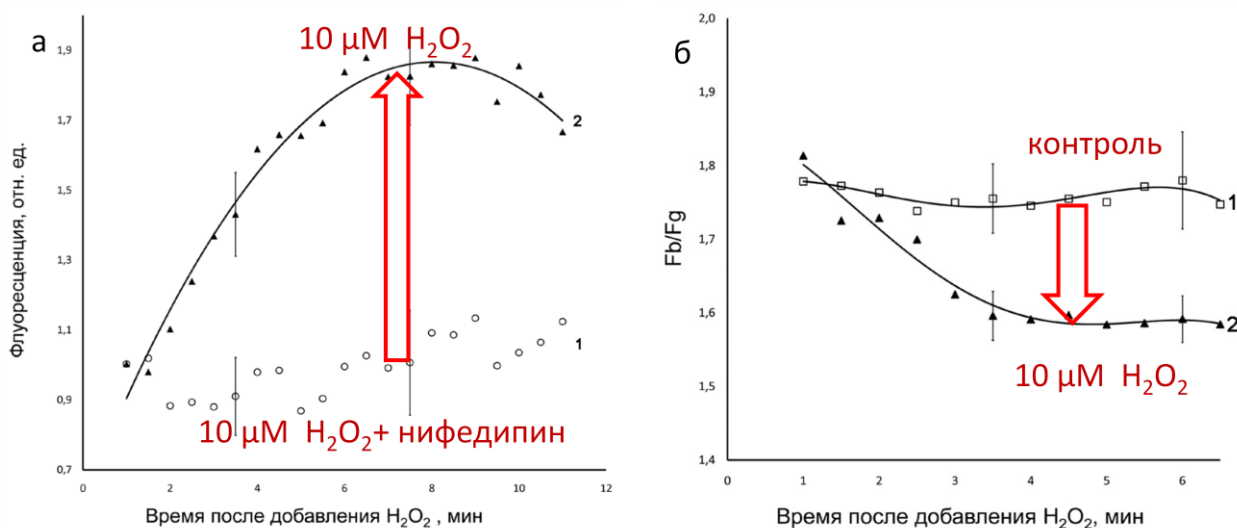


Рисунок 42.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированные эффекты в субпротопластах из пыльцевых трубок табака: а – вход  $\text{Ca}^{2+}$  через нифедипин-чувствительные каналы по данным окрашивания флуоресцентным  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительным красителем Fluo-3; б – гиперполяризация мембраны по данным окрашивания флуоресцентным потенциал-зависимым красителем Di-4-ANEPPS.

Несмотря на это, блокирование эффекта пероксида в субпротопластах любым специфичным ингибитором говорит о том, что вход кальция происходит через кальций-проводящие каналы плазмалеммы, которые и являются мишенью для АФК. Также интересно отметить, что чувствительность к пероксиду водорода вегетативной клетки пыльцевого зерна табака выше, чем у лилии, поскольку действующая концентрация пероксида на порядок ниже. Та же концентрация пероксида водорода индуцировала гиперполяризацию мембраны по данным окрашивания флуоресцентным потенциал-чувствительным красителем Di-4-ANEPPS (Рисунок 42) (Максимов et al. 2015), причем появление достоверных отличий от контроля по

времени буквально совпадает: и для уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , и для мембранного потенциала первый эффект регистрируется через 3 минуты, а после 6-7 минут развитие эффекта прекращается.

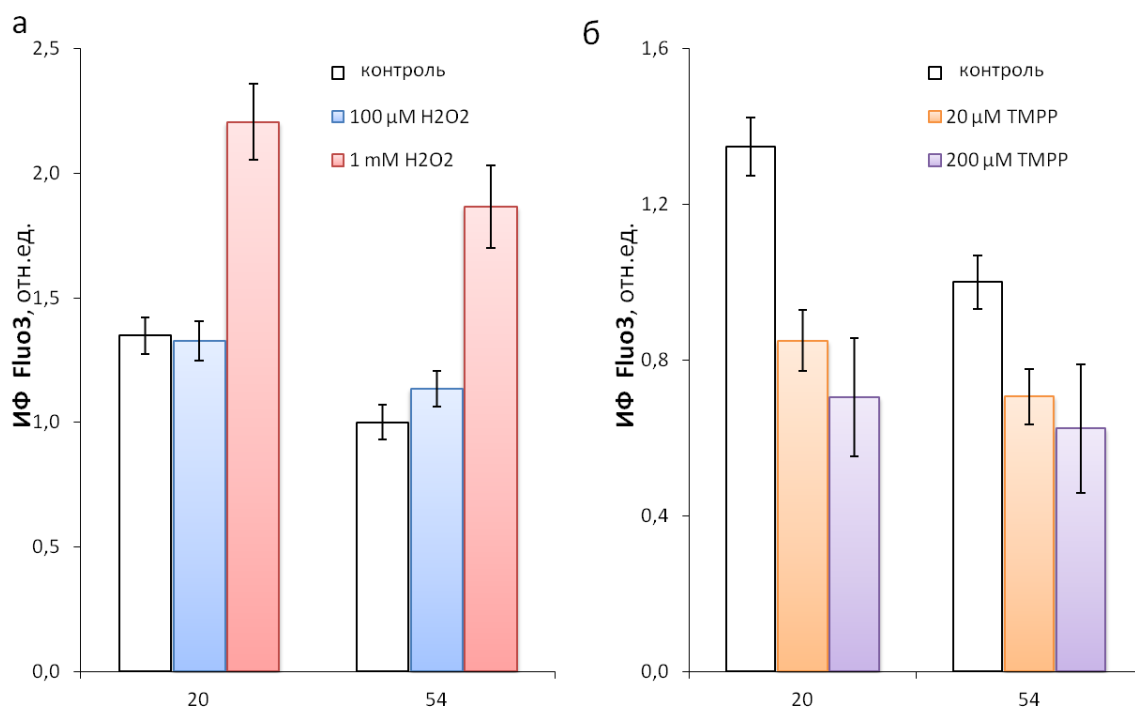


Рисунок 43. Внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  под влиянием  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а) и MnTMPP (б), оцененный с помощью окрашивания Fluor-3. Присутствует градиент кальция в контрольных трубках (n=18): в субапикальной области его концентрация достоверно выше, чем в стержневой части трубки; а – 100 μM  $\text{H}_2\text{O}_2$  не вызывает изменений (n=10), а 1 mM вызывает значительное повышение в обеих зонах (n=8); б – 20 μM MnTMPP вызывает достоверное снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в обеих зонах, но сильнее в 20 μm от кончика, что приводит к диссипации градиента (n=12); тот же эффект оказывает 200 μM MnTMPP (n=11).

Чтобы подтвердить наш результат по влиянию АФК на транспорт кальция через плазмалемму в интактных пыльцевых трубках, использовалась модельная система, включающая пыльцевые трубки лилии, растущие в плоскости агарозной подушечки в поле зрения микроскопа (Podolyan et al. 2019). Апикальный домен трубки – зона высокой концентрации кальция, нестабильной из-за флуктуаций. Поэтому для вычленения эффекта пероксида мы измеряли уровень флуоресценции кальций-чувствительного красителя в субапикальной зоне и стержневой части трубки (На Рисунок 43 их показывают две репрезентативные точки -20 и 54 μm от кончика). 100 μM  $\text{H}_2\text{O}_2$  не действовал на уровень кальция в этих зонах, а 1 mM вызывал быстрое усиление сигнала в обеих областях трубки (Рисунок 43а). Эти данные подтверждают результаты, полученные ранее на протопластах пыльцевых трубок табака и пыльцевых зерен лилии. С использованием более сложной модельной системы мы обнаружили, что этот эффект также присутствует в интактных растущих трубках, хотя и в более высокой концентрации, что может быть связано с антиоксидантными свойствами клеточной стенки. Напротив, Mn-TMPР вызывал достоверное снижение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в обеих зонах уже при 20 μM (Рисунок 43б). Таким образом, пероксид и

антиоксидант действуют антагонистически на гомеостаз кальция (Podolyan et al. 2019). Влияние Mn-ГМРР на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме изучено впервые; это свидетельствует об участии не только экзогенных, но и эндогенных АФК в поддержании гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  в растущих трубках.  $\text{Ca}^{2+}$ , в свою очередь, активирует NOX в пыльцевых трубках, тем самым замыкая петлю положительной обратной связи, необходимую для полярного роста (Kaya et al. 2015).

Таким образом, влияние пероксида водорода на кальциевый гомеостаз было изучено с двух сторон: во-первых, путём непосредственной регистрации тока  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы, а во-вторых, путем фиксации изменения концентрации этого иона в цитозоле. Полученные двумя методами данные вполне согласуются друг с другом и за счет этого представляются более надежными и убедительными. В то же время на плазмалемме вегетативной клетки пыльцевого зерна присутствуют и другие ион-транспортные белки, которые могли участвовать в передаче АФК-сигнала. Одной из таких систем, доступной для прямых измерений, являются  $\text{K}^+$  каналы.

## V.2 Действие $\text{H}_2\text{O}_2$ на $\text{K}^+$ -проводящие каналы

Мы использовали описанную выше модельную систему, а именно протопласты из пыльцевых зёрен лилии, чтобы выявить возможное участие  $\text{H}_2\text{O}_2$  в контроле выходящего  $\text{K}^+$  тока. Эксперименты проводились с участием Абрамочкина Д.В. Запись тока проводили по протоколу, разработанному для протопластов из пыльцы *Brassica chinensis* (Fan et al., 2003). Активацию тока обеспечивали деполяризующими импульсами (Рисунок 44). После начала записи тока дожидались его стабилизации в течение 3 – 4 минут, затем применяли воздействия, такие как ингибиторы и пероксид водорода.

Для подтверждения природы тока использовали ингибитор ТЕА: в концентрации 10 мМ ТЕА происходило уменьшение тока более чем в два раза (Рисунок 44б). При добавлении 100 мМ ТЕА ток полностью блокировался (Рисунок 44г). При этом ингибирующий эффект был обратим и при отмывке протопластов в течение 5 – 7 минут наблюдали восстановление  $\text{K}^+$  тока до контрольного уровня (Breygina et al. 2016). Полученные результаты согласуются с данными Griessner и Obermeyer, которые впервые записали  $\text{K}^+$  ток в протопластах лилии и продемонстрировали возможность его ингибирования с помощью ТЕА (Griessner and Obermeyer 2003).

Для поиска активирующего эффекта использовали ранее показавшие свою эффективность концентрации пероксида водорода: 100  $\mu\text{M}$  и 1 мМ. При добавлении 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  было зарегистрировано небольшое по амплитуде (10% от контроля), но значимое (с учетом того, что ток  $\text{K}^+$  – один из самых массовых) усиление выходящего  $\text{K}^+$  тока. Увеличение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 10 раз усиливало эффект, сила тока возрастала на 20% от контрольного уровня (Рисунок 44) (Breygina et al. 2016).

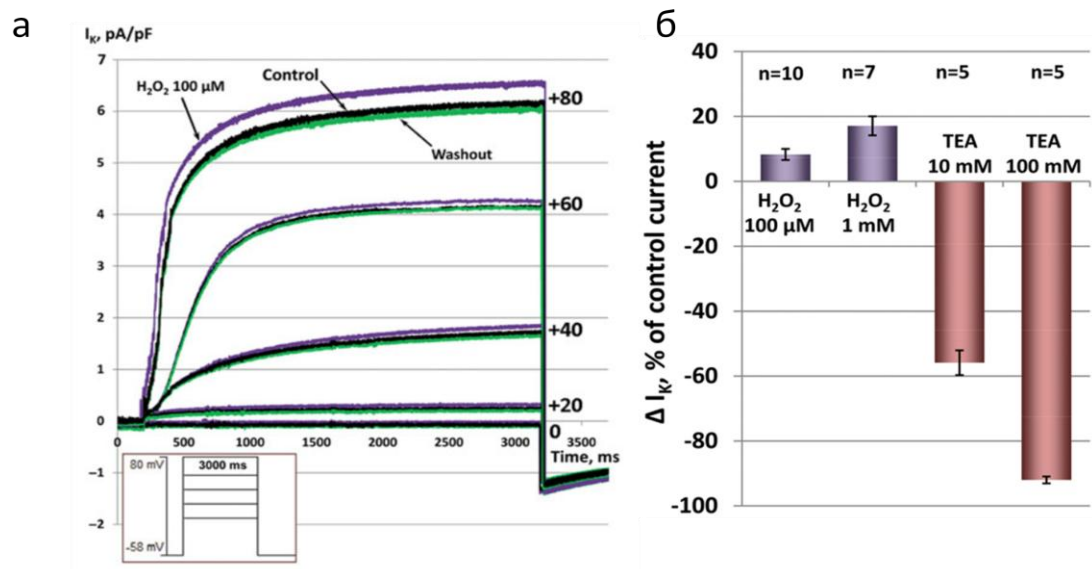


Рисунок 44. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированное усиление выходящего тока K<sup>+</sup> в протопластах из пыльцевых зёрен лилии по данным пэтч-кламп: а – оригинальные записи тока, индуцированного деполаризующим прямоугольным импульсом (врезка) в контрольных условиях, при действии 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и после отмывки от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; б – изменения плотности K<sup>+</sup> тока, вызванные H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ТЕА, в процентах от плотности тока в контроле. Все эффекты, кроме действия 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, достоверны (p < 0.05, критерий Вилкоксона).

Физиологическое значение активации выходящего K<sup>+</sup> тока при воздействии АФК может заключаться в поднятии уровня метаболизма пыльцевого зерна и стимуляции прорастания. Полученные в данном разделе результаты согласуются с данными о выходе K<sup>+</sup> и анионов при прорастании (см. IV.1. Начальные этапы прорастания у цветковых растений). Аналогичные результаты были получены нашей группой и для прорастания *in vivo* (Брейгина et al. 2012). В ранних работах нашей лаборатории было показано, что блокаторы каналов, проводящих K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> (ТЕА и NPPB, соответственно), являются эффективными ингибиторами прорастания пыльцы (Матвеева et al. 2003b). Для установления связи между выходом K<sup>+</sup> и прорастанием обратимся к классической работе Баше и Маскаренаса, в которой была прослежена связь между концентрацией K<sup>+</sup> в цитоплазме вегетативной клетки пыльцевого зерна традесканции и интенсивностью синтеза белка на рибосомах (Bashe and Mascarenhas 1984). Авторы установили, что выход K<sup>+</sup> в процессе прорастания является необходимым условием для сборки полисом и активации трансляции. Еще одной важной ролью K<sup>+</sup> в растительных клетках является контроль мембранного потенциала (Оприлов et al. 1991; Nobel 2009; Volkov 2012), а поскольку гиперполяризация, как мы выяснили, необходима для активации пыльцевого зерна и его прорастания, активация тока K<sup>+</sup> с помощью АФК может стимулировать эти процессы.

\*\*

Мы продолжили изучать связь между АФК и системами ионной регуляции полярного роста, переходя от упрощенной модельной системы к интактным растущим пыльцевым

трубкам. Пыльцевая трубка, не допуская прямых измерений без нарушения целостности и роста, зато позволяет отслеживать градиенты рН и мембранного потенциала с помощью неинвазивных оптических методов, что позволяет приблизиться к пониманию участия АФК в поддержании полярного роста.

### **V.3 Действие различных АФК на градиент рН в пыльцевой трубке**

Мы исследовали влияние АФК и антиоксидантов на внутриклеточный градиент рН в растущих пыльцевых трубках лилии (Podolyan et al. 2019, 2021). Для этого использовали ратиометрический краситель BCECF, который позволяет проводить измерения в клетках и калибровать значения в бесклеточной системе «искусственный цитозоль», переводя отношение интенсивностей в единицы рН. Это правомерно, поскольку краситель ратиометрический и интенсивность окрашивания, а также толщина слоя цитоплазмы не влияет на отношение интенсивностей в двух каналах.

В контрольных трубках, в соответствии с литературным данным (Feijó et al. 1999), в апикальной зоне рН кислый, в субапикальной (5–20  $\mu\text{m}$ ) повышается до щелочных значений, затем снижается и достигает нейтрального уровня (Рисунок 45а). 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывает сильное закисление в субапикальной области (исчезновение «щелочной полосы»), приводящее к диссипации градиента (Рисунок 45а, г), что свидетельствует, по-видимому, о подавлении  $\text{H}^+$ -АТФазы плазматической мембраны (Feijó et al. 1999). Более низкие концентрации пероксида не оказывали достоверного влияния на данный градиент. Наиболее вероятным сценарием является ингибирование фермента высоким содержанием внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что согласуется с известными механизмами его регуляции в растительных клетках (Kinoshita et al. 1995; De Nisi et al. 1999; Holdaway-Clarke and Hepler 2003) и с данными о значительном увеличении внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в трубках, обработанных  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Рисунок 43).

Низкие концентрации ТМРР существенно не влияли на рН цитоплазмы (Рисунок 45б). 200  $\mu\text{M}$  ТМРР вызывали сдвиг рН в сторону щелочных значений, особенно вблизи апекса, что может отражать активацию  $\text{H}^+$ -АТФазы вдоль пыльцевой трубки. Другим возможным механизмом этого эффекта является ингибирование локализованных на кончике неспецифических катионных каналов, обеспечивающих приток  $\text{H}^+$  (Demidchik and Maathuis 2007; Michard et al. 2017). 500  $\mu\text{M}$  ТМРР вызывали закисление цитоплазмы, и градиент рассеивался (Podolyan et al. 2019). Поскольку действие самой высокой концентрации отличалось от более низкой, мы предположили, что закисление связано со снижением жизнеспособности и/или патологическими процессами в трубке. По данным стандартного теста с FDA (Рисунок 45в) снижения жизнеспособности не наблюдалось, но трубки образовывали «раздутые кончики», что свидетельствует о нарушении полярного роста. Это нарушение



полярности, а также сдвиг внутриклеточного рН, указывают на роль эндогенных АФК в регуляции гомеостаза  $H^+$  в пыльцевых трубках.

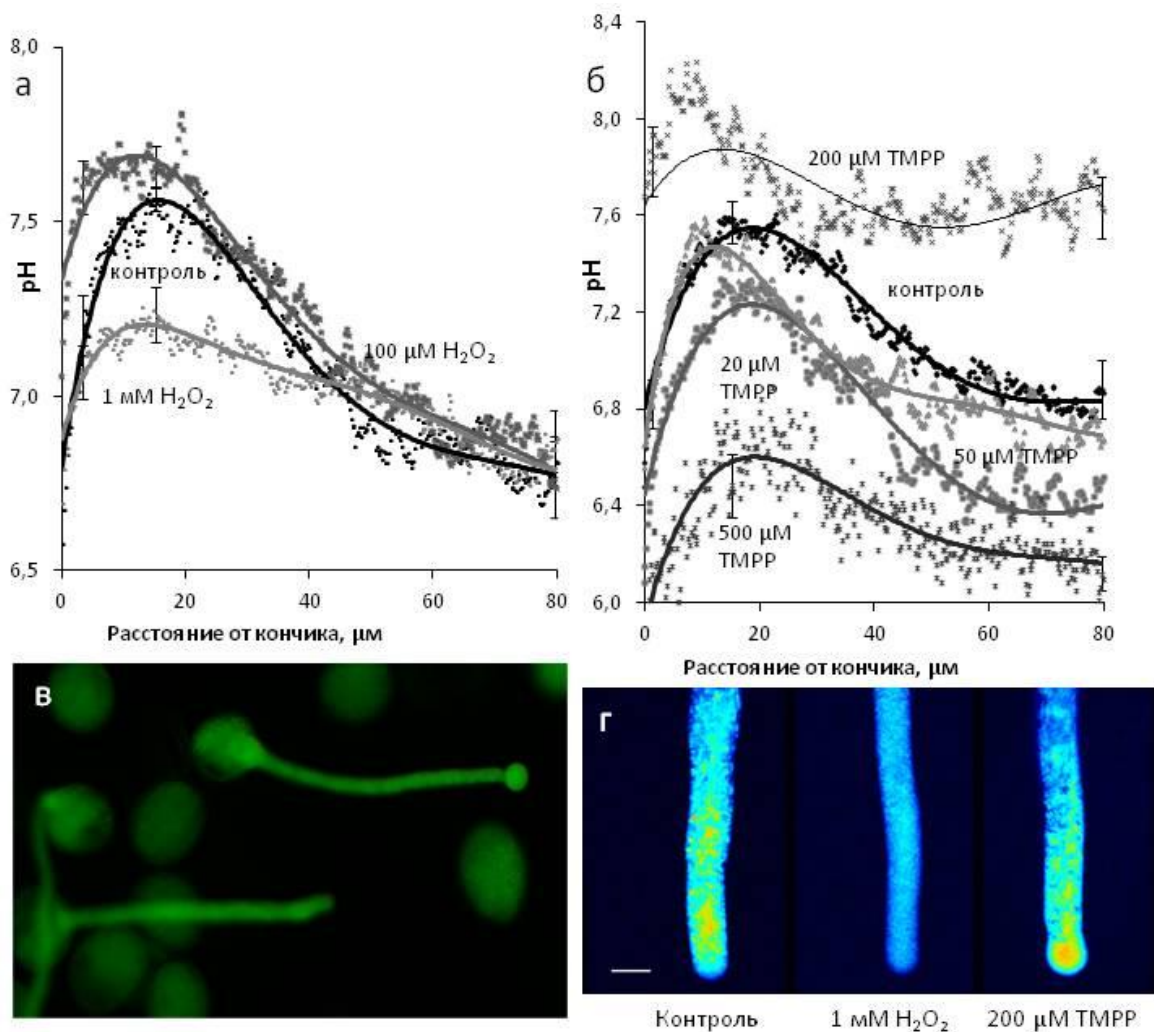


Рисунок 45. Градиент рН цитоплазмы под влиянием  $H_2O_2$  (а, г) и MnTMPP (б-г), оцененный с помощью ратиометрического окрашивания BCECF-AM (а, б, г) и FDA (в). В контрольных трубках можно увидеть типичный градиент (n=19). а – 100  $\mu M H_2O_2$  не вызывает существенного сдвига градиента (n=11), 1 мМ изменяет градиент, сильно воздействуя на субапикальную зону: «щелочная полоса» полностью исчезает (n=12); б – 20 и 50  $\mu M$  MnTMPP не оказывает существенного влияния на градиент (n=8; 15), тогда как 200  $\mu M$  MnTMPP вызывает защелачивание (n=10); наиболее заметный эффект наблюдается в апикальной области. 500  $\mu M$  MnTMPP вызывает закисление цитозоля (n=8), что свидетельствует о выраженном нарушении физиологического состояния; в – нарушения роста в присутствии 500  $\mu M$  MnTMPP. Трубки окрашивают FDA, что указывает на их жизнеспособность, несмотря на измененный характер роста. Масштабная линейка – 50  $\mu m$ . г – градиент рН в пыльцевых трубках, окрашенных BCECF-AM, и сдвиги рН, индуцированные  $H_2O_2$  и MnTMPP. LUT применялись после разделения изображения (флуоресценция в канале, чувствительном к рН, к каналу, нечувствительному к рН). Масштабная линейка – 10  $\mu m$ .

В то же время эффект низких концентраций пероксида отсутствовал, и, опираясь на данные о чувствительности пыльцевых трубок лилии к  $O_2^{\cdot -}$  (Рисунок 14), мы решили, что супероксидный радикал может быть более эффективным модулятором внутриклеточных градиентов в данном объекте. Воздействуя ранее проверенной экспериментальной системой

рибофлавин/УФ-свет, мы обнаружили значительное защелачивание трубки; в апикальной зоне (1  $\mu\text{м}$  от кончика) оно было менее выражено, а в субапикальной (10  $\mu\text{м}$ ) и дистальной (50 и 90  $\mu\text{м}$ ) наблюдалось значительное повышение значений рН ( $P < 0,95$ ) (Рисунок 46) (Podolyan et al. 2021). Форма градиента при этом сохранялась. Преимущественная локализация вне апикальной зоны и направление эффекта супероксида (в сторону щелочных значений), по-видимому, указывает на активацию  $\text{H}^+$ -АТФазы.

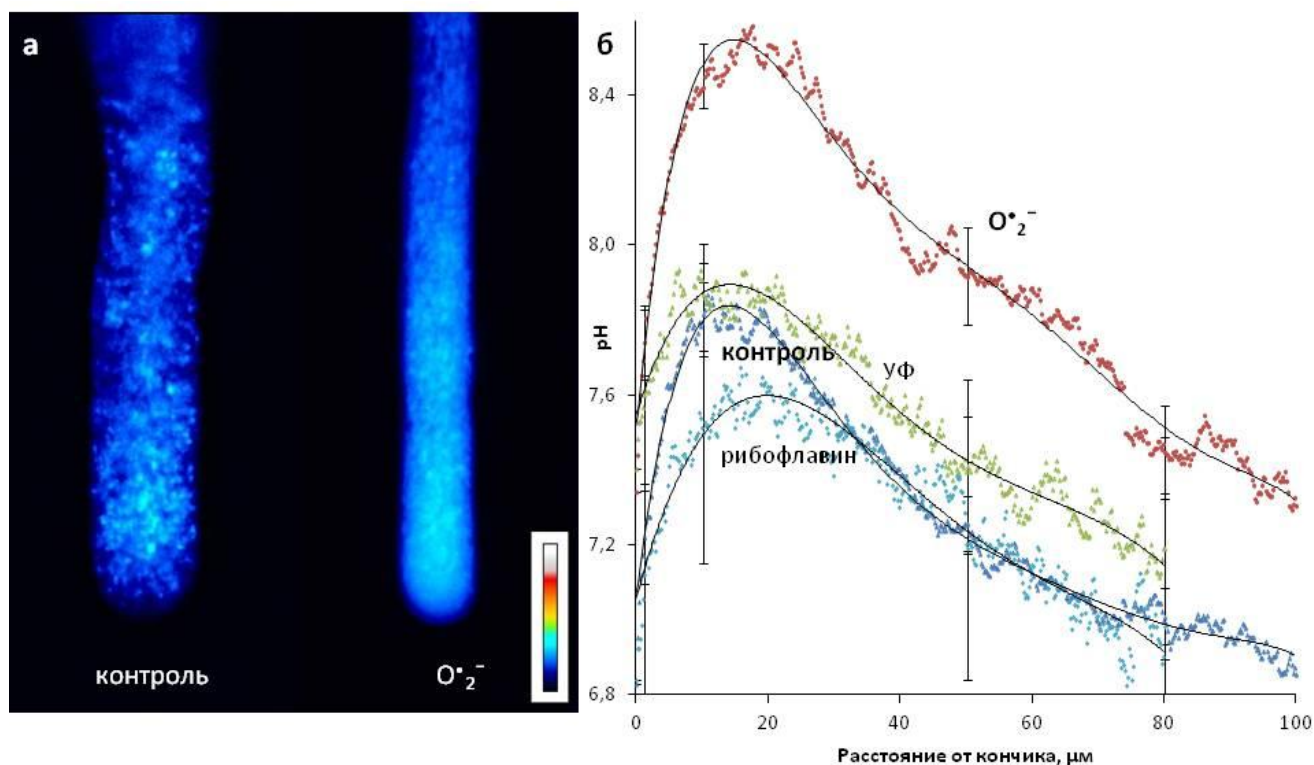


Рисунок 46. Влияние  $\text{O}_2^{\cdot-}$  на градиент рН цитоплазмы, который оценивали с помощью ВСЕСФ-АМ. В контрольных трубках наблюдается типичный градиент: апикальный домен имеет рН ниже 7, «щелочная полоса» локализована в субапикальной части, а стержневая часть трубки имеет почти нейтральный рН.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (рибофлавин/УФ-свет) не оказывает существенного влияния на форму градиента, но вызывает защелачивание с наиболее заметным эффектом в субапикальной области и стержневой части трубки: а – типичное рН-чувствительное окрашивание пыльцевых трубок, LUT применялись после процедуры деления изображения в двух каналах (рН-чувствительный на рН-нечувствительный); б – средние кривые по 37 (контроль) и 39 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) пыльцевым трубкам.

Теоретически этот эффект мог бы быть опосредован  $\text{H}_2\text{O}_2$ , который может образовываться из  $\text{O}_2^{\cdot-}$  при участии СОД или в результате неферментативной реакции (Mangano et al. 2016). Однако мы уже установили, что минимальная концентрация пероксида водорода, вызывающая сдвиг рН в пыльцевых трубках лилии – 1 мМ (Рисунок 45). Также мы проверили по отдельности рибофлавин и облучение трубок ультрафиолетом (1 мин), они не оказывали влияния на рН (Рисунок 46). Таким образом, супероксид обладает способностью стимулировать рост пыльцевых трубок и вызывать изменения их рН в противоположную сторону относительно  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### V.4 Действие различных АФК на градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке *in vitro*

Ранее мы установили, что пероксид водорода вызывает гиперполяризацию в субпротопластах из пыльцевых трубок табака, которая происходит параллельно с увеличением цитоплазматического кальция (Рисунок 42). Таким образом, мембранный потенциал может быть чувствителен к АФК. Этот эффект необходимо было проверить на интактных растущих пыльцевых трубках, для которых характерно наличие градиента мембранного потенциала.

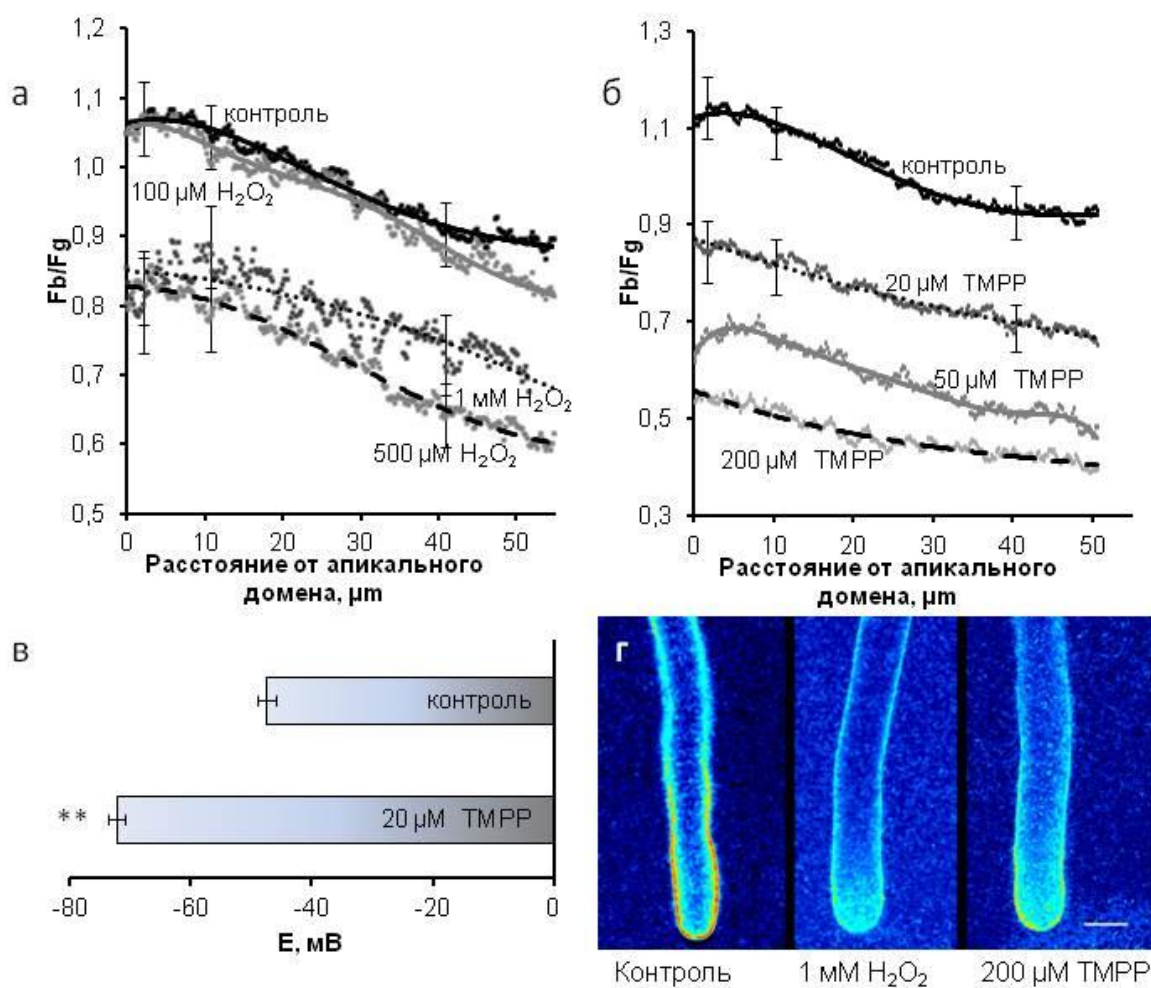


Рисунок 47. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированная (а, г) и MnTMPP-индуцированная (б-г) гиперполяризация в пыльцевых трубках лилии. а – в контрольных трубках (n=34) имеется латеральный градиент: субапикальная зона значительно деполяризована по сравнению с дистальной зоной (окрашивание мембраны Di-4-ANEPPS). 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не влияет на градиент (n=19), 500 μM вызывает гиперполяризацию без изменения формы градиента (n=12), 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает гиперполяризацию и сглаживание градиента (n=24); б – в присутствии 20 и 50 μM MnTMPP субапикальная зона гиперполяризована (n=19, n=8), 200 μM вызывает полную диссипацию градиента (n=8); в – в трубках, обработанных MnTMPP (n=17), обнаружена значительная гиперполяризация по сравнению с контролем (n=34), оцененная с помощью окрашивания цитоплазмы DiBAC<sub>4</sub>(3); г – градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках, окрашенных Di-4-ANEPPS, и гиперполяризации, индуцированной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MnTMPP. Псевдоцвета были применены после деления изображений. Масштабная линейка – 10 μm.

Оптическое картирование мембранного потенциала с помощью окрашивания Di-4-ANEPPS показало, что в пыльцевой трубке лилии субапикальная зона деполяризована по отношению к дистальной зоне (Рисунок 47а, г), как было ранее показано для табака (Рисунок 34) и ели (Рисунок 35). Градиент у лилии анализировали, начиная с конца апикального домена (5  $\mu\text{м}$  от кончика) из-за большой изменчивости значений в этой зоне и, как следствие, сложности в интерпретации эффектов. По-видимому, в апексе величина мембранного потенциала сильно колеблется во времени в связи с периодическими колебаниями интенсивности ионных токов и скорости роста в пыльцевых трубках лилии (Holdaway-Clarke and Hepler 2003; Cardenas et al. 2008). В концентрации 100  $\mu\text{М}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  не влиял на градиент мембранного потенциала; однако 500  $\mu\text{М}$  и 1  $\text{мМ}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывали значительную гиперполяризацию (Рисунок 47а, г); при 500  $\mu\text{М}$  форма градиента не менялась, а при 1  $\text{мМ}$  он частично нивелировался.

Тушитель АФК Mn-TMPP влиял на градиент даже при 20  $\mu\text{М}$  (\*\*), при этом наблюдалась концентрационная зависимость (Рисунок 47б). Однако оказалось неожиданным, что направление этого эффекта совпало с направлением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для проверки этих данных мы использовали другой метод, основанный на окрашивании DiBAC<sub>4</sub>(3). Сравнительное измерение живых и деполяризованных клеток позволило рассчитать значения величины мембранного потенциала: для контрольных трубок (в субапикальной зоне) оно составляло в среднем -48 мВ, а в присутствии 20  $\mu\text{М}$  Mn-TMPP снижалось до -72 мВ (Рисунок 47в). Таким образом, два независимых метода продемонстрировали гиперполяризацию пыльцевых трубок в присутствии антиоксиданта. Столь выраженный эффект свидетельствует о важной роли эндогенных АФК в поддержании градиента мембранного потенциала в пыльцевых трубках, что хорошо согласуется с ранее установленным значением АФК, производных НАДФН-оксидазой, в поддержании роста пыльцевых трубок цветковых растений (Potocký et al. 2007; Lassig et al. 2014).

Обнаружив, что градиент мембранного потенциала (как и рН) слабо реагирует на пероксид водорода, но чувствителен к антиоксиданту, мы решили протестировать радикальные АФК, оказывавшие противоположные влияния на рост трубок лилии (Рисунок 14). С помощью Di-4-ANEPPS мы также изучали влияние  $\text{OH}\cdot$  на градиент потенциала: деполяризация происходила в проксимальном субапикальной зоне и стержневой части трубок, а также в апикальном домене (Рисунок 48б,в), что хорошо согласуется с подавлением роста трубок. Для  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , к сожалению, невозможно было оценить сдвиги градиента с помощью этого метода, так как флуоресценция рибофлавина мешает измерению сигнала от Di-4-ANEPPS. Однако, в зеленом канале у рибофлавина флуоресценции нет, поэтому мы использовали DiBAC<sub>4</sub>(3) для регистрации эффекта супероксид радикала, и, ожидаемо, обнаружили гиперполяризацию

(Рисунок 48а) (Podolyan et al. 2021). Этот эффект хорошо согласуется с ранее описанным влиянием радикала на рост трубок и градиент рН, который, как и гиперполяризацию, можно объяснить активацией  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы (конечно, участие этого фермента в ответе на АФК мы пока впрямую не показали).

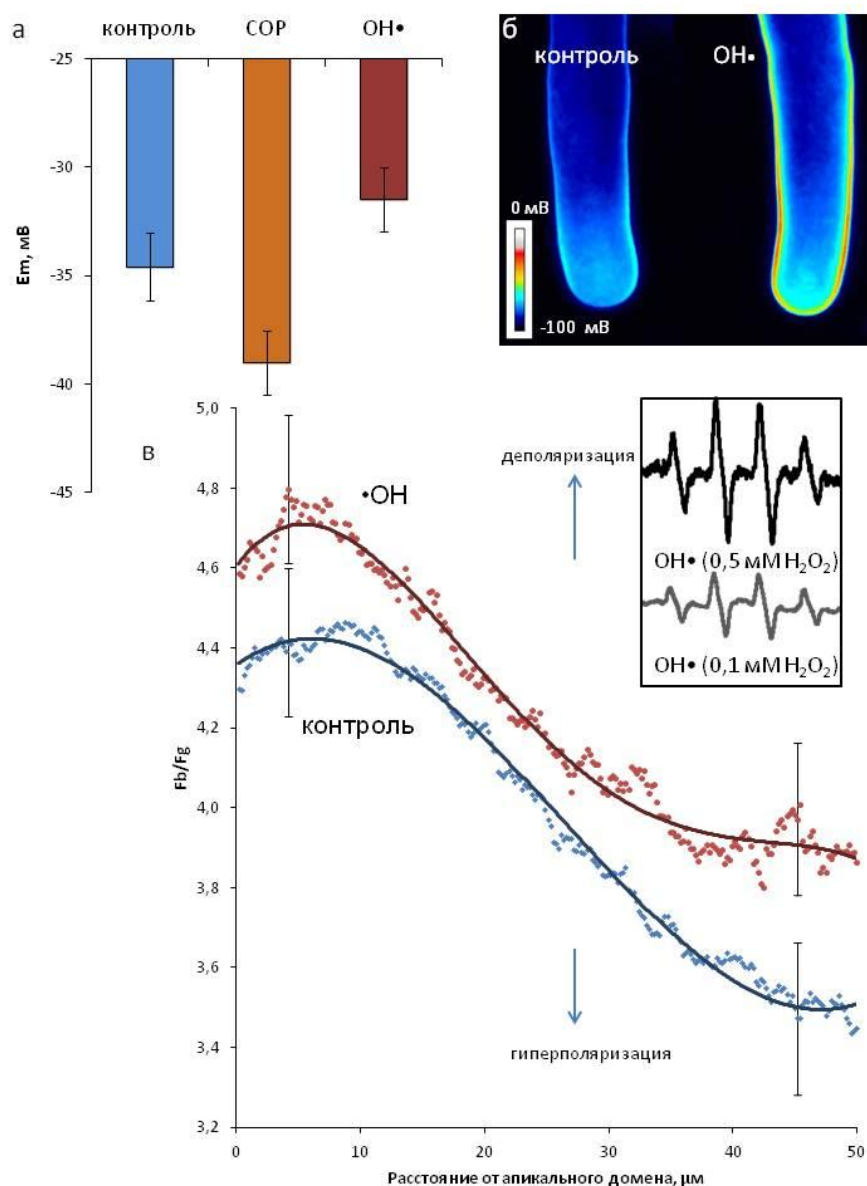


Рисунок 48. Мембранный потенциал в пылевых трубках лилии, оцененный с помощью окрашивания DiBAC<sub>4</sub>(3) (а) и Di-4-ANEPPS (б, в): а –  $O_2^{\cdot-}$  и  $OH\cdot$  оказывают противоположное влияние на мембранный потенциал (апикальная часть): значительная гиперполяризация обнаруживается в трубках, обработанных  $O_2^{\cdot-}$  (n=39), по сравнению с контролем (n=63);  $OH\cdot$  вызывает деполяризацию (n=39); б, в – в контрольных трубках имеется латеральный градиент: субапикальная зона значительно деполяризована по сравнению с дистальной зоной; б – типичное окрашивание пылевых трубок, псевдоцвета применялись после деления изображения; в – средние кривые по 33 (контроль), 19 ( $H_2O_2$ ) и 19 ( $OH\cdot$ ) пылевым трубкам. Врезка – уровень продукции  $OH\cdot$ , оцененный методом ЭПР-спектроскопии со спиновой ловушкой DMPO.

Для получения  $OH\cdot$  в эксперименте с пылевыми трубками использовалась смесь, запускающая реакцию Фентона:  $H_2O_2$  и  $FeSO_4$ . Так как ранее мы установили, что 500  $H_2O_2$

(стандартная концентрация для смеси Фентона (Demidchik et al. 2010; Smirnova et al. 2013)) вызывает гиперполяризацию мембраны пыльцевой трубки, мы снизили концентрацию пероксида до 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , чтобы не смешивать эффекты  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{OH}\cdot$ . Эта концентрация пероксида не влияет на градиент мембранного потенциала (Рисунок 47), поэтому мы использовали её для генерации гидроксил радикала. Для проверки относительного количества  $\text{OH}\cdot$ , образующегося из 100 и 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , использовали ЭПР-спектроскопию со спиновой ловушкой ДМПО (Рисунок 48, врезка).

Выраженные эффекты гидроксильного радикала, обнаруженные нами, несмотря на низкий уровень  $\text{OH}\cdot$  в среде прорастания, позволяют предположить, что он может ингибировать и нарушать рост пыльцевых трубок не за счет окислительного стресса, а воздействуя на специфические мишени. На сегодняшний день была обнаружена селективная чувствительность к  $\text{OH}\cdot$  у катионных каналов в клетках корней (Demidchik 2003; Demidchik et al. 2010). Одним из потенциальных эффекторов в пыльцевых трубках лилии может быть  $\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы, причем здесь возможен опосредованный эффект. Ранее влияние кислородных радикалов на этот фермент тщательно не изучалось, но имеются данные об участии  $\text{OH}\cdot$  в ингибировании  $\text{H}^+$ -АТФазы, индуцированном  $\text{Fe}^{2+}$  (Yang et al. 2003).

Пыльцевые трубки ели были ещё одним объектом, на котором мы протестировали основные воздействия, сдвигающие редокс-баланс. Поскольку пыльцевые трубки хвойных растений растут долго, мы применили только самые стабильные воздействия, концентрация которых в суспензии может сохраняться в течение нескольких часов пероксид водорода и ДФИ.

Как мы ранее показали, градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке ели не такой крутой, как у табака и лилии, но апикальная часть в контрольных трубках всегда деполяризована относительно стержневой части, и в поддержании градиента участвует ряд ион-транспортных систем, включая протонную помпу и катионные каналы (Рисунок 35).  $\text{H}_2\text{O}_2$  и ДФИ изменяли форму градиент, но не влияли на средний уровень Fb/Fg в пыльцевой трубке.  $\text{H}_2\text{O}_2$  действовал очень сходно с  $\text{VO}_4^{3-}$ , деполяризуя субапикальную часть плазматической мембраны трубки (Рисунок 49, Рисунок 35). ДФИ, напротив, воздействовал только на апикальную часть, вызывая умеренную, но значительную локальную гиперполяризацию (Рисунок 49). Обнаруженные эффекты могут быть опосредованы различными системами ионного транспорта, чувствительными к АФК.

Эффект пероксида водорода на пыльцевые трубки лилии и ели был противоположным: у первых он вызывал гиперполяризацию, а у вторых – деполяризацию в субапикальной зоне (Рисунок 47, Рисунок 49). Эти результаты, по-видимому, указывают на ключевые различия в наборе мишеней для АФК и/или в ионных механизмах поддержания градиента между лилией и елью. Мишенями для  $\text{H}_2\text{O}_2$  в пыльце лилии, которые мы установили ранее, являются  $\text{K}^+$  - и  $\text{Ca}^{2+}$ -

проводящие каналы (Рисунок 43, Рисунок 44). У ели эффект ДФИ можно рассматривать как умеренное ингибирование  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов, однако этот эффект значительно слабее, чем гиперполяризующие эффекты ингибиторов (Рисунок 35).

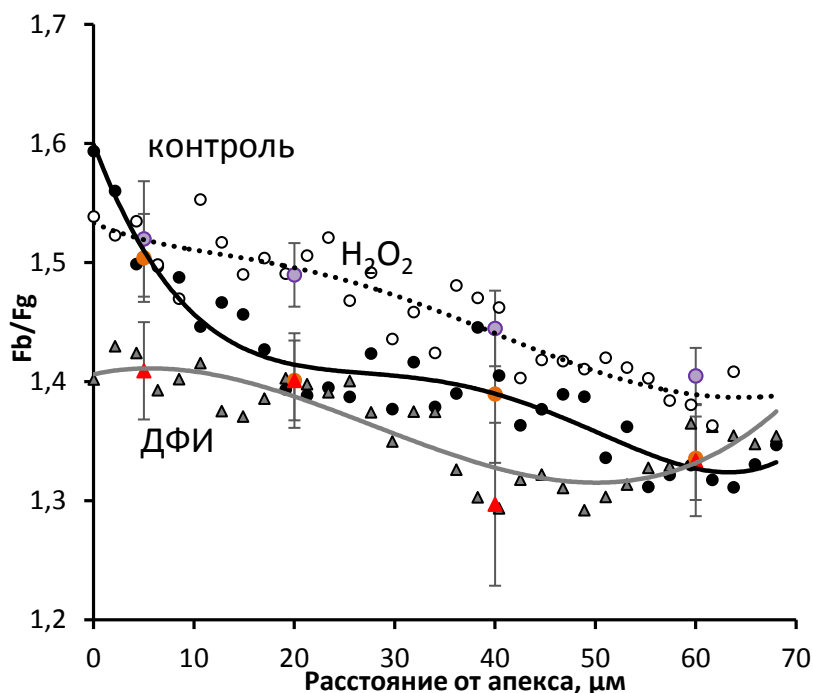


Рисунок 49. Распределение мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели (*Picea pungens*), обнаруженное с помощью оптического картирования с помощью Di-4-ANEPPS. Величина мембранного потенциала пропорциональна соотношению интенсивностей флуоресценции локализованных в плазмалемме Di-4-ANEPPS, возбуждаемых синим (Fb) и зеленым (Fg) светом (Fb/Fg). В контрольных пыльцевых трубках можно обнаружить градиент, поскольку апикальная часть трубки (5  $\mu\text{m}$  от кончика) значительно деполяризована по сравнению с другими частями трубки (20, 40 и 60  $\mu\text{m}$  от кончика,  $P < 0,01$ ). а – ингибиторный анализ, показывающий, что градиент мембранного потенциала поддерживается различными ионными каналами и  $H^+$ -АТФазой; 100  $\mu\text{M}$   $Na_3VO_4$  вызывают деполяризацию в субапикальной и дистальной части (20  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$  от кончика,  $P < 0,05$ ) и диссипацию градиента; 10 мМ ТЕА, 100  $\mu\text{M}$   $LaCl_3$  и 0,4 мМ NPPВ вызывают гиперполяризацию по всей длине трубки и диссипацию градиента ( $P < 0,01$ ); б – экзогенные  $H_2O_2$  и ДФИ влияют на градиент мембранного потенциала: 100  $\mu\text{M}$  ДФИ вызывает гиперполяризацию в апикальной части трубки (5  $\mu\text{m}$  от кончика,  $P < 0,05$ ),  $H_2O_2$  вызывает деполяризацию в субапикальной части трубки (20  $\mu\text{m}$  от кончика,  $P < 0,05$ ).

Эти данные свидетельствуют о том, что АФК у ели участвуют в локальной регуляции мембранного потенциала, тогда как общий уровень этой величины контролируется АФК-независимыми ионными каналами. Можно предположить, что генерация АФК в мужском гаметофите ели более важна на начальном этапе, когда ДФИ полностью подавляет прорастание (Рисунок 5), на более позднем этапе генерация АФК ослабевает и имеет локальное значение.

## **V.6 Действие тяжёлых металлов на ионные токи мужского гаметофита и их возможная связь с АФК**

Наряду с физиологическими (сигнальными) воздействиями АФК, такими как описанный выше эффект низких концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$ , мы изучали стрессовые воздействия, которые влияют на прорастание пыльцы в ситуации антропогенной нагрузки, в том числе, через избыточную генерацию АФК. Медь и никель являются важными микроэлементами, выступающими в качестве кофакторов для нескольких ферментов растений, таких как цитохром-с-оксидаза, супероксиддисмутаза (СОД), аминоксидаза, лакказы, пластоцианин и полифенолоксидазы и уреазы, стимулируют рост растений и повышают урожайность при добавлении в небольших количествах (Viehweger 2014). В оптимальных концентрациях  $\text{Cu}$  участвует во многих метаболических процессах благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам (Anjum et al. 2015); однако, если гомеостаз  $\text{Cu}$  нарушен, те же окислительно-восстановительные свойства приводят к избыточной продукции АФК (Rodrigo-Moreno et al. 2013).  $\text{Ni}^{2+}$  не катализирует напрямую генерацию АФК, так как обладает относительно высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Часть нашей работы была посвящена изучению влияния этих тяжёлых металлов на пыльцевые зёрна, трубки и протопласты из трубок, причем особое внимание уделялось содержанию неорганических ионов в пыльцевом зерне и ионным токам как потенциальным мишеням для АФК-опосредованной и АФК-независимого действия никеля и меди.

### **6.1. Действие $\text{Ni}^{2+}$ на содержание в пыльцевых зёрнах $\text{Ca}^{2+}$ , ростовые процессы *in vitro* и сопутствующие цитологические изменения**

Чтобы выявить возможное влияние никеля на эффективность прорастания и рост пыльцевых трубок *in vitro*, мы поставили две серии экспериментов. В первой серии покоящуюся пыльцу (после адаптации во влажной атмосфере) с момента погружения в жидкость инкубировали в среде с  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ .

Во второй серии опытов пыльцу гидратировали и/или активировали в стандартной среде, а затем (через 3 или 30 мин преинкубации, соответственно) переносили на среду с  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  и инкубировали еще 1 час. Сравнение результатов, полученных в этих опытах, позволило дифференцированно оценить влияние  $\text{Ni}^{2+}$  на пыльцевые зёрна при гидратации (преинкубация 3 мин) и активации (30 мин).

Анализ показал, что при наличии никеля в среде в момент гидратации сильно тормозится прорастание пыльцы (Рисунок 50а).  $250 \mu\text{M}$   $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  оказывает значительное влияние ( $p < 0,05$ ),  $1 \text{ mM}$   $\text{Ni}^{2+}$  полностью блокирует прорастание. Эту концентрацию использовали в дальнейших экспериментах. Концентрация полунгибирования для прорастания составляет около  $550 \mu\text{M}$  (Breygina et al. 2012).



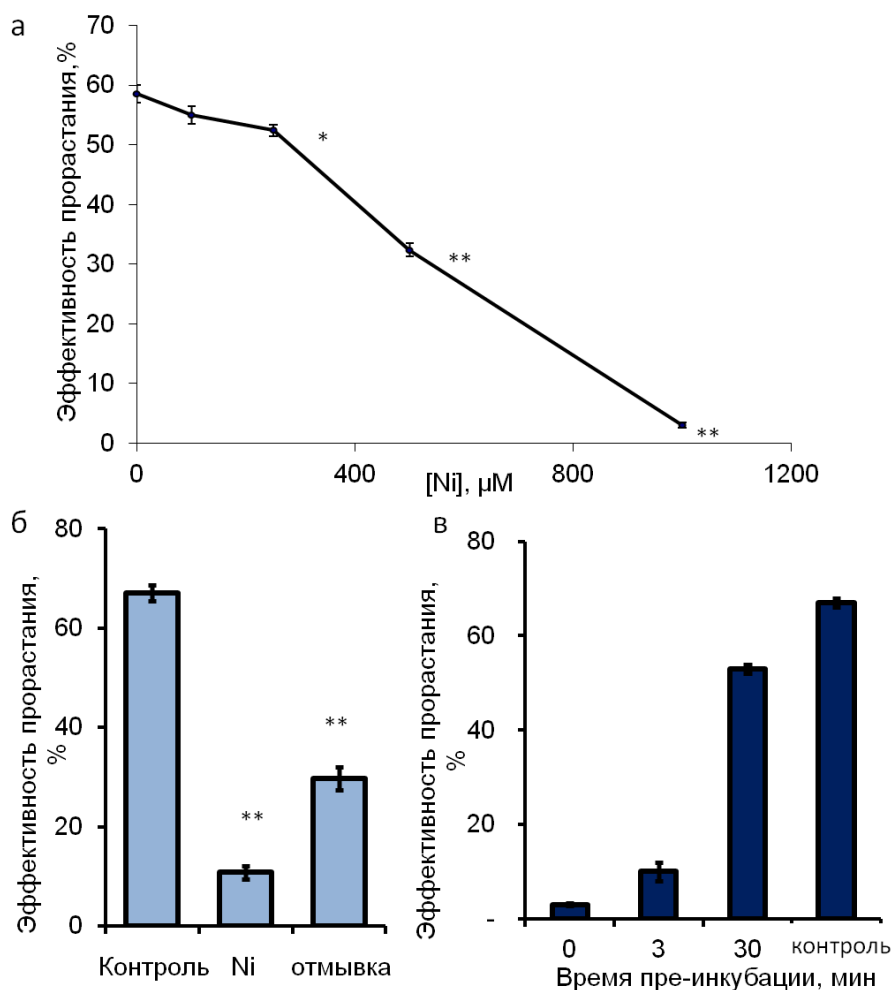


Рисунок 50. Действие  $\text{Ni}^{2+}$  на прорастание пыльцевых зёрен табака: металл изначально присутствует в среде (а, б) или добавлен (в) в процессе инкубации: а – концентрационная кривая, 1 ч инкубации с  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ; б – частичное восстановление прорастания после отмывки (контроль – 1,5 ч инкубации в стандартной среде; Ni – 1,5 ч с 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ; отмывка – 30 мин инкубации с 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  + 1 ч в стандартной среде; в – влияние 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  на прорастание пыльцы после 0, 3 или 30 мин преинкубации. Пыльцу инкубировали с  $\text{Ni}^{2+}$  в течение 1 часа. Контроль – 1,5 ч инкубации на стандартной среде.

Этот эффект частично обратим: после отмывки пыльцевых зерен от  $\text{Ni}^{2+}$  и переноса на свежую среду часть из них проросла, но эффективность была примерно в 2 раза ниже, чем в контрольных образцах (Рисунок 50б). Это свидетельствует о том, что в присутствии никеля хотя бы часть пыльцевых зерен сохраняет жизнеспособность и потенциальную способность к прорастанию.

Действительно, жизнеспособность пыльцы, гидратированной в среде с 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , полностью сохранялась через 1 ч инкубации в этой среде по данным теста с FDA (Рисунок 51). При осуществлении этого теста мы обратили внимание, что образцах с добавлением никеля длинных пыльцевых трубок нет, хотя есть много выростов, которые можно рассматривать как

зачатки пыльцевых трубок. Это означает, что происходит инициация прорастания пыльцы, но  $\text{Ni}^{2+}$  блокирует рост трубки на очень ранней стадии.

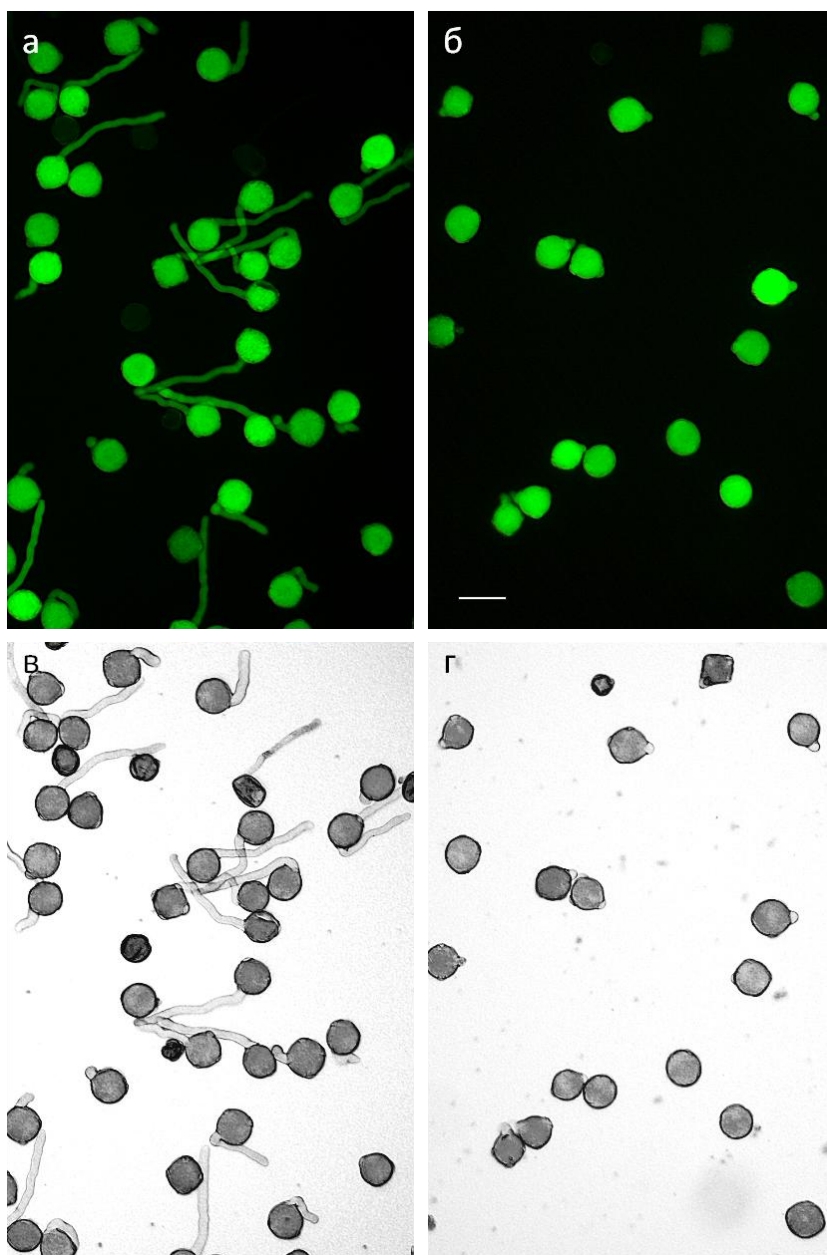


Рисунок 51. Влияние 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  (1 ч) на жизнеспособность пыльцевых зерен по данным теста на жизнеспособность с FDA: а, в – контрольный образец, б, г – обработанный никелем образец; а, б – флуоресценция пыльцевых зерен, в, г – та же пыльца в светлом поле. Масштабная линейка – 50  $\mu\text{m}$ .

Во второй серии опытов было обнаружено, что добавление  $\text{Ni}^{2+}$  после гидратации пыльцы на стандартной среде (3-минутная предварительная инкубация) подавляло прорастание практически в той же степени, что и в первом опыте (Рисунок 50в). Иная картина наблюдалась, когда мы добавляли  $\text{Ni}^{2+}$  к пыльце после активации (30-минутная предварительная инкубация). К этому времени около 30% пыльцевых зерен имели трубки. Средняя длина пыльцевых трубок на момент переноса на Ni-содержащую среду составляла  $20 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , максимальная - 40  $\mu\text{m}$ . При последующей инкубации (1 ч) на стандартной среде, а также на среде с  $\text{Ni}^{2+}$ , прорастание

пыльцы продолжалось (Рисунок 50в). В суспензиях, обработанных никелем, эффективность прорастания составила около 80% от контроля (Рисунок 50в). Таким образом, период активации выявляется как критический для действия  $Ni^{2+}$  на прорастание пыльцы.

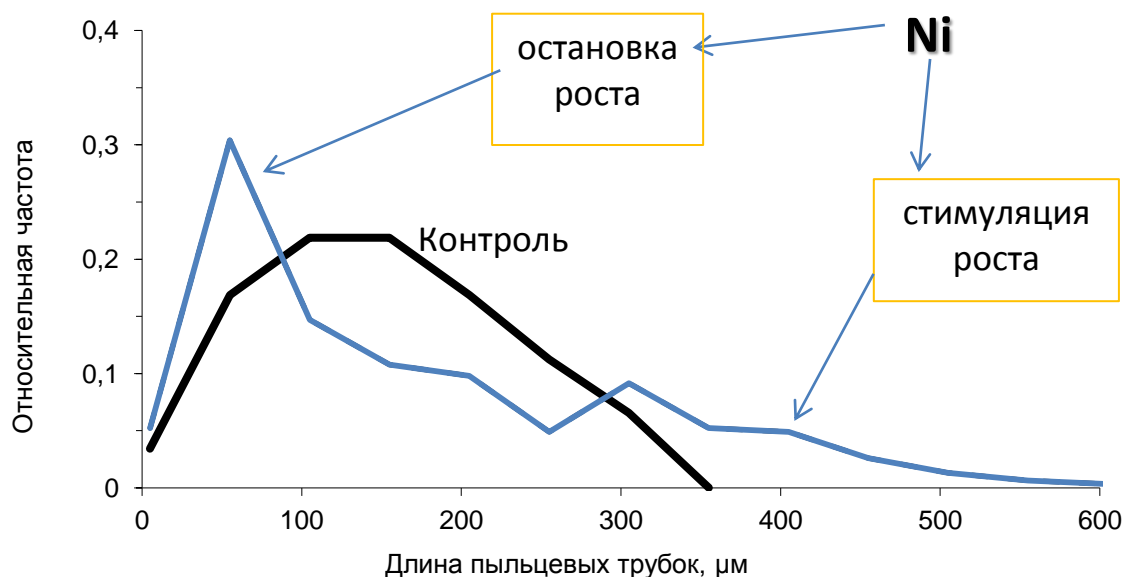


Рисунок 52. Влияние  $Ni^{2+}$  на длину пыльцевых трубок табака. Сплошная линия — контроль (1,5 ч инкубации в стандартной среде), пунктир — обработанные  $Ni^{2+}$  пыльцевые трубки (30 мин преинкубации в стандартной среде + 1 ч в 1 мМ  $Ni(NO_3)_2$ ).

Анализируя распределение пыльцевых трубок по их длине, мы обнаружили, что под влиянием  $Ni^{2+}$  стандартное отклонение значительно увеличилось (75 по сравнению с 48 в контроле), максимальная длина трубок увеличилась на треть (309 по сравнению с 209  $\mu m$ ) и появился высокий пик, соответствующий коротким трубкам (15-55  $\mu m$ ) (Рисунок 51). Таким образом, пыльцевые трубки проявляли различную чувствительность к 1 мМ  $Ni^{2+}$ : значительная их часть прекращала рост на ранней стадии, но в той же популяции некоторые трубки росли с той же скоростью, что и в контроле, или даже быстрее. Последние образуют «хвост» гистограммы, соответствующий сверхдлинным трубкам (> 209  $\mu m$ ).

Таким образом, мы наблюдаем двунаправленный эффект 1 мМ  $Ni^{2+}$  на скорость роста пыльцевых трубок. По-видимому, это связано с разной чувствительностью трубок к этому тяжелому металлу. В ранее опубликованных исследованиях в основном описывалось ингибирующее действие тяжелых металлов на рост трубок (Sawidis and Reiss 1995; Tuna and Bürün 2002; Gür and Topdemir 2008; Sabrine et al. 2010). Однако в ряде случаев наблюдалось и стимулирующее влияние различных металлов на этот процесс, например, в случае кадмия (Xiong and Peng 2001), кобальта (Sawidis and Reiss 1995) или железа (Tuna and Bürün 2002). Очевидно, что это явление представляет самостоятельный интерес и нуждается в дальнейшем изучении.

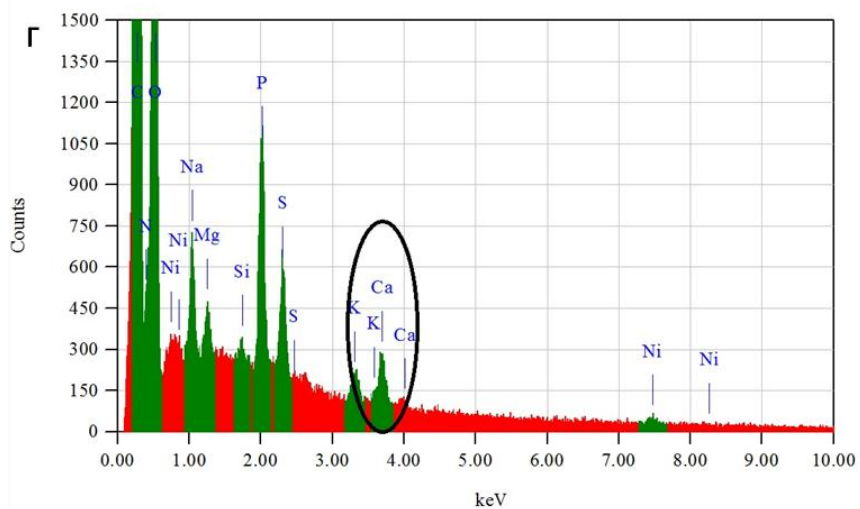
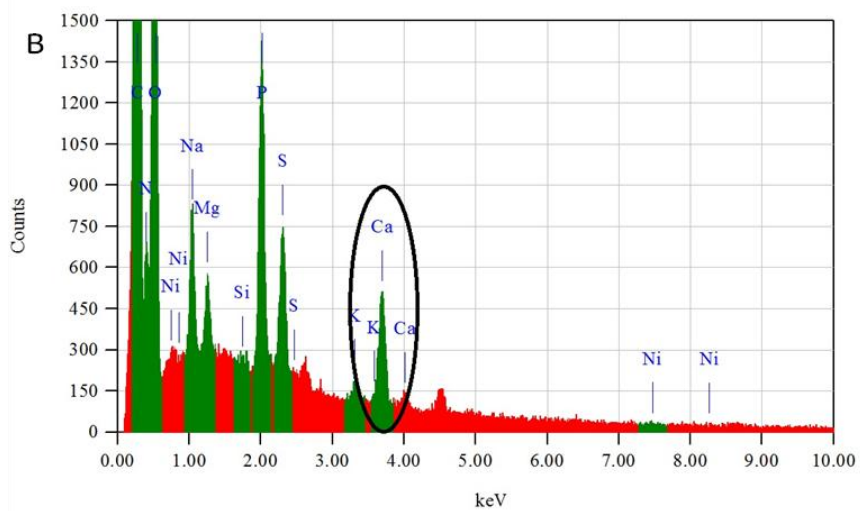
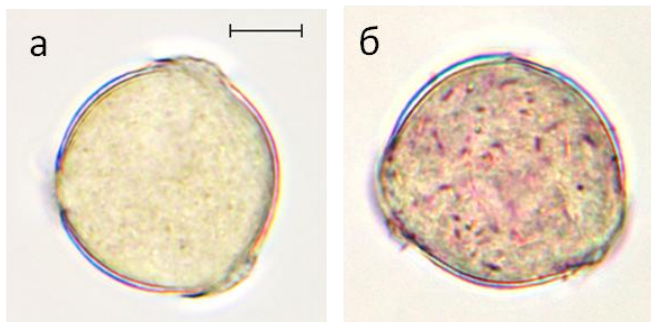


Рисунок 53.  $\text{Ni}^{2+}$  в пыльцевых зёрнах по данным специфического окрашивания (а – контрольное зерно; б – 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ) и рентгеноспектрального микроанализа (в – спектры пыльцевых зерен, активированных в стандартной среде; г – в присутствии 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ). Отмечен пик кальция. Масштабная линейка – 20 мкм.

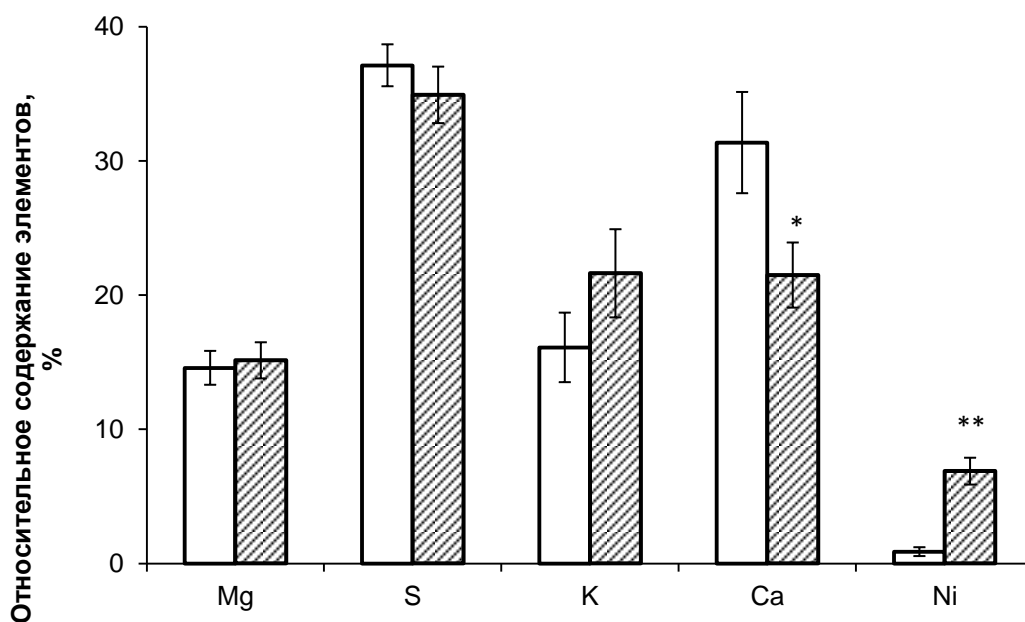


Рисунок 54. Изменение относительного содержания  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  в апертурных областях пыльцевых зерен, активированных в присутствии 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , по сравнению с содержанием Mg, S и K, по данным рентгеноспектрального анализа. Черные столбики – образцы, обработанные никелем, белые столбики – контроль.

Гомеостаз кальция изучали методом микрорентгеноспектрального анализа (Breygina et al. 2012). Мы анализировали апертурную область пыльцевых зерен, в которой экзина отсутствует, поэтому определенные изменения в спектрах отражают изменения элементного состава полисахаридной интины или цитоплазмы. Присутствие никеля в цитоплазме также было подтверждено специальным окрашиванием (Рисунок 53а,б). Активация пыльцы в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  сопровождалась появлением в спектре небольшого, но значимого ( $p < 0,01$ ) пика, соответствующего этому элементу. В то же время в этих клетках значительно снижено относительное содержание кальция (Рисунок 53 в,г, Рисунок 54). Для сравнения показано относительное содержание магния, калия и серы в пыльцевых зернах, которое не изменилось под влиянием никеля. Эти данные позволяют рассматривать нарушение кальциевого гомеостаза как важное звено в цепи нарушений, лежащих в основе влияния никеля на прорастание пыльцы. Отчасти это может быть связано с тем, что  $\text{Ni}^{2+}$  замещает  $\text{Ca}^{2+}$ , связанный с полимерной матрицей интины. Однако вполне вероятно, что мы наблюдаем снижение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, что вызывает нарушение сегрегации везикул и, следовательно, блокирует полярный рост. Косвенно это предположение подтверждается данными о том, что диссипация кальциевого градиента ингибирует рост пыльцевых трубок (Malho et al. 1995), вызывает нарушения транспорта везикул (Malhó et al. 2005) и сборки клеточной стенки (Geitmann and Steer 2006). Однако чтобы выяснить, как  $\text{Ni}^{2+}$  влияет на гомеостаз кальция в пыльцевых зернах и трубках, необходимо специальное исследование.

Дыхание оценивали по скорости поглощения кислорода. Анализ показал, что гидратация и активация пыльцевых зерен в присутствии никеля (инкубация 30 мин) сопровождалась небольшим (на 25% по сравнению с контролем) снижением поглощения кислорода (Таблица 7). Интенсификация дыхания является важным показателем активации пыльцевых зерен и их подготовки к прорастанию (Heslop-Harrison 1987). Известно, что некоторые компоненты ЭТЦ и многие ферменты цикла Кребса чувствительны к тяжелым металлам (Reese and Roberts 1985; Bansal et al. 2002). Можно предположить, что даже незначительное угнетение дыхания вызывает повышенное образование АФК, что, в свою очередь, может вызывать окислительный стресс или влиять на прорастание, нарушая внутриклеточную сигнализацию или модификацию клеточной стенки.

Таблица 7. Действие 1 мМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> на поглощение кислорода пыльцевыми зёрнами табака и продукцию АФК, которую оценивали с помощью красителя DCFH-DA.

Проба	Поглощение O <sub>2</sub> , µмоль·мг пыльцы <sup>-1</sup> ·ч <sup>-1</sup>	Интенсивность флуоресценции пыльцевых зёрен, окрашенных DCFH-DA, отн.ед.
Контроль	0,55±0,02	100±8
1 мМ Ni <sup>2+</sup>	0,41±0,01*	92±3

Однако содержание АФК в пыльцевых зернах, измеренное с помощью окрашивания DCFH-DA, не увеличивалось (Таблица 7), т. е. Ni<sup>2+</sup> не вызывал окислительного стресса в пыльцевых зернах (как и в протопластах, см. Рисунок 57). В совокупности эти данные позволяют предположить, что торможение прорастания пыльцы под влиянием Ni<sup>2+</sup> не может быть объяснено нарушением дыхания и усилением образования АФК.

В основе полярного роста лежит особый паттерн формирования клеточной стенки, который обеспечивает эластичность в апикальной области и достаточную жесткость в более дистальных частях трубки (Geitmann and Steer 2006). Важной особенностью модели формирования клеточной стенки у прорастающей пыльцы цветковых растений является отсутствие каллозы в апикальной зоне (Ferguson et al. 1998). Соответственно, в контрольных образцах активированных пыльцевых зерен специфичный краситель, который связывается с каллозой – обесцвеченный анилиновый синий – не окрашивал инициали трубок. Если пыльца проходила этап активации в присутствии 1 мМ Ni<sup>2+</sup>, на этих участках откладывалась каллоза (а). В пыльцевых трубках в контроле каллоза выявлялась по всей длине трубки, кроме апикальной части (Рисунок 55ж). В трубках, инкубированных с Ni<sup>2+</sup>, картина была различной в зависимости от чувствительности трубки к металлу. В коротких (нерастающих) трубках каллоза откладывалась в стержневой части трубки гораздо обильнее, чем в контроле, но наиболее

массивные отложения располагались в кончике (Рисунок 55г). В длинных (растущих) трубках картина распределения каллозы в присутствии  $Ni^{2+}$  была такой же, как и в трубках из контрольных образцов (Рисунок 55д). Аномальное отложение каллозы в пыльцевых трубках было описано ранее в ответ на воздействие свинца (Sheng et al. 2012) и хрома (Speranza et al. 2009). В обоих случаях в кончике трубки была обнаружена каллоза, как и в наших опытах с никелем. С помощью электронной микроскопии после обработки кадмием наблюдалось неравномерное утолщение стенок пыльцевых трубок (Sawidis 2008). Вероятно, эти утолщения также образуются за счёт отложения каллозы.

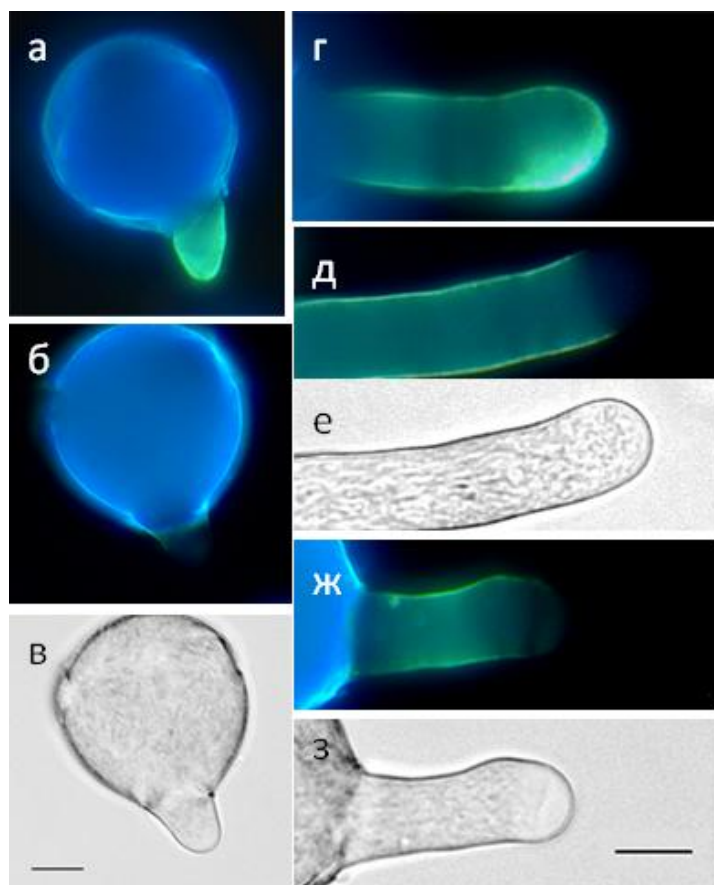


Рисунок 55. Изменение отложения каллозы в присутствии  $Ni^{2+}$  (1 мМ) в очень коротких трубках (а) и в кончиках более длинных нерастущих трубок (г). В контрольных образцах каллоза отсутствует в апикальной части «носиков» (б) и трубок (ж), такая же картина наблюдается в длинных (растущих) трубках, устойчивых к  $Ni^{2+}$  (д): а, б, г, д, ж – пыльцевое зерно и трубка, окраска обесцвеченным анилиновым голубым; в, е, з – те же объекты, что и на изображениях б, д, ж соответственно, в светлом поле. Масштабная линейка – 10  $\mu\text{m}$  (пыльцевые зерна) и 7  $\mu\text{m}$  (пыльцевые трубки).

В некоторых случаях синтез каллозы может рассматриваться как защитная реакция, как в протонеме *Funaria hygrometrica* (Krzyszowska 2011). В этом случае отложение каллозы в апексе, по-видимому, блокировало миграцию свинца в протопласт. Реализуется ли эта функция в пыльце, неизвестно. Однако вполне вероятно, что отложение каллозы изменяет механические свойства апикальной стенки и, таким образом, препятствует нормальному полярному росту.

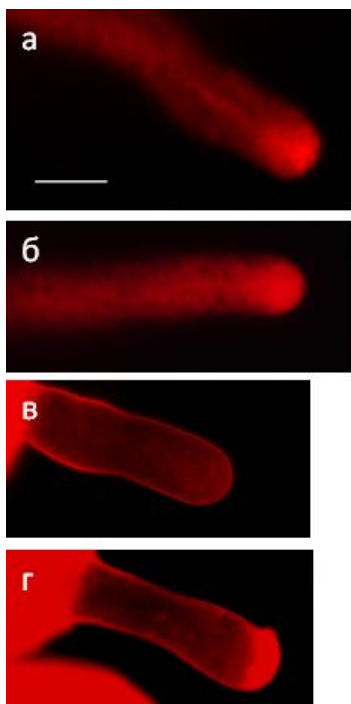


Рисунок 56. Влияние  $\text{Ni}^{2+}$  на сегрегацию транспортных везикул в верхушке пыльцевой трубки (30 мин преинкубации в стандартной среде + 1 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ). Образцы окрашивали FM4-64. а, б – типичный конус окрашенных везикул в верхушке контрольной трубки (а) и длинной (растущей) трубке из обработанного никелем образца (б); в, г – изменение распределения везикул в коротких (нерастущих) трубках: равномерное распределение по всей трубке (в) и массивное пятно в верхушке (г). Масштабная линейка – 10  $\mu\text{m}$ .

Анализ везикулярного транспорта в пыльцевых трубках проводили путём окрашивания FM4-64. В этих опытах было показано, что в трубках, которые продолжали расти в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  и достигли длины более 90  $\mu\text{m}$ , картина распределения везикул не отличалась от таковой в контрольных образцах (Рисунок 56а,б). Типичным свойством таких трубок является концентрация окрашенного мембранного материала в кончике трубки. Он образует конус с основанием, прилегающим к апикальной плазматической мембране. В трубках, остановивших или сильно замедливших свой рост под влиянием никеля, появились различные аномалии. Как правило, кончик трубки окрашивался диффузно, характерный конус не образовывался (Рисунок 56в). Во многих трубках мы обнаружили плотные скопления ярко окрашенного материала, примыкающие к апикальной или субапикальной мембране (Рисунок 56г). Таким образом, в этих трубках никель вызывал значительные нарушения везикулярного транспорта. Ранее потеря полярности в распределении органелл (в частности, транспортных везикул) в растущих пыльцевых трубках наблюдалась при изучении действия кадмия (Sawidis 2008).

Таким образом,  $\text{Ni}^{2+}$  не блокирует выход пыльцевых зерен из состояния покоя и инициацию прорастания. В то же время, период активации является критическим для ингибирующего действия  $\text{Ni}^{2+}$  на прорастание. Мы обнаружили, что  $\text{Ni}^{2+}$  изменяет кальциевый гомеостаз в области апертуры пыльцевого зерна и характер формирования клеточной стенки в



инициалах трубок. Как следствие, он практически полностью блокирует полярный рост на ранней стадии. Токсическое действие  $Ni^{2+}$  проявляется и после прорастания: в коротких пыльцевых трубках нарушается как паттерн отложения стенки, так и сегрегация транспортных везикул; оба нарушения проявляются именно в растущем компартменте – в кончике. Однако значительная часть пыльцевых трубок не имеет аномалий и характеризуется нормальным или даже ускоренным ростом, что ставит вопрос о механизмах, лежащих в основе стимулирующего действия  $Ni^{2+}$  (Breygina et al. 2012).

Следующим этапом был поиск мишеней для никеля и второго воздействия ( $Cu^{2+}$ ), которое мы ввели в эксперименты как АФК-опосредованное. Для электрофизиологических опытов использовалась разработанная ранее модельная система – протопласты, выделенные из пыльцевых зёрен лилии, и было выбрано два тока:  $K^+$  и  $H^+$ . Оба тока достаточно сильные, их принципиальное отличие заключается в механизме переноса иона:  $K^+$  ток проходит пассивно через каналы, а транспорт  $H^+$  происходит с участием протонной помпы, то есть требует затраты энергии. Известно, что выход  $K^+$  и  $H^+$  активируются на начальных этапах прорастания пыльцевого зерна до появления трубки (см. Раздел IV.1. Начальные этапы прорастания у цветковых растений), в дальнейшем оба иона непосредственно участвуют в регуляции мембранного потенциала пыльцевой трубки (Breygina and Klimenko 2020).

Гиперпродукцию АФК в протопластах под действием  $100 \mu M Cu^{2+}$  иллюстрирует Рисунок 57. Уровень АФК в присутствии  $Ni^{2+}$  достоверно не отличается от контроля.

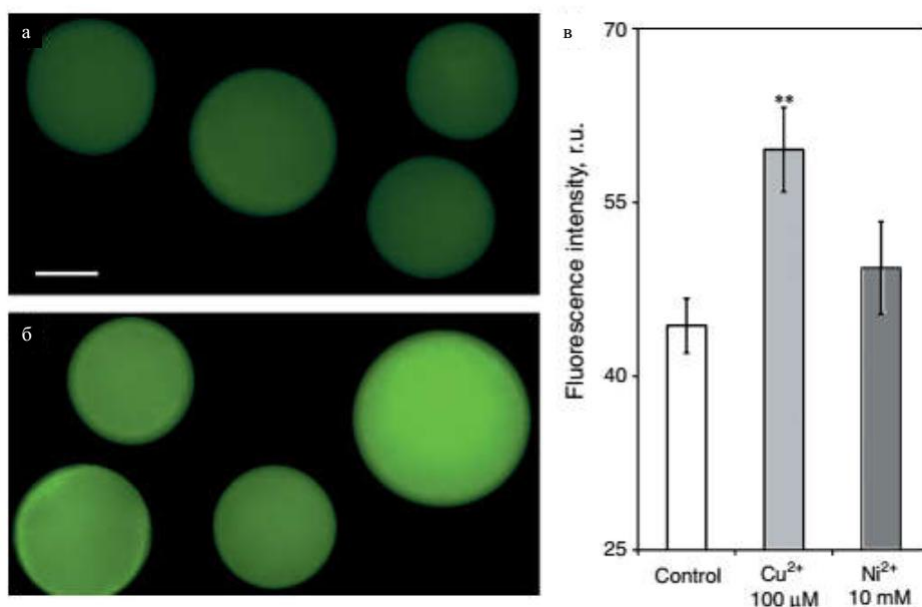


Рисунок 57. Накопление АФК в протопластах из пыльцевых зёрен лилии, обработанных тяжелыми металлами. а, б – АФК-зависимая флуоресценция DCFH в контрольной суспензии (а) и после 10-минутной обработки  $100 \mu M Cu^{2+}$  (б). Средние значения сигнала для популяции протопластов ( $n = 120$ ) демонстрируют умеренное возрастание этого показателя при инкубации с медью ( $P < 0.01$ ,  $t$  тест Стьюдента) (в). Протопласты, обработанные  $Ni^{2+}$  (1 mM), достоверно не отличались по уровню АФК от контрольных. Масштабная линейка – 50  $\mu m$ .

## 6.2. Действие $\text{Ni}^{2+}$ на выходящий ток $\text{K}^+$

Выходящий  $\text{K}^+$  ток регистрировали аналогично экспериментам с пероксидом водорода (см. стр. 150). Принадлежность тока также проверяли путём добавления ингибитора ТЕА (Рисунок 44). Чтобы выявить возможное действие тяжелых металлов, использовали 1 и 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  (обе концентрации не влияют на продукцию АФК) а также  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации, которая вызывает гиперпродукцию АФК (100  $\mu\text{M}$ ). В то время как медь и более низкая концентрация никеля не вызывали заметных изменений тока  $\text{K}^+$ , 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  провоцировал сильное и резкое снижение амплитуды  $\text{K}^+$  тока (Рисунок 58), при этом ингибирование было полностью обратимо (отмывка длилась 7-10 мин) (Breugina et al. 2017). Отсутствие реакции калиевого тока на медь говорит о специфичности данного эффекта. Этот результат согласуется с описанными выше данными о разнообразных эффектах никеля на пыльцевые зёрна и трубки табака, однако концентрация металла для лилии оказалась выше, что может быть объяснено видовой спецификой, а также повышенной чувствительностью к токсиканту именно полярно растущей трубки. Взаимосвязь между прямым действием на калиевые каналы и физиологическими ответами клетки, которые проявляются при инкубации с металлом, ещё предстоит выяснить. Возможно, никель действует не только на мембранные мишени, но и на внутриклеточные, поскольку проникновение металла в цитозоль было ранее продемонстрировано (Рисунок 53).

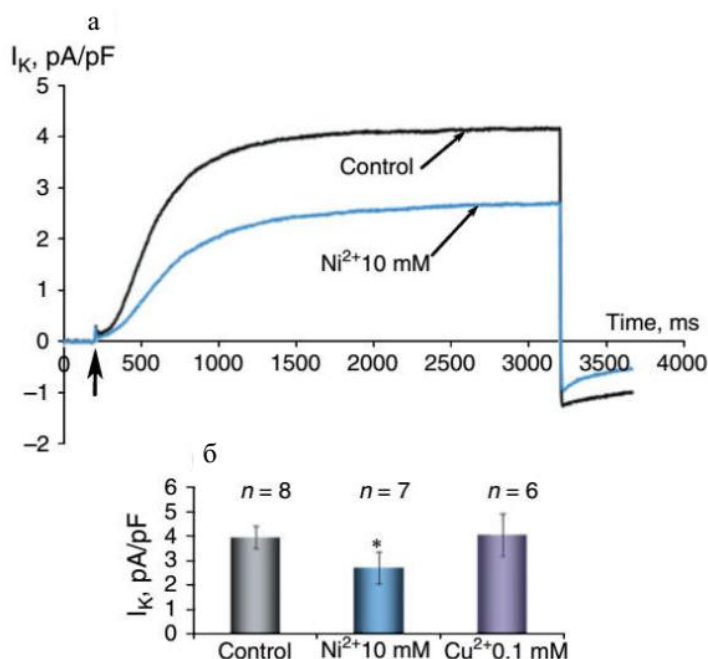


Рисунок 58. Действие  $\text{Ni}^{2+}$  на входящий ток  $\text{K}^+$  в протопластах из пыльцевых зёрен лилии: а – оригинальное измерение в контрольных условиях и в присутствии 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ ; б – сравнение максимальной плотности тока в контрольных условиях и при действии 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  или 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ .  $P < 0.05$ , тест Манна-Уитни.

При этом мы получили данные о том, что в присутствии эффективных концентраций никеля протопласты сохраняли жизнеспособность и поддерживали мембранный потенциал на контрольном уровне (Таблица 8). Как следует из этих данных, способность пыльцевого зерна поддерживать гомеостаз оказалась не затронута  $\text{Ni}^{2+}$ , что согласуется с обратимостью эффекта на  $\text{K}^+$  ток. Тот факт, что в условиях блокирования тока  $\text{K}^+$  мембранный потенциал не меняется, может объясняться компенсаторными токами через другие ион-транспортные системы, например, анионные каналы.

Таблица 8. Отсутствие эффектов  $\text{Cu}^{2+}$  на pH (оценивался с помощью pH-чувствительного ратиометрического красителя BCECF), а также  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  на мембранный потенциал (оценивался с помощью потенциал-чувствительного ратиометрического красителя di-4-ANEPPS). Статистически значимые различия отсутствуют.

	Control	100 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$	10 mM $\text{Ni}^{2+}$
<b>BCECF</b>	1,32±0,04	1,39±0,03	-
<b>Fb/Fg</b>	2,67±0,05	2,76±0,03	2,65±0,05

Чувствительность ионных каналов растительных клеток к токсичным двухвалентным металлам описана в классических работах, выполненных на корнях кукурузы (Morgutti et al. 1981; Sosucci and Morgutti 1986), но ингибирование тока  $\text{K}^+$  описано не было. Позже чувствительность к никелю была показана для неселективных катионных каналов тонопласта (Corem et al. 2009). Таким образом, в нашей работе впервые описана чувствительность  $\text{K}^+$ -проводящих каналов плазмалеммы к никелю в растительных клетках (Breygina et al. 2017). Обнаруженный эффект может лежать в основе негативного действия высоких концентраций никеля на клеточном уровне, а также быть частью механизма реализации защитного ответа растительной клетки.

### 6.3. Активация протонного тока под действием $\text{Cu}^{2+}$

Показав, что ионы меди не влияют на ток  $\text{K}^+$ , мы выявили одну из возможных причин различий в проявлении токсического действия никеля и меди на мужской гаметофит. Какова же основная мишень для действия меди? В опубликованных работах, выполненных на соматических клетках, было установлено, что  $\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы играет ключевую роль в адаптации растений к стрессовым факторам (Janicka-Russak, 2011). В связи с этим одной из возможных мишеней для меди в пыльцевом зерне мы рассматривали этот фермент. Действие  $\text{Cu}^{2+}$  на ток  $\text{H}^+$  было описано в различных модельных системах, и эффекты различались:  $\text{Cu}^{2+}$  индуцировала выкачивание  $\text{H}^+$  из клеток корней кукурузы, а у огурца, напротив, происходило его ингибирование (Burzyhski and Kolano, 2003). Активация  $\text{H}^+$ -АТФазы при стрессе,

индуцированном  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$ , опосредованная фосфорилированием фермента, была обнаружена в другом исследовании на клетках корня огурца (Janicka-Russak et al., 2012).

Для запуска протонного тока использовался 5-секундный широкий скачок потенциала (Рисунок 59а, врезка). Ток стабилизировался в течение 15 минут, после чего к протопласту добавляли различные воздействия. Запись в контрольных протопластах шла непрерывно для сравнения с опытными образцами. Протокол был взят из работы, в которой авторы идентифицировали ток протонов через  $\text{H}^+$ -АТФазу в том же объекте (Gehwolf et al., 2002). Ортованадат натрия (3 мМ) вызывал значительное уменьшение регистрируемого потока (Рисунок 59), подтверждая природу тока.

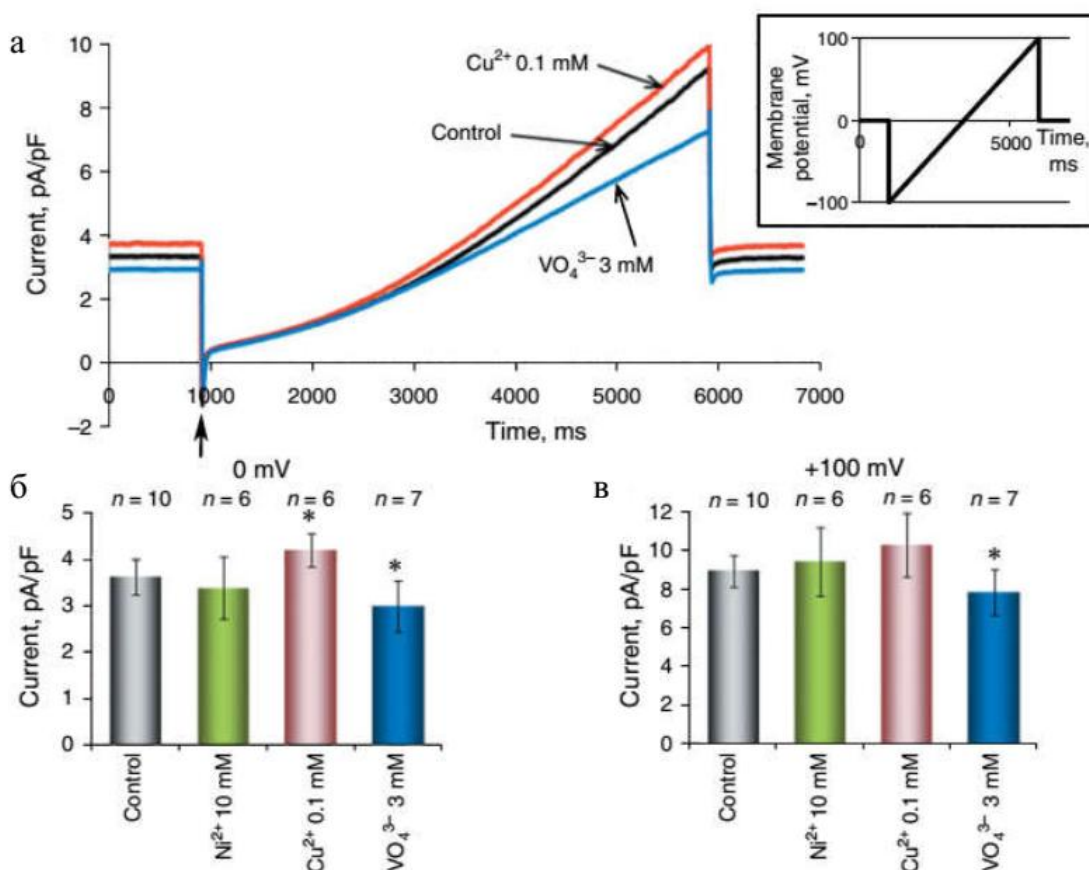


Рисунок 59. Активация  $\text{H}^+$  тока в протопластах из пыльцевых зёрен лилии 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ : а – оригинальная кривая в контроле, в присутствии 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  и 3 мМ  $\text{VO}_4^{3-}$ ; б, в – средняя плотность тока при потенциале покоя (б) и максимально положительных значениях (а) в контроле и после различных воздействий. Представлены средние значения (n=6-10) и стандартные ошибки. \* - достоверные отличия от контроля (P < 0.05, тест Манна-Уитни).

Сравнивая эффекты двух металлов на ток  $\text{H}^+$ , мы тестировали 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  и 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ . В то время как 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  никак не влиял на силу тока, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  вызывала значительное повышение амплитуды тока (Рисунок 59), которое не проявлялось в присутствии ортованадата. Таким образом,  $\text{VO}_4^{3-}$ -чувствительный  $\text{H}^+$  ток значительно усиливается в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$  (Breygina et al. 2017). При этом окрашивание протопластов на мембранный потенциал и внутриклеточный pH показало, что медь в исследуемой концентрации не влияет ни на один из

этих параметров (Таблица 8). По-видимому, внутриклеточный рН и мембранный потенциал эффективно поддерживаются на постоянном уровне при повышении активности  $H^+$ -АТФазы.

Ранее активация  $H^+$ -АТФазы в условиях длительного умеренного стресса, вызванного присутствием меди (0.5 мМ) была описана в пекарских дрожжах (Fernandes and Sa-Correia 2001), а у слизевика *Dictyostelium discoideum* этот металл подавлял активность протонной помпы (Serrano et al. 1985). Регуляция активности этого фермента тяжелыми металлами в пыльце до настоящей работы не изучалась. Обнаруженный нами стимулирующий эффект может рассматриваться как один из элементов адаптации к стрессу. В то же время, обнаруженное нами отличие в реакции протонного тока на два тяжелых металла с высокой долей вероятности отражает механизмы их действия на ион-транспортные белки. Поскольку медь является редок-активным металлом и повышает содержание в протопластах АФК (Рисунок 57), в отличие от никеля, можно предположить, что эффект на  $H^+$ -АТФазу опосредован АФК, а эффект на  $K^+$  каналы, который мы описали для никеля, является АФК-независимым. Однако, экстраполировать данные, полученные с участием  $Cu^{2+}$ , на АФК-регуляцию в мужском гаметофите вне стресса, следует с осторожностью, так как медь участвует в реакции Фентона, а значит, основным продуктом является  $OH\cdot$ . Этот агент, по нашим данным, отрицательно влияет на рост пыльцевых трубок (Рисунок 14), вызывает деполаризацию мембраны (Рисунок 48) и нарушения везикулярного транспорта (Рисунок 15). То есть, присутствие гидроксил радикала само по себе является стрессом и может рассматриваться как негативный фактор регуляции полярного роста.

\*\*

Суммируя наши результаты, можно заключить, что действующими агентами при прорастании пыльцы являются различные АФК, и их воздействие на мужской гаметофит реализуется с участием ион-транспортных систем, включая кальций-проводящие и калиевые каналы, а также мембранный потенциал и, возможно,  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы. При этом действие на ионный транспорт и ростовые процессы зависит от того, какая активная форма кислорода присутствует в системе. В целом, пероксид водорода и супероксид радикал могут рассматриваться как стимулирующие факторы, поскольку могут положительно влиять на прорастание, рост, стимулировать ионные токи и вызывать гиперполяризацию плазмалеммы; чувствительность к этим АФК у мужских гаметофитов растений разных видов различается. На основании полученных данных мы предположили, что у разных растений *in vivo* основным регуляторным фактором может быть одна или другая активная форма кислорода. По нашей гипотезе, для лилии  $O_2^{\cdot-}$  – стимулирующий пыльцу фактор, источником которого являются женские ткани спорофита,  $H_2O_2$  же в первую очередь вырабатывается самой пыльцевой

трубкой, поддерживая полярные ионные токи; •ОН – потенциальный ингибитор прорастания и роста трубок, который может вырабатываться, например, в случае несовместимого опыления.

Высокая чувствительность протопластов из мужского гаметофита табака к  $H_2O_2$  (Рисунок 42) (Максимов et al. 2015), а также стимуляция прорастания пыльцы табака пероксидом водорода (Smirnova et al. 2013) позволила предположить его ведущую роль в контроле прорастания у этого вида. В пользу этого предположения также свидетельствовали и наши данные о влиянии  $H_2O_2$  на протеом пыльцевого зерна (Рисунок 12) (Breygina et al. 2021b). Для проверки этой гипотезы следовало проверить обнаруженные закономерности в системах *semi-in-vivo* и *in vivo*.

## Глава VI. АФК в рецептивных жидкостях покрытосеменных и хвойных растений<sup>5</sup>

Продукция АФК пестиком может быть детектирована несколькими методами, включая поверхностное окрашивание тканей. Однако, это не позволяет количественно оценивать продукцию АФК и затрудняет дифференцировку между различными АФК, поскольку практически все красители, пригодные для такого анализа, неспецифичны. Ещё сложнее проводить эксперименты с голосеменными растениями, которые совершенно не были изучены в этом отношении. Мы разработали подход, позволяющий преодолеть ограничения для цветковых растений с влажным рыльцем и большинства хвойных растений. Он основан на количественном анализе рецептивных жидкостей, которые собираются с женских тканей на разных стадиях развития до и после опыления. У цветковых растений к рецептивным жидкостям относят экссудат рыльца: присутствие этой жидкости характерно для представителей многих семейств, включая лилейные и пасленовые, а у голосеменных – опылительную каплю, которая выделяется нуцеллусом семезачатка для адгезии и втягивания пыльцы. Для анализа АФК в рецептивных жидкостях использовали самый чувствительный метод их детекции – ЭПР спектроскопию, а также спектрофотометрию и спектрофлуориметрию. Кроме того, для обнаружения эффектов АФК в составе экссудата мы применяли модельные системы *semi-in-vivo*, изучая влияние рецептивной жидкости на мужской гаметофит или его часть (протопласт). Основными объектами были табак, лилия и ель, позже мы расширили спектр видов, включив в исследование представителей других таксонов.

---

<sup>5</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **Breygina M.A.**, Klimenko E.S., Shilov E.S., Podolyan A.O., Mamaeva A.S., Zgoda V.G., Fesenko I. Hydrogen peroxide in tobacco stigma exudate affects pollen proteome and membrane potential in pollen tubes. // *Plant Biology*. – 2021. – Vol. 23. – № 4. – P. 592-602 (IF =3.9, , 0,85/**0,7**)
2. **Breygina M.A.**, Schekaleva O.I., Klimenko E.S., Luneva O.G. The balance between different ROS on tobacco stigma during flowering and its role in pollen germination. // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – № 7 (IF =4.5, 0,9/**0,7**)
3. **Breygina M.A.**, Lazareva N.S., Babushkina K.O., Kirilyuk I.A. Pattern of ROS generation and interconversion on wet stigmas in basal and divergent angiosperms. // *Plant Growth Regulation*. – 2023 (IF =4.2, 0,75/**0,6**).

## VI.1 Роль АФК в рыльцевом экссудате в контроле мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака и протопластах из трубок

Мы разработали упрощенную модельную систему – суспензию субпротопластов из пыльцевых трубок табака – для детектирования ключевых физиологических параметров методом проточной цитометрии. Этот подход позволяет быстро и точно оценить распределение параметра в большой популяции клеток. Стратегия выделения популяции описана в Материалах и методах.

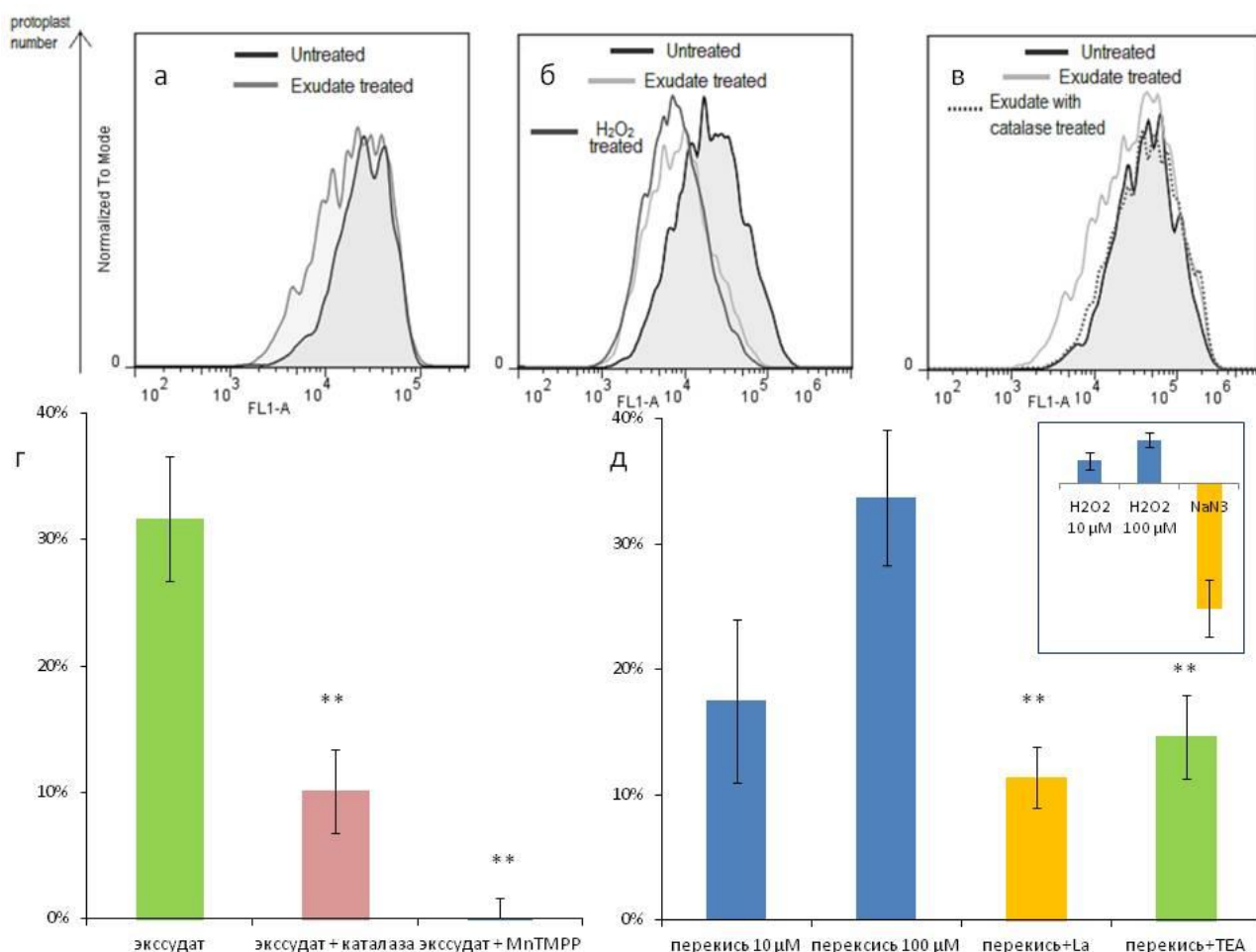


Рисунок 60. Гиперполяризация протопластов пыльцы в присутствии экссудата рыльца. а-в – гистограммы протопластов, окрашенных DiBAC<sub>4</sub>(3) (примеры типичных измерений, созданные в программе FlowJo). FL1-A – первый канал флуоресценции (лазер 488 нм), условные единицы. Снижение интенсивности флуоресценции отражает гиперполяризацию в присутствии экссудата рыльца (а, б), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (б). После обработки каталазой экссудат рыльца утратил способность вызывать гиперполяризацию (в); г, д – средняя гиперполяризация для всех опытов (Δ интенсивность флуоресценции, нормированная на контроль) в присутствии экссудата (г) без (n=9) или с каталазой (n=6)/тушителем АФК MnTMPP (n=5); (д) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с (n=4;5) или без (n=4;6) блокаторов катионных каналов. Для тестирования ингибиторов использовали 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вставка – NaN<sub>3</sub> вызывает депольаризацию. n указывает количество независимых экспериментов. \*\* – P<0,01

Применение данной модельной системы позволило выявить гиперполяризацию плазмалеммы под действием экссудата рыльца. Популяция протопластов демонстрировала



относительно стабильную флуоресценцию DiBAC<sub>4</sub>(3), на которую сильно влияла аликвота эксудата. Сдвиг флуоресценции в сторону меньшей интенсивности отражает гиперполяризацию протопластов (

Рисунок 60а). Эффект был сходен с тем, который ранее был показан нами для пероксида водорода (Рисунок 42). Для проверки значимости H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в составе эксудата сравнивали чистый эксудат рыльца и эксудат, обработанный каталазой (100 ЕД/мл) и тушителем АФК MnTMPPP (200 μM). После такой обработки эксудат не вызывал гиперполяризацию (

Рисунок 60в, г). Для проверки гипотезы об участии катионных каналов в передаче сигнала АФК тестировали влияние на субпротопласты H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в комбинации с ингибиторами K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-проводящих каналов TEA и LaCl<sub>3</sub> (

Рисунок 60д). Мы показали, что эффект 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и эксудата совпадает (

Рисунок 60б), в присутствии каталазы и ингибиторов он подавлен в значительной мере. Таким образом, важным действующим веществом в эксудате рыльца табака является пероксид водорода, а его эффект реализуется с участием ионных каналов (Breugina et al. 2021b).

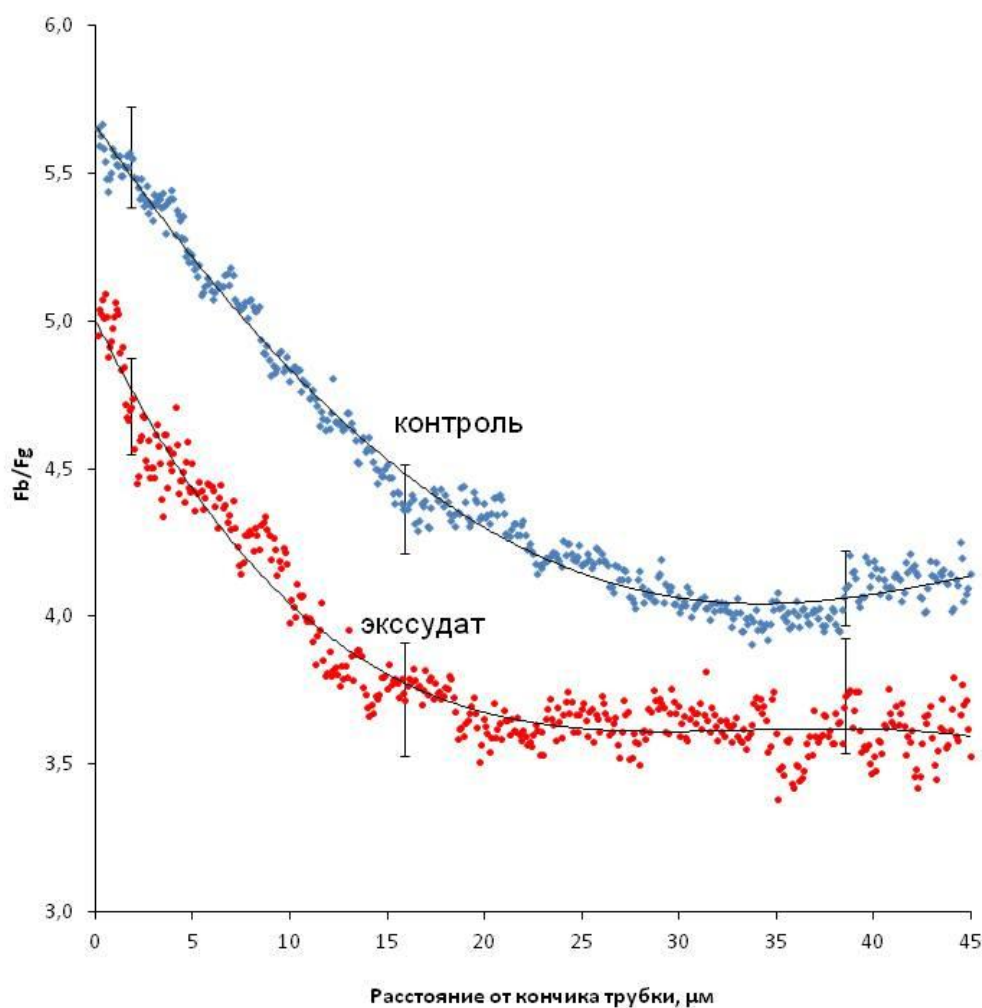


Рисунок 61. Гиперполяризация пыльцевых трубок табака, вызванная добавлением эксудата рыльца. Картирование мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака, окрашенных Di-4-ANEPPS. Значительная гиперполяризация наблюдается в апикальной и

субапикальной частях трубок, обработанных экссудатом рыльца (n=15), по сравнению с контролем (n=31).

Гиперполяризация в ответ на экссудат рыльца выявлялась и в интактных пыльцевых трубках табака, что подтвердило актуальность данных, полученных на упрощённой модельной системе – протопластах. Мы использовали оптическое картирование в растущих пыльцевых трубках с помощью ратиометрического окрашивания Di-4-ANEPPS и количественной флуоресцентной микроскопии. Как мы уже показали ранее, в контрольных пыльцевых трубках имеется градиент мембранного потенциала с деполяризованной апикальной частью по отношению к стержневой части (Рисунок 34). Добавление аликвоты свежего экссудата рыльца к суспензии пыльцевых трубок сразу вызывает гиперполяризацию в апикальной и субапикальной частях трубки ( $P < 0,01$  для 2 и 15  $\mu\text{m}$  от кончика), в базальной части разница статистически незначима; во всех трубках градиент сохранялся (Рисунок 61) (Breugina et al. 2021b).

Таким образом, мы продемонстрировали значимость экссудата рыльца и АФК в его составе в качестве возможного регулятора ионного гомеостаза в пыльцевой трубке табака. Это привело к необходимости оценить содержание тех или иных АФК в экссудате рыльца и исследовать динамику их продукции.

## VI.2 Образование $\text{O}_2^{\bullet -}$ и $\text{H}_2\text{O}_2$ на рыльцах табака и лилии

Для обнаружения АФК в рыльцевом экссудате табака мы использовали два метода детекции, один из которых неспецифичен и показывает общий уровень АФК (флуоресценция DCF), а другой специфичен для  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Спектрофлуориметрические измерения продемонстрировали усиление сигнала DCF в растворе экссудата по сравнению с водой или фосфатным буфером, которые использовались для обнуления прибора. В присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и тушителя  $\text{O}_2^{\bullet -}$  MnTMPPP сигнал снижался почти до фонового уровня (Рисунок 62а). Таким образом,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и/или  $\text{O}_2^{\bullet -}$  содержатся в экссудате в значительных количествах (Breugina et al. 2021b). Для проверки и уточнения полученных данных мы использовали спектрофотометрический метод FOX-1. Мы обнаружили значительное поглощение во всех образцах экссудата, отражающее относительно высокий уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Рисунок 62б). Калибровка сигнала стандартными разведениями чистой  $\text{H}_2\text{O}_2$  позволила определить концентрацию пероксида в экссудате, в контрольных образцах она составила  $332 \pm 30 \mu\text{M}$ , но так как экссудат в данном случае представлял собой смыв с нескольких рылец, мы представили цифры (Рисунок 62в) как количество  $\text{H}_2\text{O}_2$  на единицу площади рыльца. Сигнал значительно снизился после 5-минутной предварительной инкубации экссудата с каталазой или аскорбиновой кислотой ( $P < 0,01$ ) (Breugina et al. 2021b).

Далее для изучения динамики продукции АФК мы условно разделили развитие цветка на 3 стадии до опыления и одну после опыления. Первая стадия соответствовала закрытому цветку, уже достигшему окончательного размера. Переход ко второй стадии соответствует раскрытию венчика, а от второй к третьей – раскрытию пыльников. Стадия 4 соответствует пестикам на следующий день после опыления, когда они уже утратили восприимчивость к опылению, но ещё нет видимых признаков старения. Ранние стадии развития цветка мы не изучали, так как экссудат в это время отсутствовал – наши исследования были сосредоточены на стадиях зрелости и непосредственно ей предшествующих. Табак и лилия имеют разный размер цветка, разный тип экссудата рыльца (липидный и углеводный, соответственно) и относятся к филогенетически отдаленным таксонам.

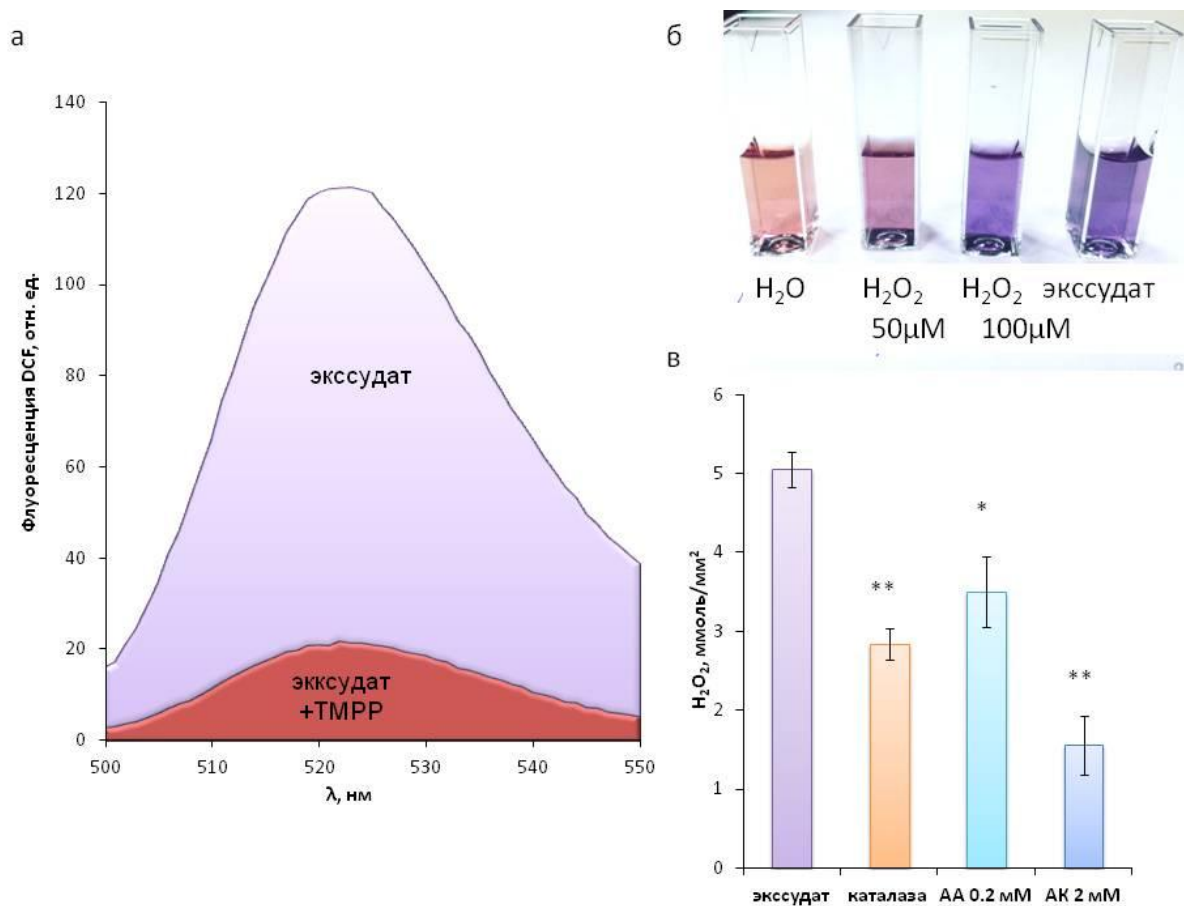


Рисунок 62. Обнаружение АФК в экссудате рыльца табака. а – типичный спектр флуоресценции DCFH в присутствии экссудата рыльца до и после добавления тушителя АФК Mn-TMPP (200 μM); б – типичная картина окрашивания ксиленоловым оранжевым после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и экссудата (метод FOX-1); в – относительное содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на рыльце, оцененное методом FOX-1 в контрольных образцах (n=9), после добавления каталазы (n=4), аскорбиновой кислоты в концентрации 0,2 и 2 мМ (n=5 и 4, соответственно). n – количество независимых повторностей. Каждый образец собирали с 9 случайно выбранных пестиков. \*\* – P<0,01, \* – P<0,05.

Мы использовали ЭПР спектроскопию с неспецифическим спиновым зондом CAT1N для определения общего уровня АФК на каждой стадии созревания рыльца и после опыления.

Примеры применения гидроксиламиновых спиновых зондов у растений см. в обзоре Штеффен-Хайнс и Штеффенс (Steffen-Heins and Steffens 2015). Преимущество этих зондов заключается в том, что они реагируют с АФК гораздо быстрее, чем нитроновые спиновые ловушки, и очень стабильны. Они, однако, не селективны (Dikalov et al. 2011, 2018). Не дающий ЭПР сигнала спиновый зонд САТ1Н может быть окислен до стабильного нитроксида САТ1 различными активными формами кислорода, в основном супероксидным радикалом, гидроксильным радикалом и пероксидом водорода; данной реакцией характеризуется общая окислительная способность внеклеточной среды. Чтобы различать АФК, мы использовали специфическую спиновую ловушку — DEPMPO, которая определяет уровень  $O_2^{\cdot -}$ , продуцируемого на рыльце *in vivo*.

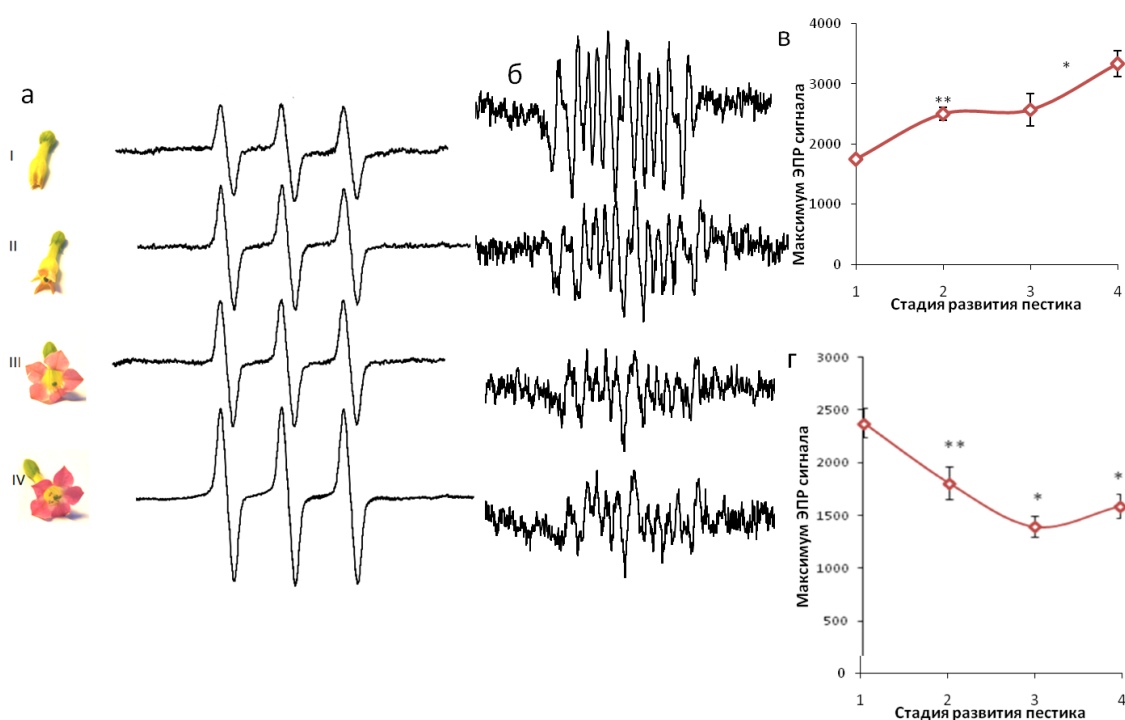


Рисунок 63. Динамика продукции суммарных АФК (а, в) и  $O_2^{\cdot -}$  (б, г) пестиками табака по данным ЭПР спектроскопии: а, б – характерные спектры спинового зонда САТ1Н (а) и ловушки DEPMPO (б), а также стадии развития цветков; в, г – обсчет средних максимумов ЭПР сигнала для САТ1Н (в) и DEPMPO (г), а также стандартная ошибка и достоверность различий по критерию Манна-Уитни.  $P < 0,01$ , \* –  $P < 0,05$ .

Табак и лилия показали сходные паттерны суммарной окислительной способности. Уровень АФК постепенно повышается по мере созревания, а затем резко возрастает после опыления (Рисунок 63 а,в, Рисунок 64 а,в). В то же время уровень продукции супероксид радикала у двух видов имеет разную динамику. У табака она снижается на первых двух стадиях, достигает минимума на стадии фертильности и несколько увеличивается после опыления (Рисунок 63 б,г). У лилии продукция супероксида стабильна во время созревания

рыльца, достигает своего пика в фертильных рыльцах и после опыления снижается до исходного уровня (Рисунок 64 б,г).

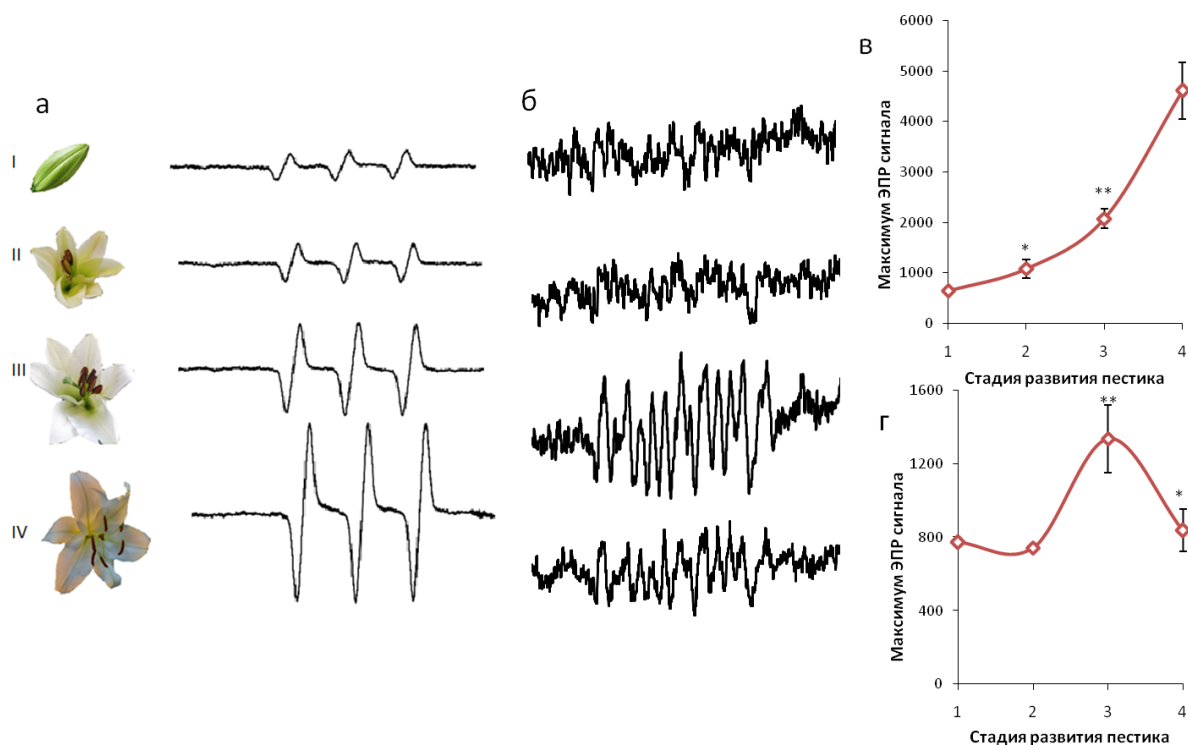


Рисунок 64. Динамика продукции суммарных АФК (а, в) и  $O_2^{\cdot-}$  (б, г) пестиками лилии по данным ЭПР спектроскопии: а, б – характерные спектры спинового зонда CAT-1H (а) и ловушки DERMPO (б), а также стадии развития цветков; в, г – обсчет средних максимумов ЭПР сигнала для CAT-1H (в) и DERMPO (г), а также стандартная ошибка и достоверность различий по критерию Манна-Уитни.  $P < 0,01$ , \* –  $P < 0,05$ .

Мы также измерили концентрацию  $H_2O_2$  в экссудате рыльца, используя колориметрический метод FOX-1. Динамика у двух видов существенно различалась. Табак показал снижение уровня  $H_2O_2$  по мере созревания рыльца (Рисунок 65 а). В абсолютных значениях продуктивность этого вида была высокой. Лилия показала значительное повышение уровня пероксида вплоть до стадии полной фертильности (Рисунок 65 б); после опыления уровень не изменился. Общая продукция пероксида водорода в лилии была значительно ниже, чем в табаке.

Прорастание, рост и направление пыльцевых трубок по тканям пестика — строго регулируемый процесс, включающий непрерывный обмен сигналами, как физическими, так и химическими (Heslop-Harrison 2000; Hiscock and Allen 2008). Было показано, что рыльца разных видов накапливают АФК, когда они восприимчивы, и что эти уровни снижаются на рыльцах, поддерживающих развитие пыльцы (Serrano et al. 2015). Наиболее понятной и легко объяснимой представляется идея о том, что накопление АФК идет рука об руку с созреванием

пестика и соответствует подготовке к опылению. Но исследование, проведенное на большом количестве видов, показало, что такая закономерность справедлива только для одних видов, а у других, наоборот, перед опылением количество АФК снижается (Zafra et al. 2016). Однако тот факт, что АФК продуцируются в созревающем пестике, является общим для всех изученных на сегодняшний день цветковых растений (Johnson et al. 2019; Zhang et al. 2020).

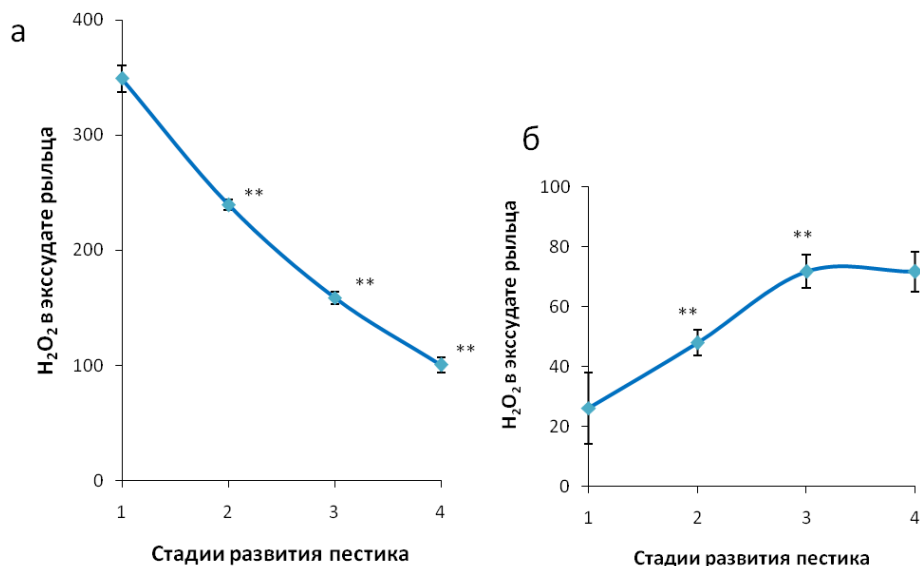


Рисунок 65. Концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в смыве с рыльца табака (а) и лилии (б), измеренная спектрофотометрически в цветной реакции с ксиленоловым оранжевым (метод FOX-1). Достоверность различий определялась по критерию Стьюдента (\*\* P < 0.01).

Ранее опубликованные работы в основном были сосредоточены на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, поскольку это наиболее стабильная и, предположительно, наиболее важная АФК с точки зрения физиологической активности (Hiscock et al. 2007; Zafra et al. 2010; Lan et al. 2017), хотя прямых подтверждений этого факта не было. Мы использовали ЭПР-спектроскопию для оценки продукции O<sub>2</sub><sup>•-</sup> на рыльце пестика во время развития цветка и опыления, что позволило сравнить полученную динамику с динамикой, описанной ранее для развивающихся цветков оливы, где для обнаружения АФК использовались красители (Zafra et al. 2010). Результаты частично согласуются с результатами, полученными на цветках оливы: молодые рыльца продуцируют гораздо больше АФК, чем зрелые; однако в оливках снижение градиента наблюдалось только для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, тогда как в табаке оно наблюдалось и для супероксидного радикала. Аналогичная закономерность общей продукции АФК ранее наблюдалась у некоторых исследованных растений, например, у магнолии, мака и гороха: количество АФК снижалось по мере созревания цветка (Zafra et al. 2016). Однако у других растений количество АФК, наоборот, увеличилось (Zafra et al. 2016), что подтверждено нами и будет рассмотрено в следующих разделах. Пока неясно, что именно определяет эти противоположные закономерности динамики АФК: важно ли систематическое положение растения, его

экологическая ниша или особенности строения цветка. Одним из возможных объяснений является видоспецифичность метаболитов, обладающих антиоксидантной активностью. Так, гипотеза о конкуренции между АФК и флавоноидами была проверена на декоративной капусте (*Brassica oleracea* var. *acephala*): уровень флавоноидов снижается по мере созревания рыльца, что приводит к накоплению АФК и обеспечивает совместимое опыление (Lan et al. 2017). Более того, снижение уровня АФК после обработки рыльца экзогенным флавоноидом (кемпферолом) резко снижало прикрепление и прорастание пыльцы (Lan et al. 2017). С другой стороны, мутант томата со сниженной продукцией флавонолов и сниженным антоцианином характеризовался повышенным уровнем АФК в пыльце и сниженным ее прорастанием *in vitro* и *in vivo* (Muhlemann et al. 2018). В этой работе также подчеркивается связь между репродукцией и стрессом: увеличение АФК в условиях температурного стресса также было более выраженным у мутанта.

Нарушение гомеостаза АФК является одним из важнейших механизмов подавления полового размножения растений, включая как репродуктивное развитие, так и оплодотворение, в условиях высокотемпературного стресса, солевого стресса и засухи (Djanaguiraman et al. 2018; Santiago and Sharkey 2019; Bhatla et al. 2021; Xie et al. 2022). Таким образом, сравнивая продукцию различных АФК на рыльце стрессоустойчивых и чувствительных сортов пшеницы, авторы пришли к выводу, что во втором случае продукция заметно повышалась в условиях комплексного стресса (Fábián et al. 2019). Эти результаты показывают, что, хотя локальное повышение уровня АФК на рыльце важно для репродуктивного успеха, чрезмерное повышение может указывать на стресс и подавлять размножение.

Были высказаны предположения о различных функциях АФК на рыльце: ослабление компонентов клеточной стенки для проникновения в пыльцевые трубки, защита от патогенов и связь между пыльцой и пестиком (Hiscock et al. 2007; Zafra et al. 2010; Lan et al. 2017). АФК, вероятно, необходимы для экспансии клеток во время морфогенеза рыльца, как это широко описано для других органов (Carol and Dolan 2006; Tsukagoshi 2016). Высокий уровень АФК может быть результатом синтетической активности и активного метаболизма в клетках рыльца и окружающих тканях (Zafra et al. 2010), поскольку созревание рыльца сопровождается изменением жесткости клеточной стенки и запуском продукции экссудата. Идея накопления АФК как защитного механизма от атаки патогенов на том же основании, что и в цветочных нектарах, была предложена Хискоком с соавторами (Hiscock et al. 2007). Это объяснение, по-видимому, в первую очередь подходит для раскрытия цветков с сахаристым питательным экссудатом, в то время как у табака накопление АФК предшествует появлению видимых капелек экссудата и раскрытию цветков. С другой стороны, экссудат рыльца табака содержит большое количество липидов, углеводов и других компонентов (Cresti et al. 1986), что делает

вполне правдоподобной гипотезу о том, что АФК являются маркерами синтетической активности. Относительно низкий уровень АФК на стадии фертильности, который мы наблюдали, был, однако, важен для опыления, как показали эксперименты с ингибиторами, поэтому мы также считаем взаимодействие пыльцы и рыльца важной функцией АФК. Увеличение продукции  $O_2^{\bullet -}$  после опыления может быть связано с деградацией верхних частей пестика, которые не нужны для образования плодов и семян. Одновременное снижение уровня  $H_2O_2$  указывает на то, что это производство супероксида не связано с взаимодействием пыльцы и рыльца.

Снижение уровня  $H_2O_2$  после опыления согласуется с существующей гипотезой о том, что прилипание пыльцевых зерен вызывает снижение концентрации АФК на рыльце пестика, вероятно, за счет продуцирования и выделения оксида азота (NO) пыльцой (Bredemeijer 1984; Smirnova et al. 2012; Lan et al. 2017). Кроме того, снижение уровня АФК на рыльце после прикрепления пыльцы важно для гидратации пыльцы (Kiyono et al. 2021). Недавнее исследование показало, что для гидратации пыльцы необходимо восприятие белков POLLEN COAT PROTEIN-B (PCP-B) рецепторным киназным комплексом ANJEA-FERONIA (ANJ-FER) (Chen et al. 2021). У арабидопсиса, когда пыльца попадает на рыльце, PCP-B ингибируют взаимодействие RALF (RAPID ALKALINIZATION FACTORS) и ANJ-FER, а последующее снижение выработки стигматических АФК обеспечивает гидратацию и поддерживает прорастание ыльцы (Chen et al. 2021). Следовательно, возможный сценарий заключается в том, что определенный уровень АФК на зрелом рыльце благоприятен для ранней стадии взаимодействия пыльцы и рыльца, а дальнейшее снижение уровня АФК после контакта с пыльцой может способствовать росту пыльцевых трубок в ткани рыльца (Zhang et al. 2020; Kiyono et al. 2021). На основании наших данных можно уточнить, что это снижение в основном связано с  $H_2O_2$ , тогда как уровень  $O_2^{\bullet -}$  может оставаться высоким и даже увеличиваться.

### **VI.3. Активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах табака и лилии**

В цепи превращений АФК есть два основных этапа, связанных с (этап 1) превращением  $O_2^{\bullet -}$  в пероксид водорода и с (этап 2) разложением  $H_2O_2$ . Мы определили активность основных ферментов, участвующих в обеих стадиях: СОД (этап 1), каталазы, аскорбатпероксидазы (АП) и гваяколпероксидазы (ГП) (этап 2). Мы использовали удобный и наглядный зимографический метод для оценки активности ферментов окислительно-восстановительного гомеостаза в белковых экстрактах из тканей рыльца. Для анализа изоферментов СОД мы использовали KCN в качестве ингибитора Cu/Zn-СОД и  $H_2O_2$  в качестве ингибитора как Cu/Zn-СОД, так и Fe-СОД.

Табак имел две активные изоформы СОД: Cu/Zn-СОД и Fe-СОД: одна серия полос активности исчезала после обработки геля цианистым калием (Рисунок 66а, б), а обе изоформы



были неактивны после обработки пероксидом, что показано в наших исследованиях (Breugina et al. 2022). Проанализировав большое количество гелей, мы пришли к выводу, что наиболее слабая активность характерна для первой стадии, на других стадиях активность может варьировать, но она всегда сильнее во время и после созревания.

У лилии также есть две изоформы СОД, причем более тяжелая из них более активна (Рисунок 66в). Обе изоформы не реагировали на обработку цианидом (Рисунок 66г), но исчезали при обработке пероксидом водорода (Рисунок 66д), из чего можно сделать вывод, что это два изофермента Fe-СОД. Преобладающая изоформа проявлялась на всех стадиях развития; минорный изофермент был активен в ювенильных и опыленных рыльцах. Суммарная активность СОД на этих стадиях была выше, чем в экстрактах из пред-зрелых и зрелых рылец

Неожиданный результат был получен для активности каталазы. Каталаза неактивна на рыльцах табака всех стадий развития (Рисунок 67б). У лилии его активность выявляется на стадии 1, резко возрастает при созревании и остается достаточно высокой после опыления (Рисунок 67а).

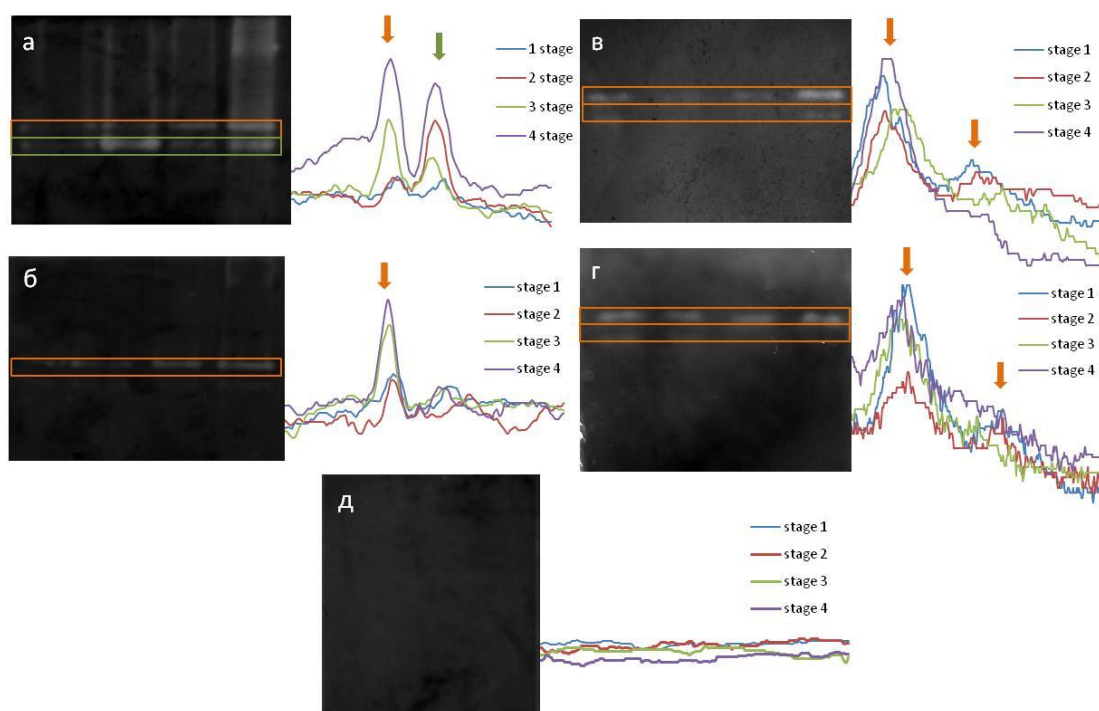


Рисунок 66. Зимографическое определение активности СОД в рыльцах *Nicotiana tabacum* (а, б) и *Lilium longiflorum* (в-д). Экстракты общего белка из свежих рылец загружали на соседние дорожки. Перед загрузкой определяли концентрацию белка во всех экстрактах, чтобы скорректировать дозу нанесения. Изоферментный анализ заключался в сравнении контрольных гелей (а, в) с воздействием цианида (б, г) и пероксида водорода (д) и показал, что табак имеет две изоформы: Fe-СОД и Cu/Zn-СОД, а в лилии активны две Fe-SOD.

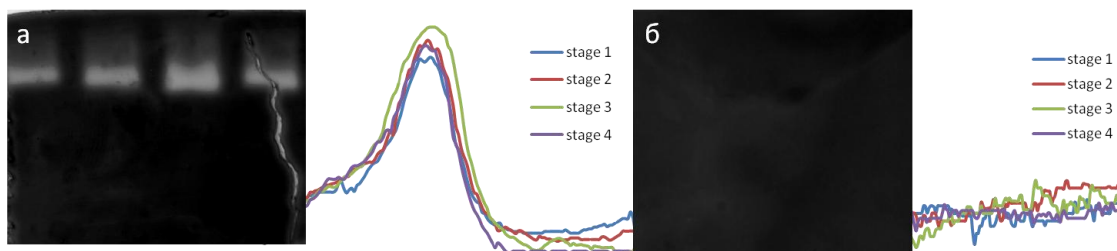


Рисунок 67. Зимографическое определение активности каталазы в рыльцах *Lilium longiflorum* (а) и *Nicotiana tabacum* (б). Каталаза неактивна в табаке, но активна на всех стадиях в лилии.

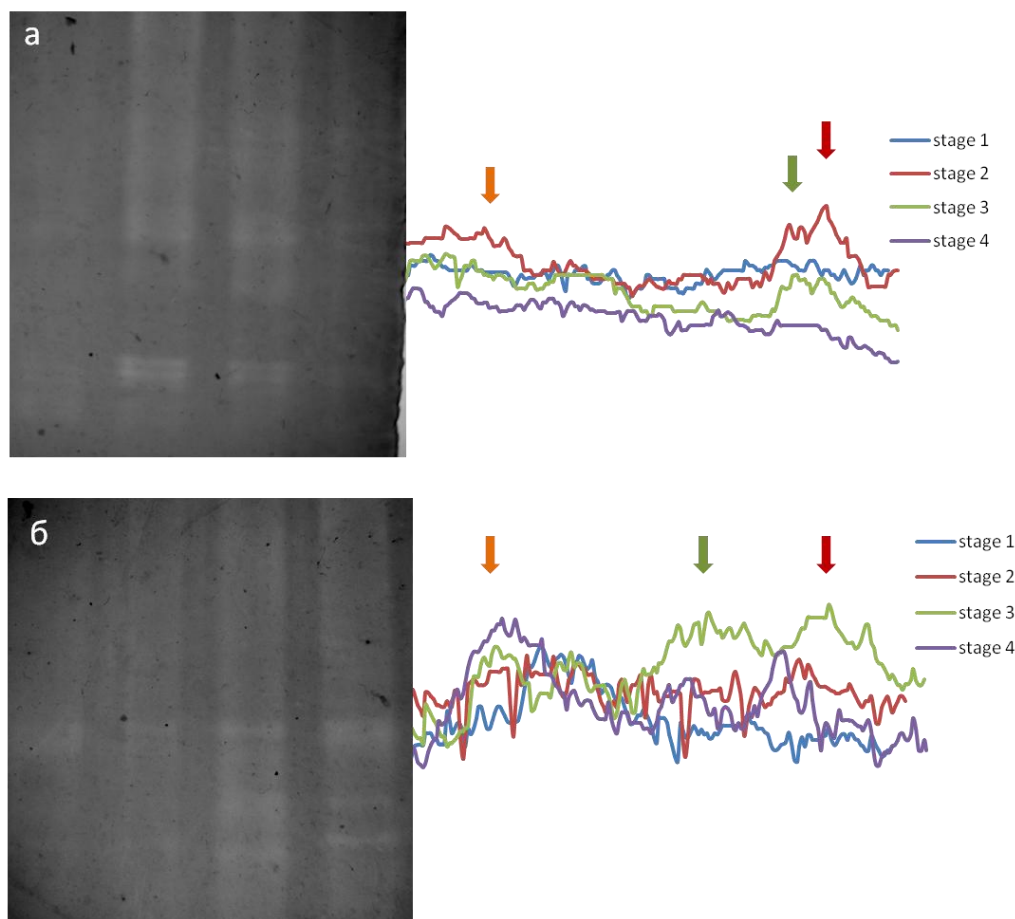


Рисунок 68. Зимографическое определение активности аскорбатпероксидазы в рыльцах *Nicotiana tabacum* (а) и *Lilium longiflorum* (б). Фермент активен у обоих видов и присутствует в нескольких изоформах.

Аскорбатпероксидаза активна как в табаке, так и в лилии. Поскольку полосы довольно слабые, несмотря на высокое количество белка (40 мкг на дорожку), можно заключить, что активность каждой из изоформ невысока. С другой стороны, их количество у обоих объектов довольно велико: у табака отчетливо различаются от 4 до 5 полос, которые наиболее активны на 2 и 3 стадиях, после опыления проявляются слабее и практически не обнаруживаются в ювенильных рыльцах (Рисунок 68а). Вероятно, большое количество изоферментов пероксидазы в табаке компенсирует недостаток активности каталазы. У лилии видны две отчетливые полосы

на стадиях 1 и 2 и три полосы на стадиях 3 и 4 (Рисунок 68б). Суммарная активность на стадиях 3 и 4 у лилии выше, чем у табака (Schekaleva et al., 2024).

Для гваяколовой пероксидазы зимографический подход оказался неэффективным: в обоих объектах не было обнаружено активности, кроме положительного контроля (данные не показаны). Поэтому мы проверили полученный результат спектрофотометрически (Таблица 9). Низкая активность выявлена только на 4-й стадии у табака, вероятно, из-за присутствия пыльцевых зерен или старения рыльца. Мы пришли к выводу, что этот фермент не вносит существенного вклада в баланс АФК на рыльце.

Таблица 9. Активность гваяколовой пероксидазы в экстрактах из рылец табака и лилии.

Активность ГП, моль/л			
стадия	рыльце табака	рыльце лилии	пероксидаза хрена (положительный контроль)
1	0,03±0,08	0,01±0,05	<b>26,2±0,12</b>
2	0,37±0,01	0,06±0,05	
3	0,16±0,01	0,05±0,02	
4	<b>0,96±0,07</b>	0,05±0,05	

Сдвиг редокс-баланса на рыльце АФК совпадает по времени с началом восприимчивости рыльца, регуляция уровня АФК обеспечивается повышением активности ферментов редокс-гомеостаза, включая появление новых изоферментов в процессе морфогенеза рыльца (McInnis et al. 2005; Sharma and Bhatla 2013). Например, у подсолнечника увеличение общей активности СОД было связано с тычиночной стадией развития цветка, за которой следовал пик активности пероксидазы на пестичной стадии (Sharma and Bhatla 2013). Тесты на активность пероксидазы стали стандартным методом измерения восприимчивости пестика (Dafni and Maués 1998). В опытах на декоративной капусте тепловая карта, созданная для 17 белков с оксидоредуктазной активностью на основе их относительного количества на разных стадиях развития, показала постепенную активацию синтеза этих белков в процессе развития рыльца (Lan et al. 2017). Полученные данные согласуются с тем, что мы наблюдали в экстрактах из рылец табака: активность СОД наименьшая на стадии ювенильного пестика, на стадиях 2 и 3, когда раскрывается цветок и вырабатывается экссудат, она максимальна, и в это время появляется дополнительный изофермент. Увеличение активности СОД и числа изоферментов логично связать с наблюдаемым снижением уровня супероксидного радикала в зрелом пестике (Рисунок 63).

Активность СОД после опыления сильно варьирует для Fe-содержащего изофермента (она может быть как ниже, так и выше, чем на пике рецептивности), а для Cu/Zn изофермента она стабильно ниже. Причину такой изменчивости еще предстоит выяснить.

Подведём итоги по двум видам. У лилии динамика суммарных АФК восходящая на всех стадиях развития рыльца. Сначала увеличивается генерация  $O_2^{\bullet-}$  и снижается уровень пероксида. За счет активности СОД уровень пероксида увеличивается после 2-й стадии и достигает максимума на 3-й стадии, но одновременно увеличиваются активности каталазы и аскорбатпероксидазы. После опыления генерация  $O_2^{\bullet-}$  и активность каталазы снижаются обратно до уровня 2-й стадии, концентрация пероксида, активности СОД и аскорбатпероксидазы выходят на плато. Общая окислительная способность, определяемая спиновым зондом САТ1Н, неожиданно увеличивается после опыления, что можно объяснить высоким уровнем NO, который детектируется на рыльце при прорастании пыльцы (Domingos et al. 2015). Такая динамика генерации и взаимопревращения  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  на рыльце хорошо согласуется с ролью АФК в регуляции роста пыльцевых трубок лилии на ранних стадиях, показанной ранее *in vitro* (3.1 Значение эндогенных и экзогенных АФК для роста пыльцевых трубок) (Podolyan et al. 2019). Пыльцевые трубки лилии более чувствительны к  $O_2^{\bullet-}$ , чем к пероксида водорода: супероксид ускоряет их рост и делает их тоньше, в то время как трубки, обработанные  $H_2O_2$ , аналогичны контрольным (Рисунок 14) (Podolyan et al. 2021). Высокая значимость  $O_2^{\bullet-}$  для пыльцевых трубок лилии совпадает с пиком образования супероксида на стадии фертильности у этого вида и с наибольшей активностью каталазы на стадии зрелости. Активность СОД у этого вида минимальна на стадиях активного взаимодействия рыльца и пыльцы. Все эти данные в совокупности указывают на то, что уровень  $H_2O_2$  на пестике лилии строго лимитирован.

Баланс АФК на рыльце табака иной. Активность СОД и аскорбатпероксидазы повышается заблаговременно, до наступления фертильности, и, по-видимому, за счет этих ферментов перед опылением снижается уровень  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$ . Исследования прорастания пыльцы табака *in vitro* показали ее высокую чувствительность к пероксида водорода. В протопластах из пыльцевых трубок табака положительная реакция была уже на 10  $\mu M$  пероксида (Рисунок 42), тогда как для лилии эффективная концентрация составляла 100  $\mu M$  (Рисунок 39).

Действие на пыльцевые трубки табака было одинаковым для пероксида и рыльцевого экссудата, а обработка экссудата каталазой лишала его способности воздействовать на пыльцевые трубки (Рисунок 60). У петунии активность СОД также возрастала во время созревания рыльца (Leung et al. 2006).

Концентрация пероксида в экссудате рыльца табака значительно выше, чем у лилии, даже на стадии 3, хотя у табака она снижается, а у лилии повышается по сравнению с более ранними стадиями (Рисунок 65). Это согласуется с тем фактом, что каталаза неактивна на рыльце табака (Рисунок 67). Можно предположить, что у табака часть функций, связанных с

удалением пероксида, взяла на себя аскорбатпероксидаза: мы видим 3 и более изоферментов, активных на стадиях, где наблюдается снижение уровня  $H_2O_2$  (Рисунок 68). Большое количество изоформ аскорбатпероксидазы хорошо согласуется с разнообразной локализацией этой группы ферментов в растениях: они распределены, по крайней мере, в четырех клеточных компартментах: хлоропластах, микротельцах, цитозоле и митохондриях (Shigeoka et al. 2002).

Увеличение количества аскорбатпероксидазы во время опыления ранее было показано для сои (*Glycine max*), но в данном случае рассматривался пестик целиком: в протеомном исследовании было обнаружено, что уровень белков аскорбатпероксидазы (но не их активность) увеличивается при опылении, тогда как глутаредоксина и пероксиредоксина, которые также могут удалять  $H_2O_2$ , становится меньше (Li et al. 2012). У гибискуса активность АФК-регулирующего фермента определяли спектрофотометрически, и во всех случаях она была максимальной на стадии фертильности. Уровень  $H_2O_2$  повышался заранее, в ювенильных рыльцах. Затем он оставался на постоянном уровне, а после опыления уменьшался (Çetinbaş-Genç et al. 2019). У оливы концентрация  $H_2O_2$  была значительно выше в ткани пестика до опыления, после оплодотворения она снижалась. Активность каталазы, СОД и аскорбатпероксидазы была ниже до опыления и повышалась после оплодотворения (Aslmoshtaghi and Shahsavari 2016). Рыльце оливы в целом также характеризуется снижением концентрации пероксида (Zafra et al. 2010). У подсолнечника во время цветения за увеличением общей активности СОД следует пик активности пероксидаз (Bhatla et al. 2021).

Наибольший суммарный уровень АФК обнаружен у табака и лилии после опыления, что, по-видимому, соответствует массовому выделению NO (Jimenez-Quesada et al. 2017) и, возможно, других АФК пыльцевыми зёрнами или стареющими рыльцами. Например, в этом исследовании мы не проверяли наличие гидроксильного радикала, поскольку ранее выяснили, что он ингибирует рост пыльцевых трубок (Рисунок 14); однако после оплодотворения он может образовываться на рыльце, например, из  $H_2O_2$  в результате реакции с переходными металлами.

#### **VI.4 Значение СОД для прорастания пыльцы табака *in vivo***

Конечной целью опыления и прорастания пыльцы является успешное оплодотворение. На его эффективность могут влиять как процент прорастания пыльцы на рыльце пестика, так и скорость роста трубки. Чтобы выявить значение активных форм кислорода, обнаруженных на рыльце, мы смещали баланс АФК с помощью ингибиторов. В качестве стандартного объекта использовали растения табака, поскольку они имеют достаточно крупный пестик и растут в полностью контролируемых условиях. Как мы показали, СОД, выделенная из рылец табака, чувствительна к пероксида водорода и цианиду калия, но применить эти ингибиторы *in vivo* мы

не могли, так как пероксид сам по себе является компонентом окислительно-восстановительной системы, а цианид токсичен для живых тканей. Поэтому для экспериментов *in vivo* мы использовали специфический Cu/Zn-ингибитор СОД LCS1. Нам удалось проверить эффективность ингибитора непосредственно на рыльце: содержание  $O_2^{\cdot-}$  в экссудате на рыльце, обработанной LCS1, увеличилось на 38% (Рисунок 69а,б). При этом следует отметить, что в рыльце табака активна не только Cu/Zn-СОД, но и Fe-СОД, то есть нам удалось заблокировать активность лишь одного из изоферментов. Несмотря на это, эффект был достоверный (Breugina et al. 2022).

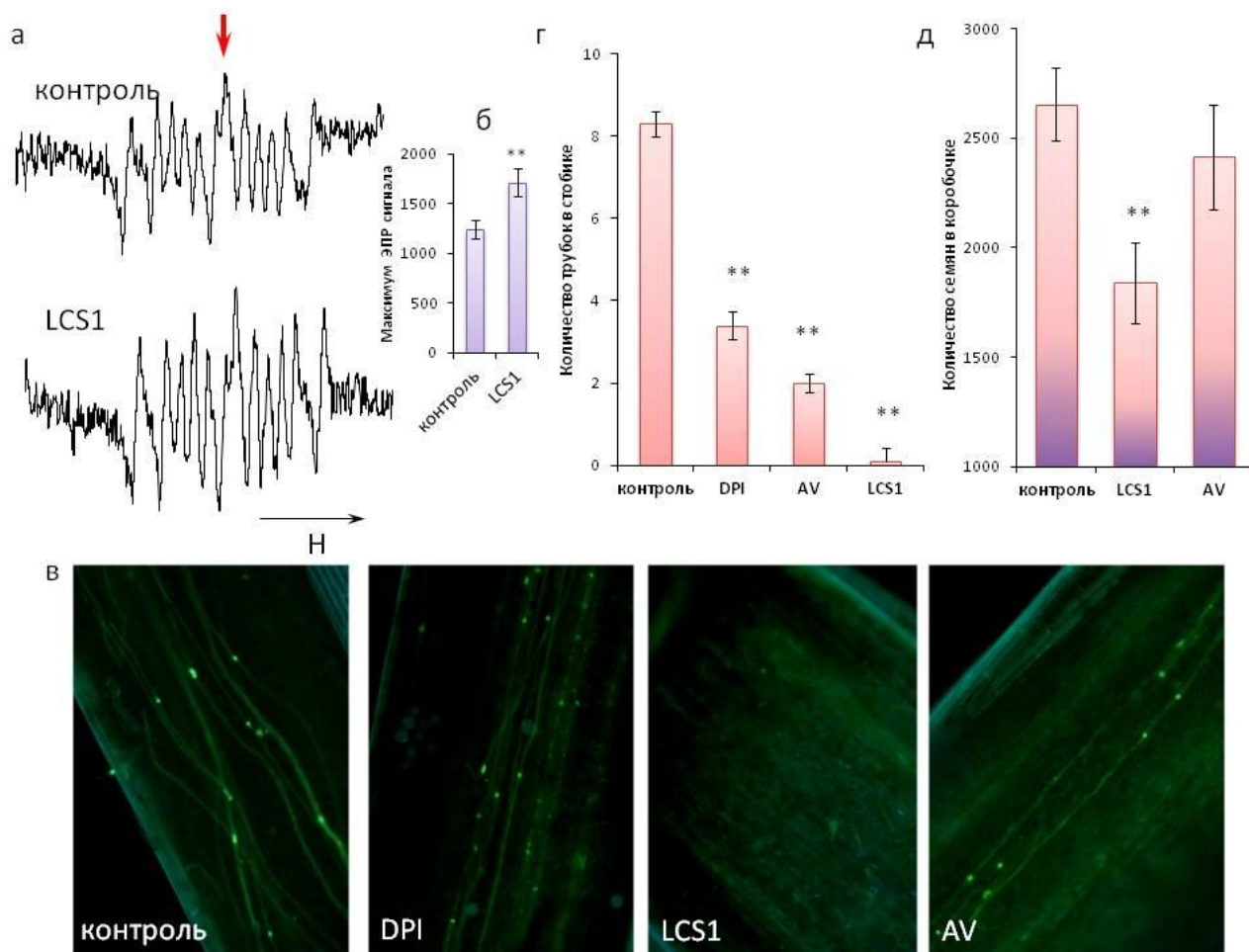


Рисунок 69. Значение баланса АФК для скорости и эффективности прорастания пыльцы *in vivo*. а – типичные сигналы ЭПР экссудата рыльца контрольного цветка и цветка, обработанного LCS1; б – усредненные значения сигналов ЭПР (второй пик, указан стрелкой на а), n=6; в – типичные флуоресцентные картины стилей через 30 мин после опыления, стенка пыльцевой трубки окрашена обесцвеченным анилиновым синим, увеличение 100X, ДФИ (хлорид дифенилениодония) и АВ (ацетованиллон) – ингибиторы НАДФН-оксидазы, LCS1 – ингибитор Cu/Zn СОД; г – среднее количество пыльцевых трубок в пестиковом столбике за 30 мин после опыления; д – завязывание семян (среднее количество семян в коробочке) через 4 недели после опыления.

Предварительно инкубируя рыльца с этим ингибитором, а также с двумя ингибиторами НАДФН-оксидазы (вероятно, одного из ключевых продуцентов АФК на рыльце), мы оценили изменение скорости прорастания пыльцы на рыльце и эффективности оплодотворения.

Ингибиторы НАДФ-оксидазы влияли на скорость прорастания: ДФИ и ацетованиллон снижали количество трубок в столбике на 59 и 76% соответственно (Рисунок 69в,г). Однако при тестировании наиболее эффективного в этом отношении ингибитора ацетованиллона с точки зрения успешности оплодотворения не было обнаружено значительного снижения (Рисунок 69е). По-видимому, количества трубок, которые в итоге доросли до завязи, было достаточно, чтобы оплодотворить достаточное количество семязачатков. Таким образом, снижение образования  $O_2^{\cdot -}$  влияет на динамику прорастания, но не на эффективность оплодотворения (Breygina et al. 2022).

С другой стороны, смещение баланса АФК в сторону супероксидного радикала (путем блокирования одного из изоферментов СОД) значительно снижало скорость прорастания: спустя полчаса после опыления пыльцевые трубки в столбике отсутствовали (Рисунок 69в,г). Ингибирование СОД также сказывалось на эффективности оплодотворения: количество семян в коробочке было на 31% меньше, чем в контроле (Рисунок 69д), т. е. этот показатель изменялся пропорционально действию LCS1 на продукцию  $O_2^{\cdot -}$  (Рисунок 69а,б). В ходе эксперимента мы заметили, что коробочки, сформированные из цветков, обработанных ингибитором, созревали медленнее, чем сформированные из контрольных и обработанных ацетованиллоном цветков: нам пришлось ждать еще неделю, пока они полностью не высохли.

Таким образом, мы впервые получили результаты, отвечающие на вопрос о значении АФК на рецептивных влажных рыльцах для эффективного опыления *in vivo*. Можно заключить, что у табака превращение супероксида в пероксид – стадия окислительно-восстановительного метаболизма, контролируемая СОД – является одним из ключевых условий прорастания пыльцы *in vivo*. Однако верно ли это для других растений? Сравнивая баланс АФК на рыльце у табака и, лилии, мы пришли к выводу, что он имеет серьезные различия, которые, по-видимому, связаны с систематическим положением объектов. Однако это предположение требовало проверки. Среди растений с влажным рыльцем мы выбрали представителей отдаленных таксонов, включая представителя базальных цветковых растений; кирказон, ранне дивергентный барбарис, более дивергентный древовидный пион. Для сравнения теми же методами изучали стандартные объекты – табак и лилию.

## **VI.5 Динамика продукции АФК на рыльцах цветковых растений из разных филогенетических групп**

Цветковые растения, выбранные нами для исследования, должны были соответствовать определенным критериям: (а) иметь влажное рыльце, (б) цвести в Москве в открытом грунте или в климатической камере. Из растений, отвечающих этим требованиям, мы на основании классификации Angiosperm Phylogeny Group APG IV (Chase et al. 2016; Byng et al. 2018) выбрали те, которые наиболее удалены друг от друга на филогенетическом дереве (Рисунок 70).

Таким образом, мы остановили свой выбор на следующих родах: *Aristolochia* (кирказон), *Lilium* (лилия), *Berberis* (барбарис), *Paeonia* (пион) и для сравнения взяли свой традиционный объект - *Nicotiana* (табак). Лилия и табак являются стандартными модельными объектами с контролируруемыми сроками цветения, остальные объекты зацвели в июне 2022 г., и в этот период проводились эксперименты (Breygina et al. 2023a).

Зрелость рыльца оценивали по внешнему виду цветка и делили на 3 стадии. Закрытые цветки, достигшие окончательного размера или не менее 4/5 его, классифицировали как ювенильные (J). Цветки, которые только что раскрылись, но имели незрелые пыльники, классифицировались как пре-зрелые/пред-зрелые (PM). Цветки с полностью открытым околоцветником и открытыми пыльниками считались зрелыми (M) (Рисунок 70).

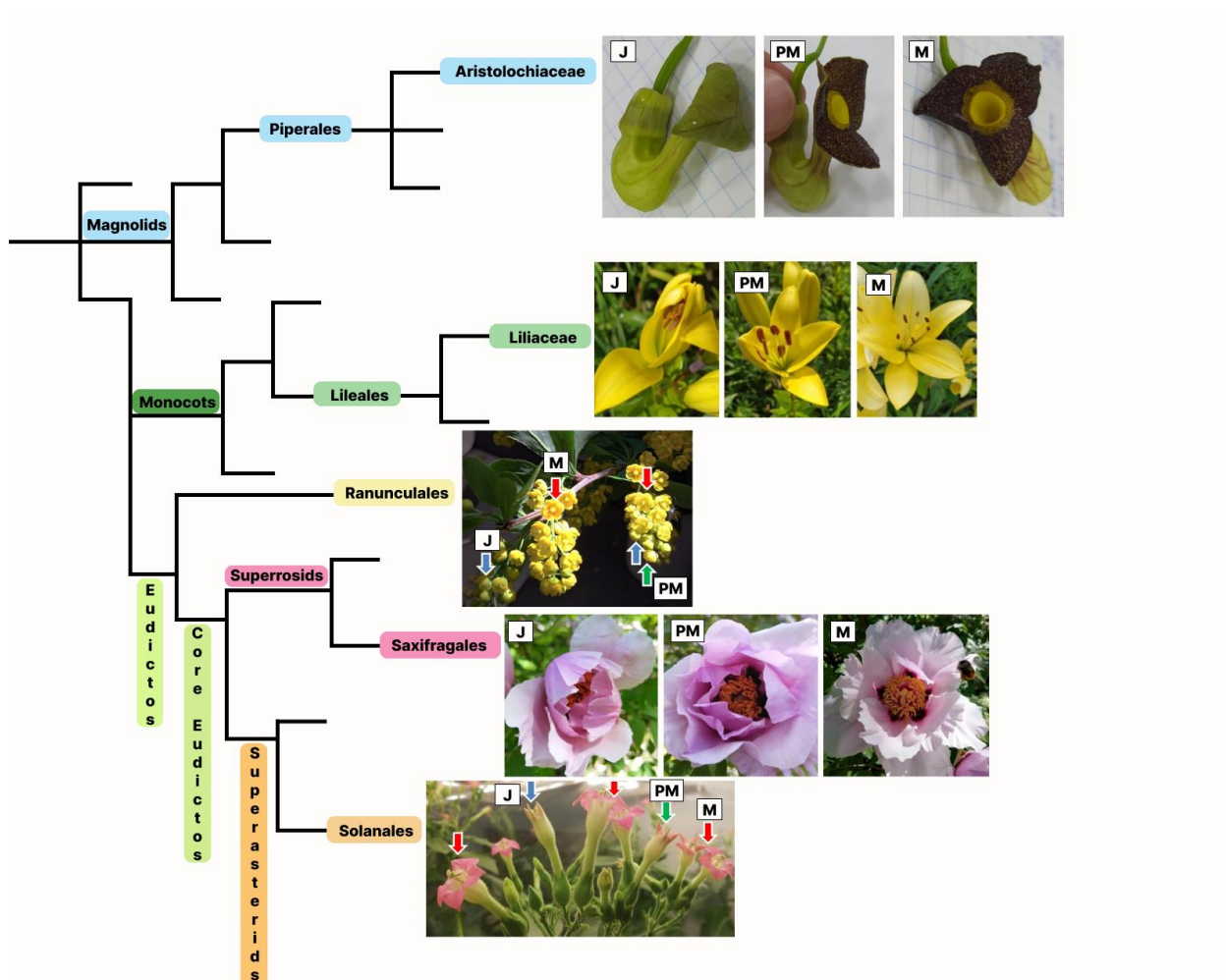


Рисунок 70. Систематическое положение изучаемых видов в соответствии с филогенией растений (APG IV). Для каждого из объектов показаны цветки, использованные в эксперименте (характерные изображения). Различные стадии развития цветка, взятые для анализа, показаны для крупных цветков на отдельных изображениях (кирказон, лилия, пион), для мелких – стрелками (барбарис, табак): синими стрелками – ювенильная стадия, зелеными – пред-зрелая стадия, красный – фертильные.

Для качественной оценки сроков активации окислительно-восстановительного метаболизма пестики разных стадий зрелости окрашивали раствором бензидина. Как и



ожидалось, все рыльца (кроме барбариса) были полностью окрашены на стадии фертильности (Рисунок 71б, д, з). Однако различия заключались в наличии или отсутствии окрашивания у незрелых рылец. Так, до наступления фертильности окрашивание у кирказона отсутствовало (Рисунок 71а), тогда как у лилии пре-зрелые рыльца окрашивались так же интенсивно, как фертильные (Рисунок 71г), то же самое было и у табака (Рисунок 71ж). В то же время ювенильные рыльца лилии не окрашивались (Рисунок 71в), а у табака появлялась некоторая окраска (Рисунок 71е). У барбариса интенсивное окрашивание не было видно ни на одной стадии, однако на фертильной стадии было видно слабое окрашивание по краям рыльца (Рисунок 71и).

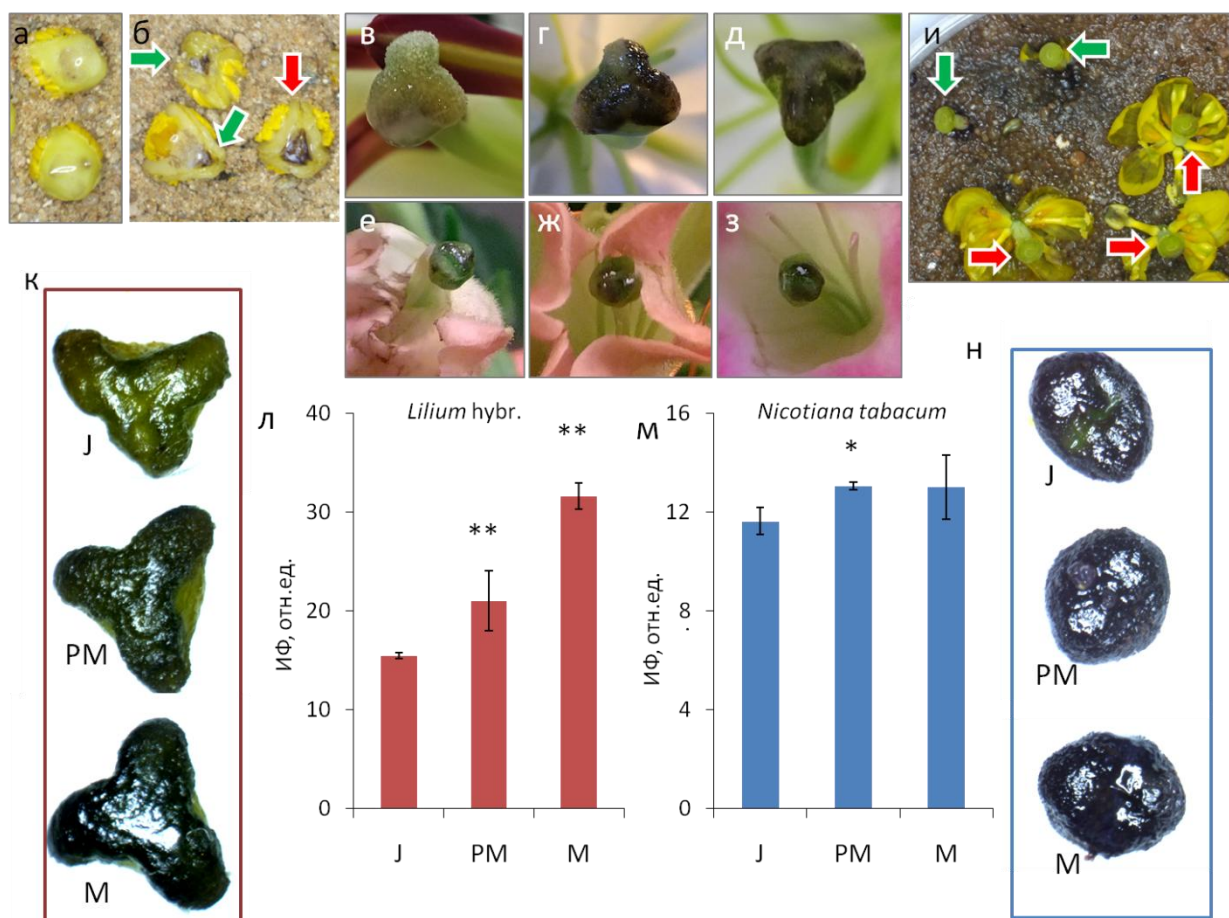


Рисунок 71. Динамика окрашивания рыльца бензидином (а-и), NBT (к, н) и DCF (л, м), отражающая продукцию АФК в разных цветках. Для крупных цветков (кирказон, лилия, пион) показаны разные стадии развития цветка, взятые для анализа, на отдельных изображениях (кирказон, лилия, пион): J – ювенильная стадия, PM – пре-зрелость, M – зрелость; для мелких указаны стрелками (барбарис, табак): синие стрелки – ювенильная стадия, зеленые – пре-зрелость, красные – зрелость. а-и – окраска рылец бензидином (30 мин): а, б – *Aristolochia manshuriensis*, в-д – *Lilium hybr.*, е-з – *Nicotiana tabacum*, и – *Berberis vulgaris*; а, в, е – ювенильные рыльца, б, г, ж, и (зеленые стрелки в б и и) – пре-зрелые рыльца, б, д, з, и (красные стрелки – зрелые рыльца; к, м – окрашивание рылец лилии (к) и табака (м) нитросиним тетразолием (10 мин, 10  $\mu$ M); л, м – интенсивность флуоресценции рылец лилии (л) и табака (м), окрашенных DCF (30 мин, 5  $\mu$ M); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни. Для каждого из объектов показаны цветки, использованные в эксперименте (характерные изображения).

Окисление бензидина и его производных часто используется для окрашивания рыльца, но интерпретации различаются: некоторые авторы используют его для определения фертильности (Dafni 1992; Souza et al. 2016), которая, как полагают, коррелирует с активностью пероксидазы (Galen and Plowright 1987; Shivanna 2020). Другие используют аналогичное окрашивание для локализации АФК и, в частности, пероксида водорода (Ros Barceló 1998; McInnis et al. 2006). Понятно, что в цветной реакции участвуют как пероксидаза, так и пероксид водорода. Однако, интерпретируя результаты окрашивания бензидином в сочетании с данными ЭПР и спектрофотометрии, мы успешно использовали его для оценки общего уровня окислительно-восстановительного метаболизма.

Помимо окрашивания бензидином, на двух объектах – табаке и лилии – дополнительно проводилось динамическое окрашивание флуоресцентным красителем DCFH и NBT. Первый краситель в основном используется как неспецифический (Lai et al. 2022), однако, по косвенным данным, на рыльцах в большей степени выявляет пероксид водорода (McInnis et al. 2006), а второй используется для визуализации супероксидного радикала в тканях цветка (Cui et al. 2022). Оба окрашивания в целом повторяли динамику бензидина, показывая значительное повышение уровня АФК в лилии и небольшое увеличение в табаке. Таким образом, генерация АФК повышается во время развития во всех случаях; причем у дивергентных покрытосеменных это происходит раньше, на предзрелой или даже ювенильной стадии (табак и лилия), а у базальных покрытосеменных – сравнительно поздно, непосредственно при переходе к стадии фертильности.

Для полуколичественной оценки продукции АФК мы использовали непроницаемый для клеток гидроксиламиновый спиновый зонд SAT1H. Средняя интенсивность сигнала ЭПР у исследованных видов (Рисунок 72а) характеризовалась разной динамикой: 1) небольшое снижение на начальном этапе созревания (достоверное, A.m., незначимое, P.s.) с последующим резким возрастанием к стадия полной фертильности (кирказон, A.m., n=5 пион, P.s., n=5); 2) постепенное увеличение по стадиям (лилия, L.l., n=7); 3) практически полное отсутствие сигнала на первой и второй стадиях при умеренной продукции радикалов в зрелых рыльцах (барбарис, B.v., n=7); (4) постепенное увеличение на начальном этапе и стабильная продукция от пре-зрелости до зрелости (табак, N.t., n=6). Характерные спектры ЭПР для некоторых видов представлены на Рисунок 73. Очень резкое увеличение окислительной способности на стадии фертильности характерно для кирказона и лилии: во втором случае сигнал ЭПР возрастает в 3,6 раза, а в первом случае – в 4,5 раза. Для сравнения, у исследованных эудикотов максимальный прирост отмечен у пиона (в 2 раза); для табака и барбариса отношение сигнала М к J равно 1,5 (Breygina et al. 2023a).

Данные ЭПР согласуются с окрашиванием пестиков с некоторым уточнением. Во-первых, уровень АФК по данным ЭПР значительно возрастает при переходе от ювенильных к зрелым рыльцам. Подобная динамика ранее была описана для оливы, но в данном случае уровень супероксида оценивали путем окрашивания пестика дигидроэтидием (Zafra et al. 2010). По-видимому, высокая интенсивность продукции АФК на стадии фертильности является универсальной закономерностью, но наиболее резкое увеличение образования супероксида обнаружено у базальных покрытосеменных (кирказон) и однодольных (лилия). Изученные двудольные показывают более плавный рост. Выявлены также существенные различия в динамике АФК на стадиях развития, предшествующих зрелости. Так, стадия пре-зрелости может быть либо ниже ювенильной (кирказон, пион), выше ее (табак, лилия, олива), либо отсутствовать на обеих стадиях (барбарис). Можно предположить, что увеличение продукции АФК клетками рыльца по мере подготовки к фертильности является относительно прогрессивным признаком, характерным для дивергентных покрытосеменных; резкое повышение окислительной способности непосредственно перед наступлением фертильности, напротив, можно считать более примитивным признаком. На первый взгляд, эти данные не совсем согласуются с результатами, полученными на другой группе видов растений с помощью неспецифического окрашивания пестиков (Zafra et al. 2016). Хотя большинство видов имели тенденцию к увеличению продукции АФК по мере созревания пестика, были также виды, у которых продукция АФК в зрелых пестиках была ниже, чем на более ранних стадиях (Zafra et al. 2016).

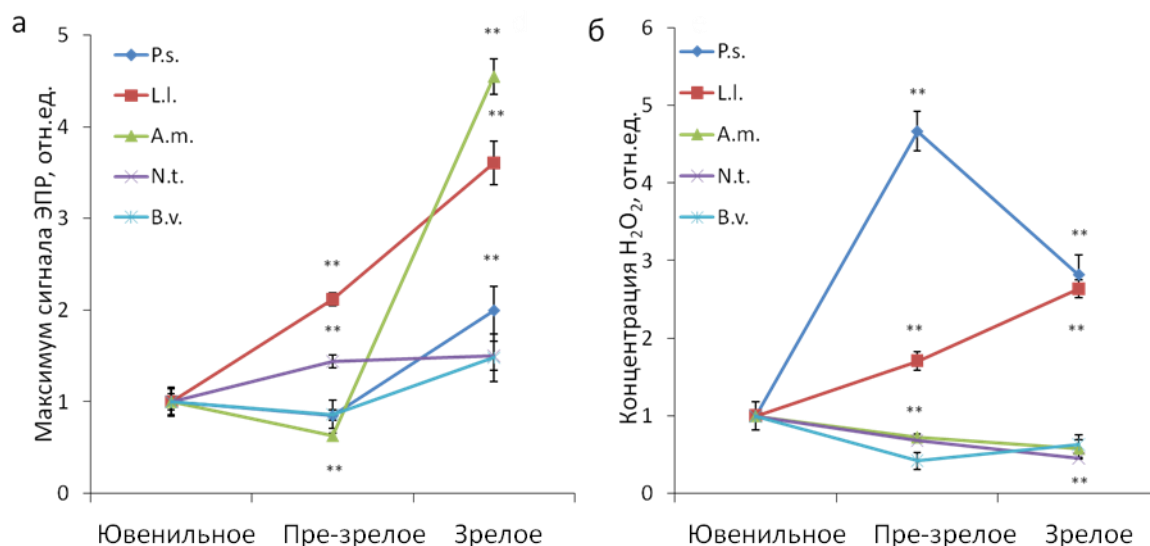


Рисунок 72. Динамика уровней суммарных АФК и  $H_2O_2$  в экссудате рыльца разных видов. а – продукция АФК (средний максимум спектра ЭПР САТ1Н); б – динамика концентрации  $H_2O_2$  в экссудате. Чтобы показать динамику общей продукции АФК и концентрации  $H_2O_2$  для всех цветков на одном графике, мы нормализовали значения от пред-зрелой и зрелой стадий к ювенильной стадии. Абсолютные значения для  $H_2O_2$  приведены в Таблица 10.

Любопытно, что эта тенденция была слабо выражена у ранне-дивергентного покрытосеменного мака и более выражена у базального покрытосеменного магнолии. Другие – более дивергентные – цветковые растения характеризовались тенденцией, аналогичной той, о которой мы здесь писали (Рисунок 72). Возможная причина, по которой мы не увидели столь противоречивых тенденций в нашей выборке, заключается в фокусировке на растениях с влажными рыльцами. Таким образом, наши данные, полученные на другой выборке видов растений с использованием альтернативного набора методических подходов, дополняют результаты коллег и уточняют процессы, происходящие на влажном рыльце.

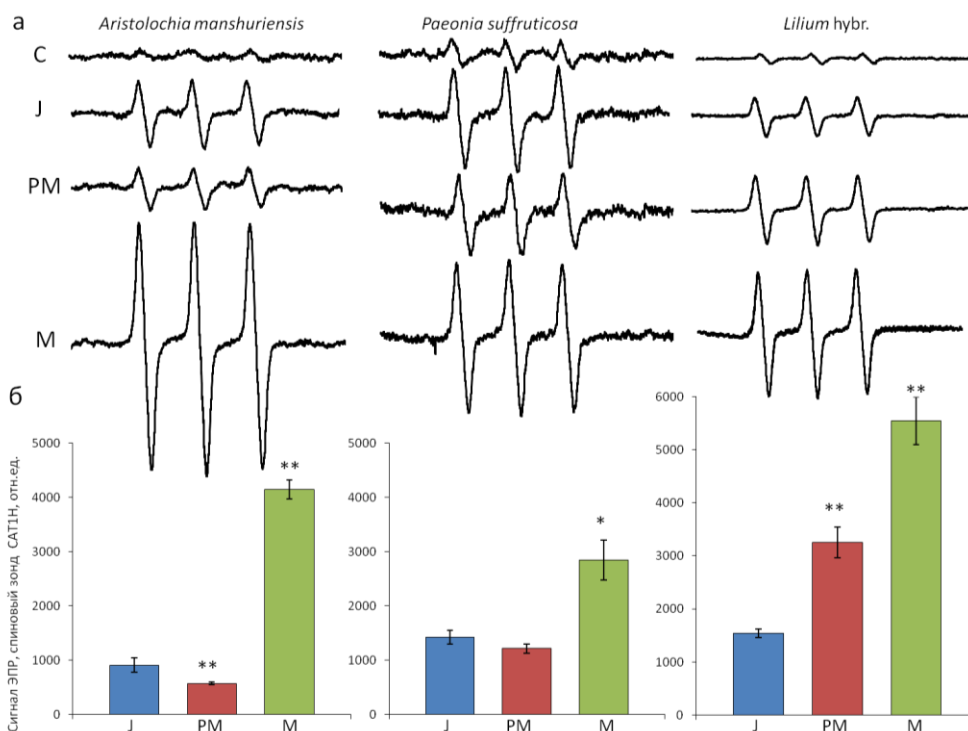


Рисунок 73. Характерные спектры ЭПР, отражающие накопление суммарных АФК в экссудатах рыльца цветков (а) и интенсивность центральной линии в спектрах ЭПР (б); С – контроль (спиновый зонд без экссудата); J, PM, M – спиновый зонд после 30-минутной инкубации на ювенильных, пред-зрелых и зрелых рыльцах, соответственно; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни.

Суммируя наши результаты, полученные двумя разными методами, можно заключить, что на влажных рыльцах суммарная продукция АФК всегда увеличивается в процессе созревания, но у базальных растений повышение происходит более резко и начинается относительно поздно, тогда как более дивергентные растения заранее готовятся к фертильности, продуцируя АФК.

У тех же видов измеряли концентрацию пероксида водорода в экссудатах рыльца. Поскольку размеры рылец, как и объем жидкости для смыва экссудатов, были разными для каждого вида растений (хотя мы сохраняли примерное отношение объема смыва к площади поверхности рыльца), на Рисунок 72б представлены полученные данные как отношение каждой

точки к исходной (ювенильные рыльца); абсолютные значения концентрации  $H_2O_2$  представлены в Таблица 10 (Breygina et al. 2023a).

Таблица 10 Концентрации  $H_2O_2$  в рыльцевых экссудатах (в смыве с рылец),  $\mu M$ .

рыльце	P.s., n=6	L.h., n=6	A.m., n=5	N.t., n=8	B.v., n=5
ювенильное	262±0.2	26.2±1.2	41.0±7.4	348.9±10.6	97.7±2.9
пре-зрелое	122.3±6.7	44.8±3.2	29.8±1.7	239.5±4.0	41.1±10.5
зрелое	73.9±6.6	69.3±3.1	23.6±4.8	158.9±5.1	61.6±12.3

Для растений из разных филогенетических групп характерны разные закономерности динамики  $H_2O_2$ . Так, у базальных растений значимых изменений не произошло (Рисунок 72б, A.m.); продукция была очень низкой на всех стадиях (Таблица 10). У лилии по мере созревания рыльца наблюдалось отчетливое увеличение  $H_2O_2$  с максимумом на стадии полной фертильности (Рисунок 72б, L.l.). У пиона максимальная концентрация наблюдалась на фертильной стадии, наименьшая – на предфертильных рыльцах (Рисунок 72б, P.s.). Табак характеризовался небольшим, но значительным снижением продукции по мере созревания рыльца (Рисунок 72б, N.t.); динамика кажется очень похожей на таковую у кирказона. Однако в абсолютных значениях продукция  $H_2O_2$  в табаке была высокой, особенно на ювенильной стадии (Таблица 10). Хотя пестик барбариса практически не окрашивался бензидином, концентрация  $H_2O_2$  на нем была достаточной для анализа (Таблица 10). Разброс значений был очень большим, что, по-видимому, связано с малым размером пестика; однако тенденция аналогична таковой у табака: концентрация пероксида водорода максимальна в ювенильных цветках (Рисунок 72б, B.v.).

Суммируя данные по пероксиду водорода, важно отметить, что в кирказоне его уровень стабильно низкий, на пределе чувствительности метода, что могло бы свидетельствовать об отсутствии активности СОД у этого базального покрытосеменного растения либо о высокой активности каталазы, разлагающей пероксид. У единственного представителя однодольных – лилии – уровень  $H_2O_2$  растет, а пион имеет сложную динамику с максимумом на созревающих рыльцах. Снижение уровня пероксида водорода наблюдалось у двух из трех исследованных двудольных растений: табака и барбариса. Для оливы в целом также было характерно снижение концентрации  $H_2O_2$  на рыльце (Zafra et al. 2010; Aslmoshtaghi and Shahsavari 2016).

На данном этапе невозможно проследить однозначную связь филогении с динамикой  $H_2O_2$ . Мы предположили, что общий уровень пероксида водорода может быть более показательным (Таблица 10). Поскольку размер рыльца у видов значительно различается, мы не можем провести количественное сравнение уровней  $H_2O_2$  на рыльце на основе измерений его концентрации в смыве с рыльца, но некоторые наблюдения все же возможны. Так, например,

ювенильные пестики табака и пиона давали концентрацию  $H_2O_2$  на порядок больше, чем у лилии и кирказона. Косвенно это подтверждается экспериментами по окрашиванию: для окрашивания NBT рыльца табака нам пришлось снизить концентрацию в 4 раза по сравнению с лилией, а для флуоресцентной визуализации DCF мы значительно уменьшили экспозицию. С некоторым приближением можно предположить, что у более дивергентных растений уровень пероксида водорода в целом выше, чем у базальных. Можно предположить, что восприятие пероксида как сигнальной молекулы является более продвинутым свойством, так как помимо ее прямого действия на ионные каналы (Breugina et al. 2016), может быть и параллельная сигнализация с участием сигнальных каскадов: внеклеточные сенсоры уже описаны в соматических тканях в связи с умеренным стрессом (Mishra et al. 2022). Мы продолжим обсуждать эволюционное значение соотношения супероксида и пероксида в следующем разделе, посвященном опылительным каплям голосеменных растений.

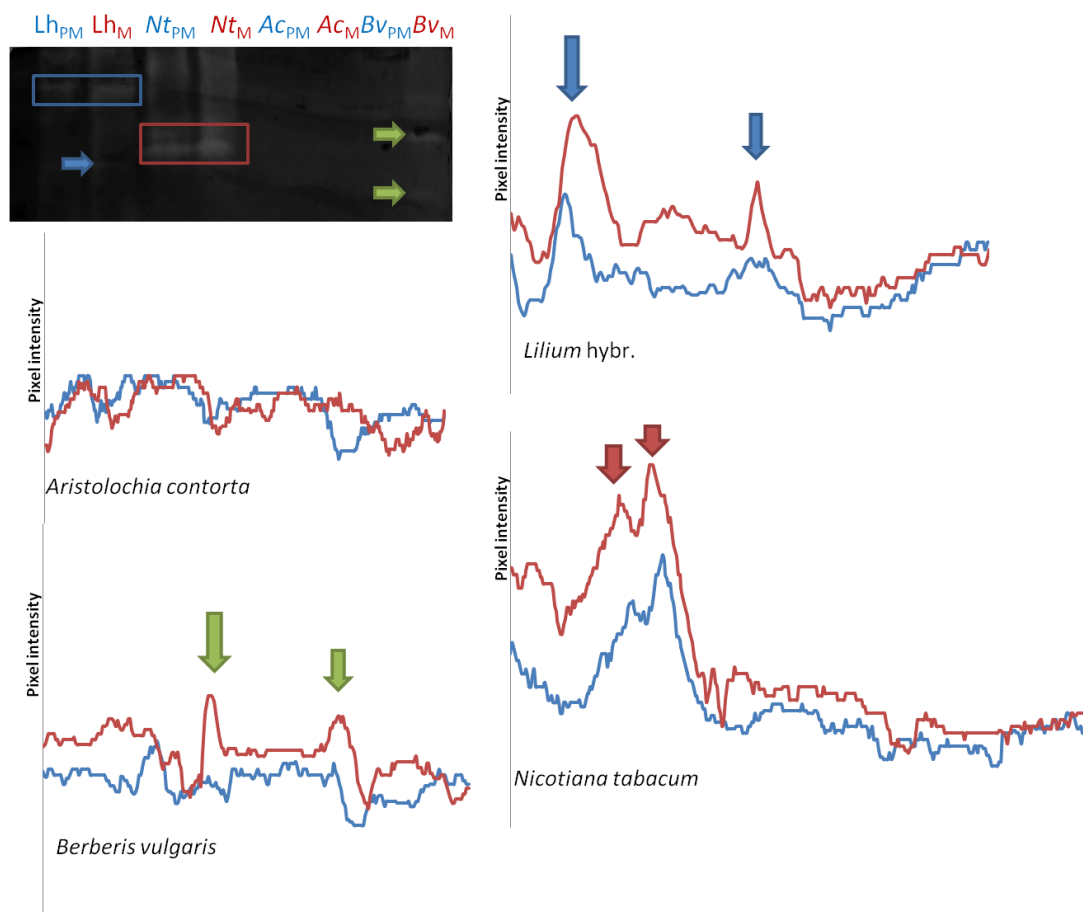


Рисунок 74. Активность СОД в рыльцах разных видов; типичный гель со всеми экстрактами рыльца и профилями оптической плотности для каждой пары дорожек; суммарные белковые экстракты из свежих рылец загружали в соседние дорожки по 30  $\mu$ г на каждую, на каждой дорожке отмечены виды и стадии развития (ПМ, синим – пре-зрелые, М, красным – зрелые). Изоферменты для удобства идентификации отмечены цветными стрелками: синей для лилии, красной для табака и зеленой для барбариса.

На основании наших данных по табаку и лилии (Рисунок 66, Рисунок 69) мы предположили, что активность СОД важна для поддержания оптимального баланса между АФК на каждой стадии развития цветка. Мы использовали зимографический метод для оценки активности СОД у всех исследованных рылец, кроме пиона. Экстракт рыльца пиона использовать не удалось из-за содержания дополнительных веществ, взаимодействующих с компонентами реакционной смеси. У нас было слишком мало материала, полученного в период цветения, для очистки белкового экстракта. Для выделения белка из рылец кирказона использовали близкородственный вид, *A. contorta*, так как в этот момент цветение *A. manshuriensis* уже закончилось.

Молекулярная масса изоферментов различалась от вида к виду, однако у трех из четырех исследованных видов наблюдалось увеличение активности СОД по мере созревания рыльца (Рисунок 74). Кирказон отличался от других видов отсутствием активности СОД на обеих изученных стадиях. Остальные растения имели две изоформы: у барбариса активность обоих изоферментов выявлялась только на стадии полной зрелости; у лилии на третьей стадии можно было увидеть два активных изофермента, основной и минорный; на втором этапе активность одного изофермента была заметно слабее, а другого явно не было видно; у табака оба изофермента повышали активность при переходе к зрелости.

Учитывая полученные данные об активности СОД, можно проследить несколько тенденций. Во-первых, самым базальным из растений в этом исследовании был кирказон, и он не проявлял активности СОД в экстрактах рыльца. Поскольку гены СОД обнаружены у организмов, появившихся на Земле около 4,1–3,5 млрд лет назад (Inupakutika et al. 2016) а изоформы этого фермента, по данным биоинформатики, многочисленны у высших растений (Zhang et al. 2021), у кирказона, конечно, тоже есть этот фермент, но он, по-видимому, не активен в тканях рыльца, что можно спекулятивно отнести к примитивным свойствам. На основании этого результата вместе с данными ЭПР и колориметрическим определением пероксида можно сделать вывод о том, что основной вклад в сигнал ЭПР у этого вида вносит супероксид радикал. У более дивергентных растений активность СОД присутствует, по крайней мере, на стадии фертильности (барбарис). У наиболее дивергентных представителей однодольных и эудикот, лилии и табака, активность СОД присутствует на обеих изученных стадиях.

Ранее сообщалось, что у петунии активность СОД увеличивается во время созревания рыльца; при этом в пыльниках и завязи она была выше, чем на рыльце (Leung et al. 2006). Наиболее сильная экспрессия Cu/ZnСОД у табака, оцененная по результатам слияния промотора *SodCc* с геном  $\beta$ -глюкоронидазы, наблюдалась, среди репродуктивных органов, в завязях, рыльце и пыльцевых зёрнах (Van Camp et al. 1997). В рыльцах стрессоустойчивого

сорта хлопчатника активность СОД была выше, а уровень АФК ниже, чем у чувствительного. (Hu et al. 2020). При высоких температурах у африканского проса активность СОД на рыльце снижалась, а уровень АФК повышался (Djanaguiraman et al. 2018). В обоих случаях снижение активности СОД коррелировало со снижением репродуктивного успеха. Важность СОД для успешного опыления табака была подтверждена нанесением ингибитора СОД на рыльце (VI.4 Значение СОД для прорастания пыльцы табака *in vivo*). Можно предположить, что активность СОД на рыльце важна как для взаимопревращения АФК при подготовке к опылению, так и для управления окислительным стрессом. Следует отметить, что на рыльце могут быть активны и другие ферменты, такие как пероксидазы и каталаза, которые вместе с СОД определяют уровень АФК, как мы показали это для табака и лилии (VI.3. Активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах табака и лилии).

Наше сравнительное исследование позволяет проследить некоторые тенденции, которые можно рассматривать в эволюционной перспективе. Одно из возможных объяснений полученных результатов заключается в том, что супероксидный радикал первоначально мог быть основной сигнальной молекулой в экссудате рыльца; по-видимому, синтез АФК происходил непосредственно перед наступлением зрелости. Из-за увеличения активности СОД (и, возможно, снижения активности каталазы) концентрация  $H_2O_2$  и ее роль как регулятора прорастания становились выше у более дивергентных двудольных растений. Это могло дать преимущества, так как пероксид водорода – более стабильная АФК, и она проходит внутрь клетки через аквапорины. Параллельно начало генерации АФК сместилось в сторону более молодых рылец. Картина баланса АФК на рыльцах очень сложна, так как зависит от многих факторов, таких как фенотип конкретного растения, факторы окружающей среды и доступность пыльцы. Открытым остался вопрос о балансе АФК на влажных рыльцах однодольных цветковых растений. Является ли лилия типичным представителем или скорее исключением из правила? Этому посвящено продолжение нашего исследования в 2024 году.

## **VI.6. Содержание АФК в опылительных каплях хвойных растений из разных филогенетических групп**

В отличие от цветковых растений, пыльца голосеменных в основном переносится ветром и попадает на опылительную каплю, выделяемую женской шишкой. Она втягивается или высыхает и, таким образом, участвует в захвате, адгезии и транспортировке пыльцы к семязачатку (Gelbart and von Aderkas 2002; von Aderkas et al. 2018). Объем капли варьирует от 10 нл до 1  $\mu$ л (Prior et al. 2019). По составу опылительная капля представляет собой внеклеточную жидкость, содержащую неорганические вещества, углеводы, жирные кислоты и белки (Coulter et al. 2012). Лу с соавторами использовали газовую хроматографию и масс-спектрометрию для идентификации в общей сложности 101 метаболита в опылительной капле 200



*Ginkgo biloba* L.: основными метаболитами были сахара, за которыми следовали органические кислоты и спирты, участвующие в метаболизме углеводов, глицина, серина и треонина (Lu et al. 2020). Протеомный анализ опылительных капель некоторых голосеменных растений выявил определенное сходство с другими внеклеточными жидкостями, богатыми сахарами (Hou et al. 2019; Prior et al. 2019). Выделение и втягивание опылительной капли — во многом загадочный процесс. В последнее время на основании транскриптома семязачатка гинкго сделано предположение о гормональной регуляции процесса, но это исследование еще предстоит продолжить (Che et al. 2021). Еще менее изучены в этом отношении хвойные, широко распространенные в Северном полушарии и образующие огромные лесные массивы. В доступной литературе мы не нашли данных о содержании АФК в опылительных каплях каких-либо видов.

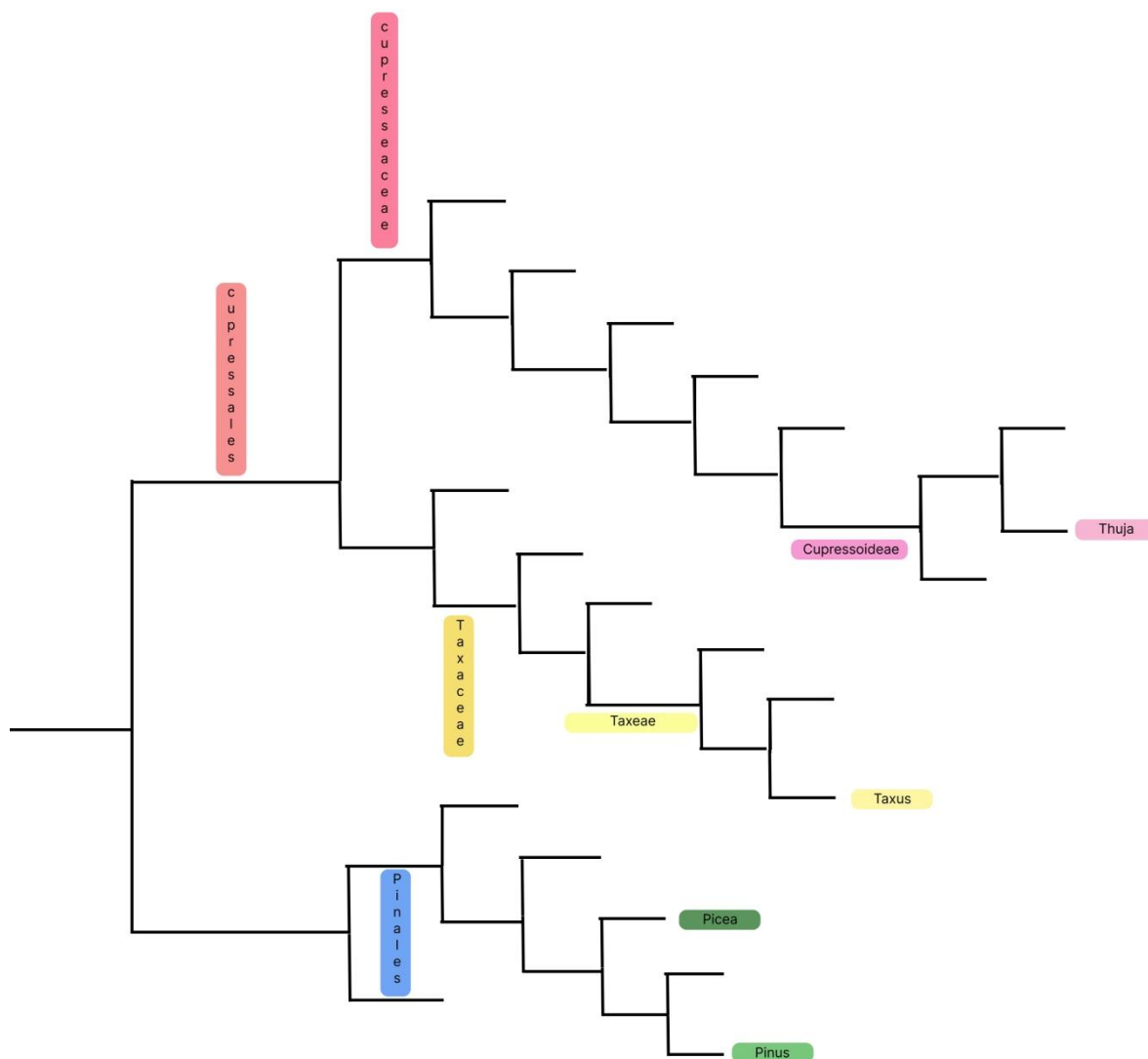


Рисунок 75. Систематическое положение изученных растений в соответствии с современной филогенией голосеменных (Lu et al. 2014; Ran et al. 2018; Yang et al. 2022).

В то же время *in vitro* было обнаружено влияние АФК на прорастание пыльцы *Picea pungens*: пероксид водорода и супероксид радикал стимулировали его (Рисунок 11), причем  $H_2O_2$  вызывал также изменения мембранного потенциала (Рисунок 49), а  $O_2^{\cdot-}$  - увеличение числа биполярно прорастающих зёрен (Рисунок 11). В данной части работы мы детектировали АФК в опылительных каплях различных хвойных с использованием комплекса методов, применявшихся ранее для изучения экссудата рыльца: ЭПР-спектроскопии и спектрофотометрии.

Анализировали опылительные капли четырех видов хвойных растений из трех семейств: Cupressaceae (*Thuja occidentalis* L.), Taxaceae (*Taxus baccata* L.) и Pinaceae (*Pinus sylvestris* L., *Picea pungens* Engelm.) (Рисунок 75). *Picea* и *Pinus* представляют относительно базальную кладу, *Taxus* и *Thuja* принадлежат к более дивергентным хвойным, причем *Thuja* можно считать наиболее продвинутой в соответствии с современной филогенией (Lu et al. 2014; Ran et al. 2018; Yang et al. 2022). Механизм опыления у этих родов достаточно хорошо изучен (Owens et al. 1998), как и биохимический состав капель у тех видов, которые имеют относительно крупные капли (например, *Taxus baccata*). Основными компонентами являются углеводы и аминокислоты, присутствуют также небольшие количества пептидов, неорганического фосфата, кальция, яблочной и лимонной кислот, белков (Gelbart and von Aderkas 2002; Prior et al. 2013; von Aderkas et al. 2018).

Сбор опылительных капель – сезонная работа: капли присутствуют кратковременно (около недели для каждого вида), а их появление зависит от погоды: в холодные или ветреные дни капли не появляются, что согласуется с зависимостью от водного потенциала дерева ( $\Psi$ ), обнаруженной ранее для *Picea engelmannii* (Owens et al. 1987). В теплые безветренные дни у тиса и туи массово появлялись капли на протяжении всего периода пыления (Рисунок 76а, в). У *T.occidentalis* пыльцевые капли выступают сразу на нескольких семязачатках в каждой шишке (Рисунок 76б), что типично для туи по литературным данным (Owens and Molder 1980a). У тиса каждая шишка с редуцированными чешуями несёт одну опылительную каплю (Рисунок 76г) (Stützel and Röwekamp 1999). Для сосны и ели ветки нужно было держать во влажной атмосфере для сбора опылительных капель. Сложность наблюдения капель в естественных условиях согласуется с данными по другим видам ели: у *Picea sitchensis* семязачатки внутри женской шишки выделяют капли асинхронно в течение одной недели. Капли появлялись последовательно акропетальным образом внутри шишки (Owens and Molder 1980b). На одной женской шишке мы наблюдали до 6 опылительных капель одновременно, пример шишки с несколькими каплями можно увидеть на Рисунок 76д, но часто появлялась только одна или две капли. У сосны опылительные капли были небольшими и едва заметными на шишке (Рисунок 76е).

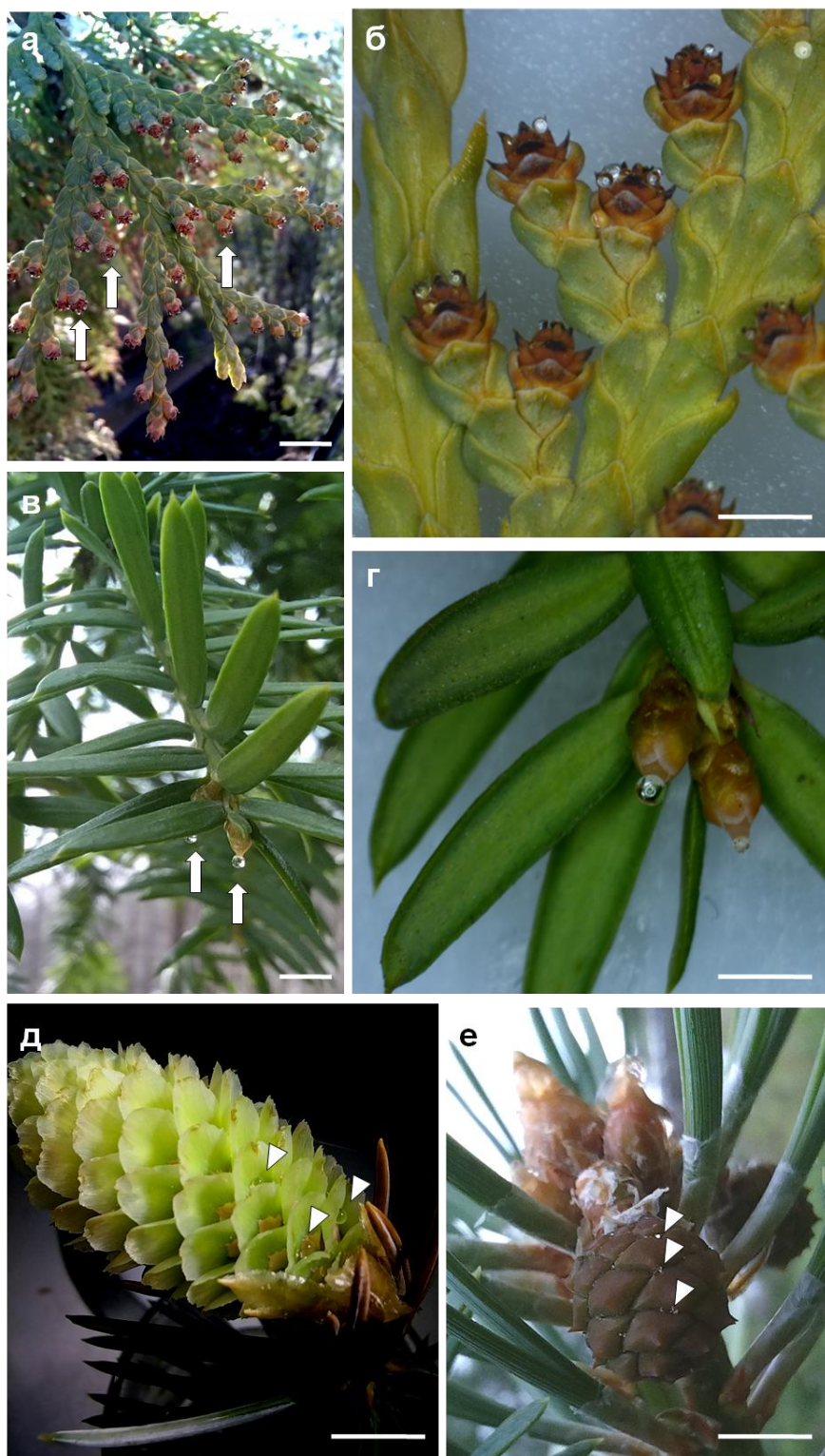


Рисунок 76. Женские шишки изучаемых видов. Ветки с фертильными женскими шишками (а, в) и опылительные капли (б, г-е) в период рецептивности: *Thuja occidentalis* – а, б; *Taxus baccata* – в, г; *Picea pungens* – д, *Pinus sylvestris* – е. Женские шишки на ветках отмечены стрелками (а, в). Масштабная линейка – 1 мм (б), 5 мм (а, в-е).

Для детекции АФК в опылительных каплях мы использовали те же методические подходы, что и для изучения редокс-баланса на влажных рыльцах. Для обнаружения АФК (поскольку ранее никто не установил факт их наличия либо отсутствия) мы использовали ЭПР-спектроскопию с неспецифическим, высокочувствительным спиновым зондом САТ1Н.

Оказалось, что АФК содержатся во всех исследованных образцах (Рисунок 77), хотя и в разном количестве. Мы не беремся проводить количественное сравнение между опылительными каплями разных видов, так как количество капель на одной шишке, а также объем одной капли у исследуемых видов различны. Наши оценки позволили установить, что опылительные капли с разных шишек одного и того же вида, собранные в разные дни, дают статистически близкие уровни сигнала ЭПР, т. е. уровень АФК является относительно постоянным характерным признаком опылительных капель каждого из видов (Рисунок 78а).

Аналогичная ситуация наблюдается и у цветковых растений, где уровень АФК в экссудате рыльца можно оценить для каждого вида, но трудно сравнивать между видами из-за разного размера пестика (см. VI.5 Динамика продукции АФК на рыльцах цветковых растений из разных филогенетических групп). В этом случае окрашивание пестиков позволяет сравнить динамику АФК между видами (Рисунок 71), однако, в случае шишек такой возможности у нас не было.

ЭПР спектроскопия также использовалась для оценки уровня супероксидного радикала в опылительных каплях. Мы обнаружили  $O_2^{\bullet -}$  в рецептивных жидкостях трех видов (Рисунок 77). В образцах, собранных с туи, не было сигнала от DEPMPO, следовательно,  $O_2^{\bullet -}$  не присутствует в детектируемых количествах.

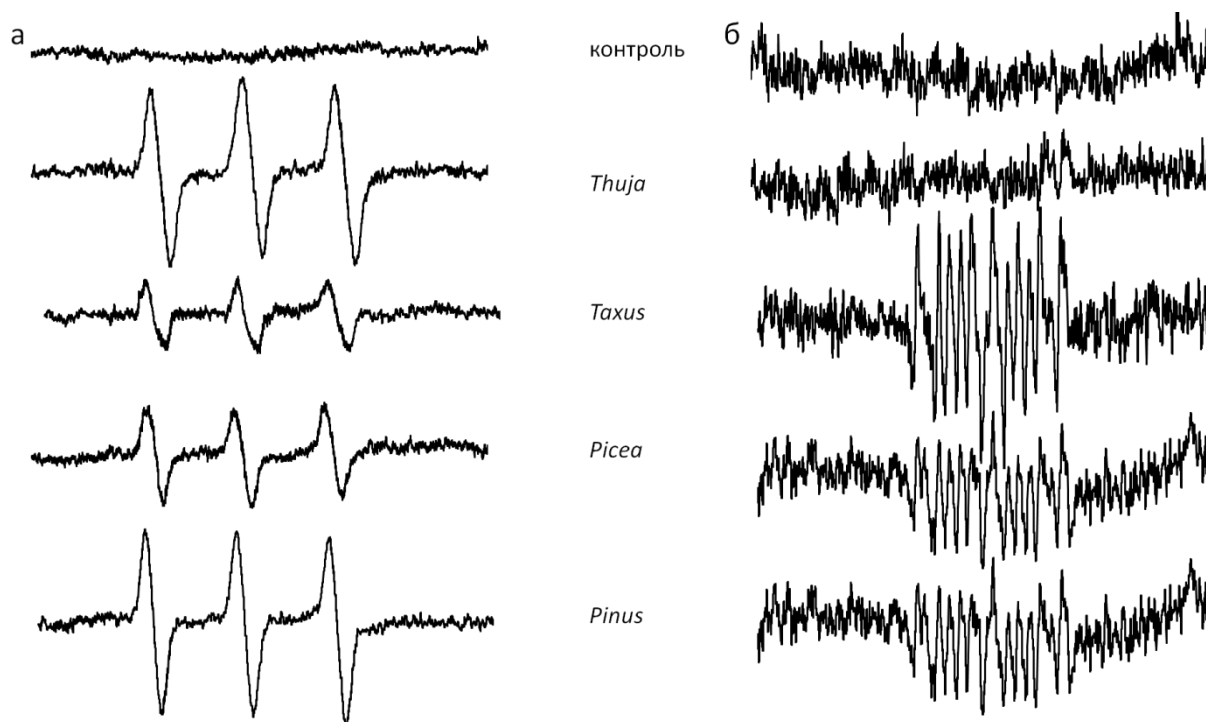


Рисунок 77. АФК в опылительных каплях хвойных растений. Характерные спектры ЭПР неспецифического спинового зонда САТ1Н, отражающие суммарный уровень АФК (а) и специфической спиновой ловушки DEPMPO, отражающие генерацию  $O_2^{\bullet -}$  (б).

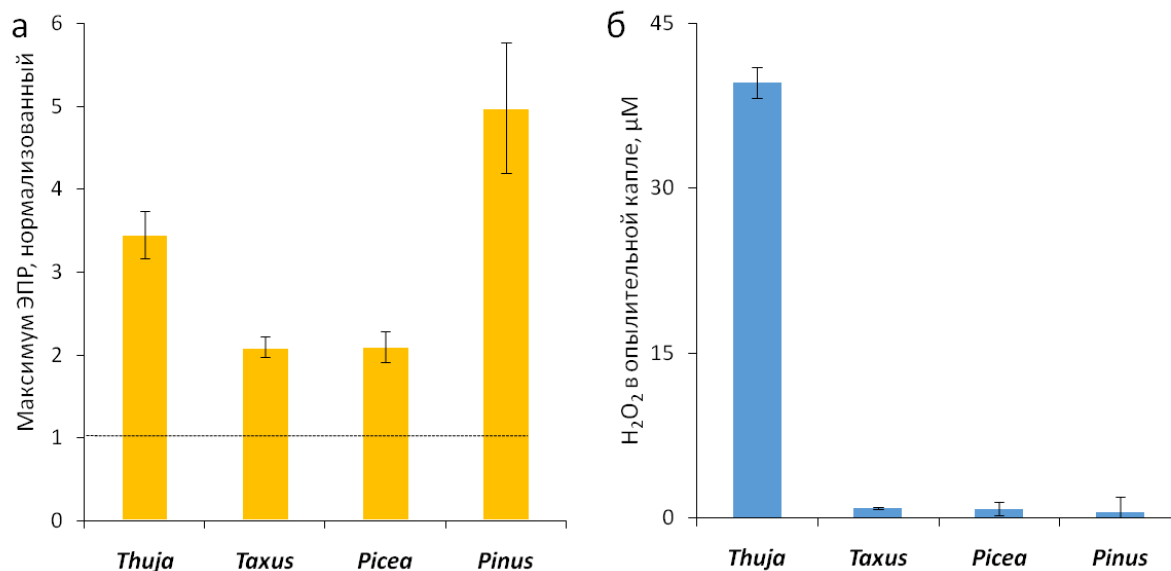


Рисунок 78. Общее содержание АФК и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в опылительных каплях по данным ЭПР спектроскопии с использованием спинового зонда CAT1H (а) и по данным спектрофотометрии и окрашивания методом FOX1 (б).

Измерение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в опылительных каплях показало, что это вещество отсутствует в определяемых количествах во всех из них, кроме туи (Рисунок 78б). Для каждого измерения была калибровочная кривая; предел обнаружения по ней составлял 0,5-1 µM пероксида.

Таким образом, в зависимости от вида растения, основной АФК в опылительной капле могут быть как пероксид водорода, так и супероксид радикал.

На основании полученных данных мы сделали предположение, что O<sub>2</sub><sup>•-</sup> является основной регуляторной АФК в опылительных каплях *Taxus*, *Pinus* и *Picea*, а у *Thuja* он конвертируется в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, либо пероксид образуется в какой-либо другой реакции. Сопоставляя эти различия с систематическим положением, можно сделать предварительный вывод о большем значении супероксида в репродукции Pinaceae и Taxaceae, что может в какой-то мере отражать эволюционную тенденцию, так как они представляют более базальные клады по сравнению с Cupressaceae (Yang et al. 2022). Можно предположить, что эволюция шла в сторону повышения уровня и значения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вместо O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, что является более «базовым» вариантом. Аналогичная, но более сложная тенденция отмечена для цветковых растений (VI.5 Динамика продукции АФК на рыльцах цветковых растений из разных филогенетических групп).

Таким образом, наше понимание функций опылительной капли расширяется. Самые основные функции – питание пыльцы и доставка ее к микропиле – достаточно подробно изучены (von Aderkas et al. 2018); биохимический состав капли также может играть роль в оптимизации прорастания подходящей пыльцы (von Aderkas et al. 2012); по поводу некоторых видов, в том числе ископаемых, было высказано предположение, что капли запечатывают

микропиле после опыления (Gelbart and von Aderkas 2002); также обсуждалась защитная функция опылительной капли, которая включала работу хитиназы и других ферментов (Coulter et al. 2012; Prior et al. 2019).

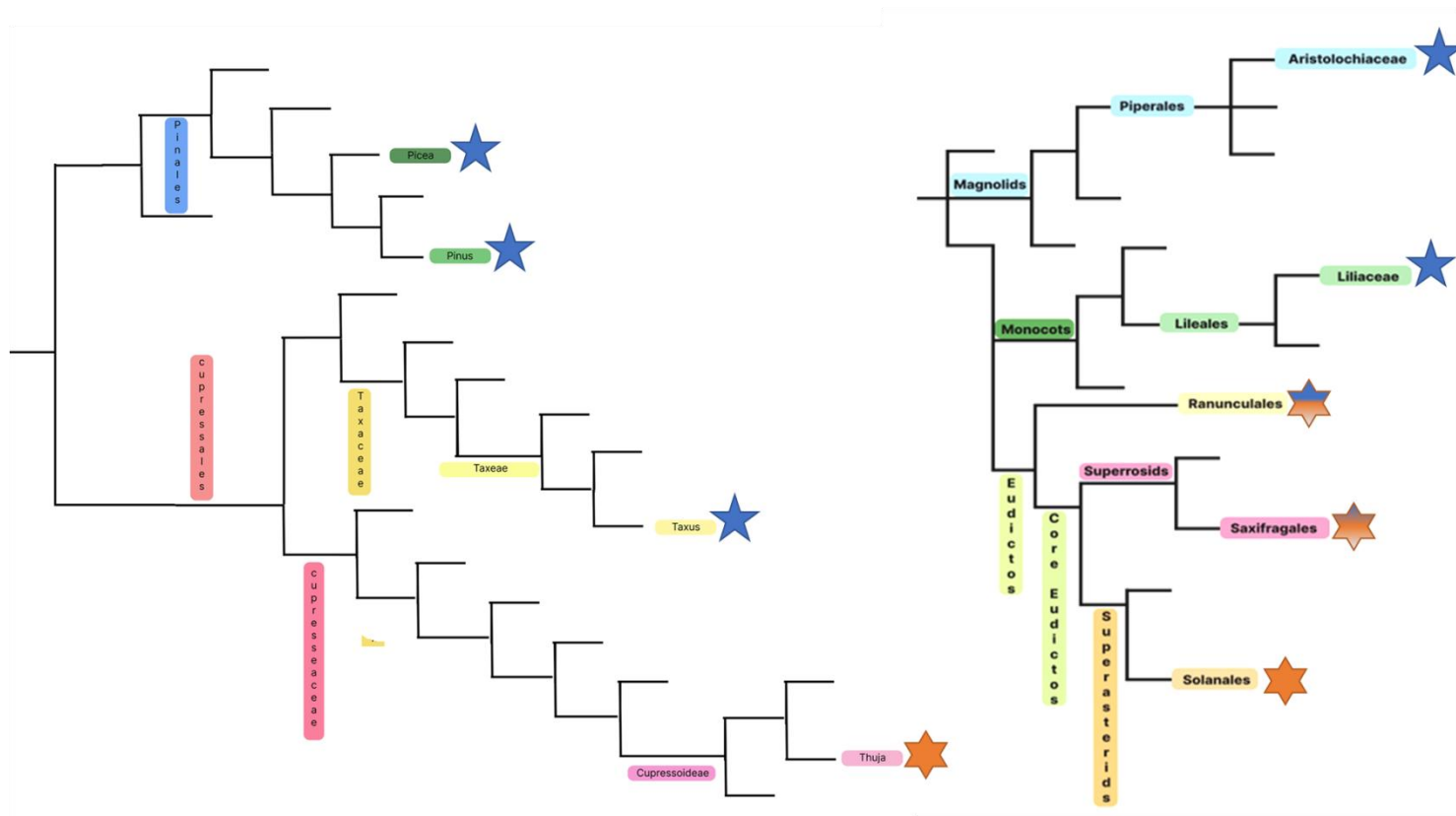


Рисунок 79. Преобладание супероксид радикала (синяя звездочка) или пероксида водорода (оранжевая звездочка) в рецептивных жидкостях растений из разных систематических групп цветковых и хвойных растений.

Обнаруженные нами в опылительных каплях хвойных АФК потенциально могут выполнять три функции: 1) стимулировать прорастание пыльцы, что подтверждено экспериментально; 2) давать преимущество совместимой пыльце за счет оптимального уровня АФК для каждого из видов; 3) защищать репродуктивные ткани от грибков и бактерий. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить вклад АФК в функции (2) и (3).

Таким образом, у голосеменных, как и цветковых растений, встречаются разные паттерны АФК в рецептивной жидкости, однако один из них, по-видимому, более базальный, является доминирующим.

На основании полученных данных мы можем заключить, что воздействие женских тканей на прорастающую пыльцу с помощью АФК является универсальным свойством семенных растений, по крайней мере, в случае прорастания в жидкости. При этом можно проследить эволюционную тенденцию по переходу от регуляции прорастания супероксид радикалом к возрастанию роли пероксида водорода (Рисунок 79), и от единственной активной формы кислорода к более сложному балансу между ними.

## Заключение

Активные формы кислорода – группа универсальных регуляторов и сигнальных агентов, пути образования и воздействия которых многообразны. Различные АФК, в зависимости от их локализации и уровня генерации, могут как активировать физиологические процессы, так и ингибировать их, в избыточных количествах приводя к разрушению клеточных и тканевых структур. На соматических клетках ранее была продемонстрирована роль АФК в контроле морфогенеза и межклеточного взаимодействия.

В данном исследовании впервые выявлена роль АФК во взаимодействии между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в прогамной фазе оплодотворения у семенных растений; обнаружено, что регуляция прорастания пыльцевых зёрен активными формами кислорода свойственна не только цветковым, но и хвойным растениям. Актуальные представления упрощенно представлены на итоговой схеме на Рисунок 80.

Выявление двух основных АФК, опосредующих взаимодействие между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита, свидетельствует о консервативном характере АФК-регуляции опыления. С другой стороны, различия в балансе между различными АФК – преобладание супероксид радикала либо пероксида водорода в рецептивных жидкостях и соответствующая чувствительность пыльцевых зёрен у представителей различных таксонов – свидетельствуют о разнообразии механизмов контроля опыления. В настоящее время, продолжая развитие данного исследования, мы расширяем спектр видов для понимания закономерностей АФК-регуляции, например, в группе однодольных растений. В последнее время мы исследовали представителей семейств Бромелиевые и Орхидные.

Существенно расширены представления о механизмах восприятия АФК-сигнала мужским гаметофитом, включающих модуляцию активности ионных каналов, изменение мембранного потенциала и внутриклеточного рН. При этом выявлены важные сходства в изменениях мембранного потенциала и других параметров ионного гомеостаза у представителей хвойных растений и цветковых растений на ранней стадии прорастания (Рисунок 80а). В то же время в пыльцевой трубке в функционировании ионного транспорта обнаружены существенные различия, который могут служить одним из объяснений более быстрого роста у цветковых растений (Рисунок 80а,б).

Закономерности, обнаруженные в ходе исследования и осмысленные в данной работе, могут стать основанием как для практических инноваций в сельском хозяйстве и лесоводстве, таких как повышение эффективности размножения хозяйственно значимых и редких растений путем воздействия на баланс АФК, так и для будущих открытий в пограничной области между контролем морфогенеза с помощью АФК и другими регуляторными системами, в первую очередь, гормональной системой. Такие исследования уже проводятся в нашей лаборатории.

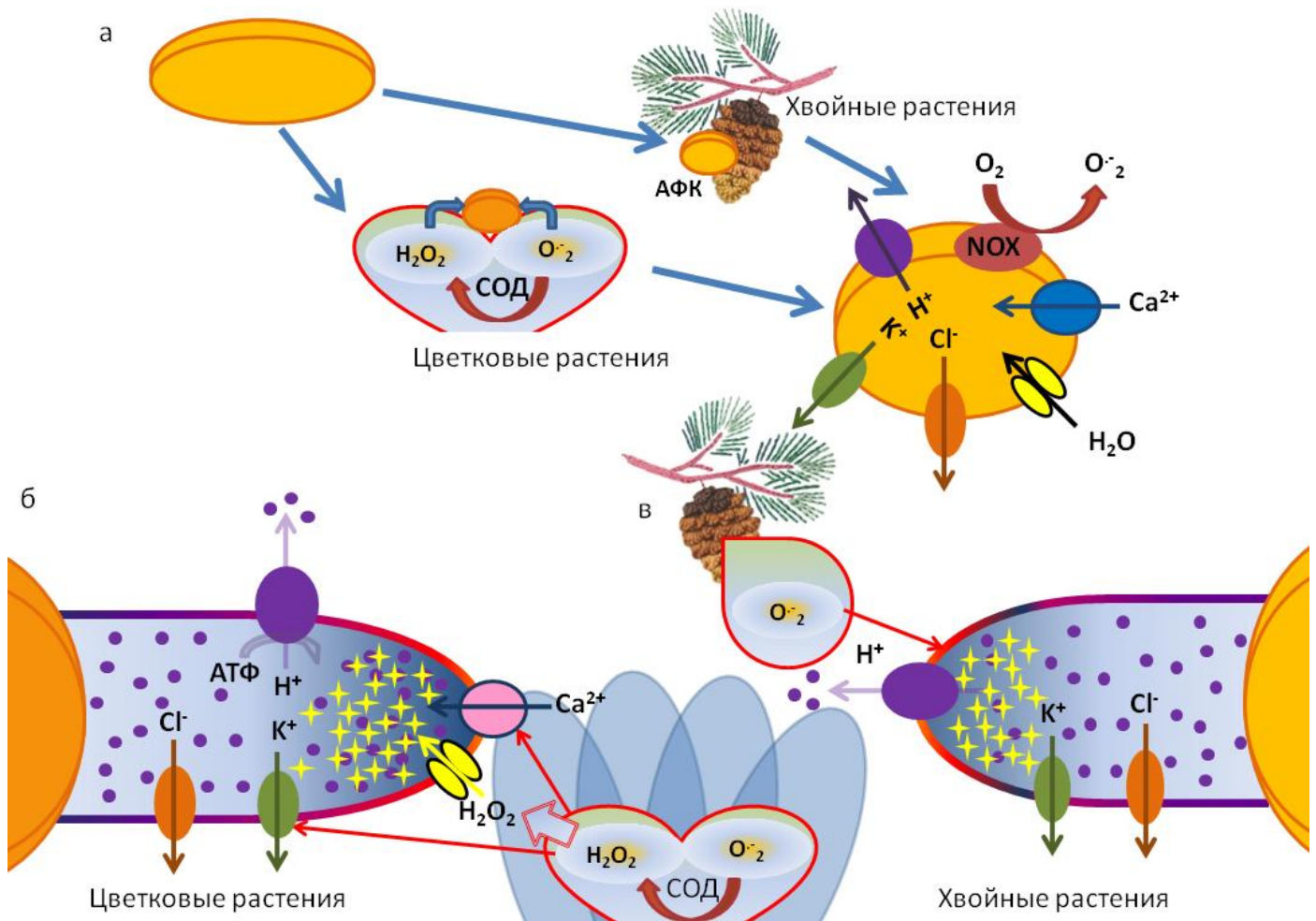


Рисунок 80 АФК и ионный транспорт в контроле прорастания пыльцевых зёрен (а) и роста пыльцевых трубок (б, в) *in vivo*. АФК продуцируются рыльцем цветковых растений и женской шишкой хвойных растений, а также генерируются прорастающим пыльцевым зерном. а – на ранней стадии прорастания происходит гидратация пыльцевого зерна, после чего активируются ион-транспортные системы, которые изучали:  $H^+$ -АТФаза, анионные каналы,  $K^+$  каналы,  $Ca^{2+}$ -проводящие каналы. Активация ионных токов и метаболизма происходит у голосеменных и цветковых растений принципиально сходно. Вслед за этим появляется пыльцевая трубка; б, в – в пыльцевых трубках цветковых и хвойных растений присутствует градиент мембранного потенциала (окрашивание мембраны), градиент кальция (изображен голубым), апикальное скопление пероксида водорода (звездочки), градиент протонов (кружочки), который поддерживается  $H^+$ -АТФазой. При этом форма градиентов у цветковых растений (б) и у хвойных растения (в) отличается, что мы показали для градиентов мембранного потенциала, протонов и  $H_2O_2$ . Обозначены также ион-транспортные системы, которые, по нашим данным, участвуют в поддержании градиента мембранного потенциала. На мембране трубки цветковых растений обозначены выявленные мишени для АФК, в упрощенном виде показана генерация АФК на рыльце пестика и в опылительной капле. Показан доминирующий паттерн АФК-регуляции: для цветковых растений – переход  $O_2^{\cdot -}$  в  $H_2O_2$  с участием СОД, для хвойных растений -  $O_2^{\cdot -}$ , который генерирует большинство изученных видов.



## Выводы

1. АФК-регуляция прогамной фазы оплодотворения у семенных растений носит универсальный характер и играет важную роль во взаимодействия между мужским гаметофитом и спорофитом. Пыльцевые зёрна и трубки голосеменных и цветковых растений чувствительны к уровню и составу АФК в окружающей среде. Чувствительность к определенной АФК варьирует в зависимости от объекта: пыльцевые зёрна *Nicotiana tabacum* более чувствительны к  $H_2O_2$ , а для *Lilium longiflorum* основным регулятором является  $O_2^{\bullet -}$ .
2. Ионный транспорт в ходе активации пыльцевого зерна семенных растений носит консервативный характер. У представителей голосеменных и покрытосеменных растений обнаружен ранний выход анионов из пыльцевых зёрен, гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки и продукция внеклеточных АФК, необходимых для успешной активации пыльцевого зерна и его прорастания.
3. В пыльцевых трубках *Nicotiana tabacum*, *Lilium longiflorum* и *Picea pungens* обнаружен латеральный градиент мембранного потенциала, который поддерживается за счет работы различных ион-транспортных систем, включая анионные каналы и  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы. Эндогенные АФК в цитоплазме пыльцевых трубок также распределены неравномерно: в апикальной части сконцентрирован  $H_2O_2$ , а в стержневой части трубки локализован  $O_2^{\bullet -}$  митохондриального происхождения.
4. Мишенями для АФК на плазмалемме мужского гаметофита цветковых растений: являются кальций-проводящие и калиевые каналы. Экзогенные и эндогенные АФК регулируют форму и амплитуду градиента мембранного потенциала как у голосеменных, так и у покрытосеменных растений, причем у последних они также влияют на градиент рН и внутриклеточный  $Ca^{2+}$ .
5. АФК присутствуют в рецептивных жидкостях всех изученных нами голосеменных и покрытосеменных растений. При этом у хвойных и части цветковых растений преобладает только одна из активных форм кислорода ( $H_2O_2$  или  $O_2^{\bullet -}$ ), в то время для некоторых покрытосеменных характерен экссудат с двумя основными АФК, баланс между которыми поддерживается ферментами редокс-гомеостаза, главным образом, супероксиддисмутазой и каталазой. Динамика АФК имеет видовую специфику, но их суммарный уровень повышается при подготовке к опылению у всех изученных нами растений.

## Список цитированной литературы

- Андреюк Д, Матвеева Н, Тукеева М, Ермаков И (2001) Внутриклеточные концентрации калия, хлорида и протонов в процессе дифференциации мужского гаметофита табака. Физиология растений 48:455–460.
- Бабушкина К, Лунёва О (2023) Участие АФК в регуляции прорастания пыльцы ели колючей женской шишкой. In: Научный дебют 2023. МЦНП «НОВАЯ НАУКА», Петрозаводск, pp 156–166
- Брейгина МА, Матвеева НП, Андреюк ДС, Ермаков ИП (2012) Трансмембранный перенос  $K^+$  и  $Cl^-$  в процессе активации пыльцевого зерна *in vivo* и *in vitro*. Онтогенез 43:103–112.
- Брейгина МА, Матвеева НП, Ермаков ИП (2009а) Роль  $Cl^-$  в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Онтогенез 40:199–207.
- Брейгина МА, Смирнова АВ, Масленников МВ, et al (2010) Действие ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака. Цитология 52:334–341.
- Брейгина МА, Смирнова АВ, Матвеева НП, Ермаков ИП (2009b) Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. Цитология 51:815–823.
- Евменьева АА, Брейгина МА (2018) Актуальные аспекты редокс-регуляции прорастания пыльцевых зерен ели. LAP Lambert Publishing, Москва
- Ермаков ИП, Матвеева НП, Брейгина МА (2016) Физиология гаплоидного поколения семенных растений. Товарищество научных изданий КМК, Москва
- Ковалева ЛВ, Воронков АС, Захарова ЕВ, et al (2016) Экзогенные Иук И Абк Стимулируют Прорастание Мужского Гаметофита Петунии, Активируя  $Ca^{2+}$ -Зависимые  $K^+$ -Каналы И Модулируя Активность  $H^+$ -Атфазы Плазмалеммы И Актинового Цитоскелета . Онтогенез 47:138–151. doi: 10.7868/s0475145016030034
- Мазина СЕ, Матвеева НП, Ермаков ИП (2002) Детерминация положения функциональной поры в пыльцевом зерне табака. Цитология 44:33–39.
- Максимов Н, Брейгина М, Ермаков И (2015) Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода. Цитология 57:720–726.
- Матвеева НП, Андреюк ДС, Войцех ОО, Ермаков ИП (2003а) Регуляторные изменения внутриклеточного рН и выход из пыльцевых зёрен  $Cl^-$  на начальном этапе прорастания *in vitro*. Физиология растений 50:360–365.
- Матвеева НП, Андреюк ДС, Ермаков ИП (2003b) Трансмембранный перенос  $Cl^-$  при прорастании пыльцевого зерна табака. Биохимия 68:1550–1555.
- Матвеева НП, Андреюк ДС, Лазарева ЕА (2004) Влияние конканавалина А на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН в процессе активации пыльцевого зерна табака *in vitro*. Физиология растений 51:549–554.
- Матвеева НП, Войцех ОО, Андреюк ДС, Ермаков ИП (2002) Роль  $H^+$ -АТФазы и альтернативной оксидазы в регуляции величины внутриклеточного рН на разных стадиях развития мужского гаметофита табака. Онтогенез 33:436.
- Медведев СС (2012) Электрофизиология растений. Изд-во С.-Петербургского Университета

- Оприлов ВА, Пятагин СС, Ретивин ВГ (1991) Биоэлектrogenез у высших растений. Наука, Москва
- Смирнова АВ, Матвеева НП, Полесская ОГ, Ермаков ИП (2009) Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна. *Онтогенез* 40:425–435.
- Allwood EG, Anthony RG, Smertenko AP, et al (2002) Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. *Plant Cell* 14:2915–2927. doi: 10.1105/tpc.005363
- Aloisi I, Cai G, Faleri C, et al (2017) Spermine Regulates Pollen Tube Growth by Modulating Ca<sup>2+</sup>-Dependent Actin Organization and Cell Wall Structure. *Front Plant Sci* 8:1701. doi: 10.3389/fpls.2017.01701
- Aloisi I, Cai G, Serafini-Fracassini D, Del Duca S (2016) Polyamines in Pollen: From Microsporogenesis to Fertilization. *Front Plant Sci* 7:155. doi: 10.3389/fpls.2016.00155
- Aloisi I, Cai G, Tumiatti V, et al (2015) Natural polyamines and synthetic analogues modify the growth and the morphology of *Pyrus communis* pollen tubes affecting ROS levels and causing cell death. *Plant Sci* 239:92–105. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.07.008
- Anderhag P, Hepler PK, Lazzaro MD (2000) Microtubules and microfilaments are both responsible for pollen tube elongation in the conifer *Picea abies* (Norway spruce). *Protoplasma* 214:141–157. doi: 10.1007/BF01279059
- Anjum N a., Singh HP, Khan MIR, et al (2015) Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. *Environ Sci Pollut Res* 22:3361–3382. doi: 10.1007/s11356-014-3849-9
- Aouar L, Chebli Y, Geitmann A (2010) Morphogenesis of complex plant cell shapes: The mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 23:15–27. doi: 10.1007/s00497-009-0110-7
- Aslmoshtaghi E, Shahsavari AR (2016) Biochemical changes involved in self-incompatibility in two cultivars of olive (*Olea europaea* L.) during flower development. *J Hortic Sci Biotechnol* 91:189–195. doi: 10.1080/14620316.2015.1133606
- Åström H, Sorri O, Raudaskoski M (1995) Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 8:61–69. doi: 10.1007/BF00230890
- Bansal P, Sharma P, Goyal V (2002) Impact of lead and cadmium on enzyme of citric acid cycle in germinating pea seeds. *Biol Plant* 45:125–127.
- Bashe D, Mascarenhas JP (1984) Changes in potassium ion concentrations during pollen dehydration and germination in relation to protein synthesis. *Plant Sci Lett* 35:55–60.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287. doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Bednarska E (1991) Calcium uptake from the stigma by germinating pollen in *Primula officinalis* L. and *Ruscus aculeatus* L. *Sex Plant Reprod* 4:36–38. doi: 10.1007/BF00194569
- Bednarska E (1989a) The effect of exogenous Ca<sup>2+</sup> ions on pollen grain germination and pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* 2:53–58. doi: 10.1007/BF00190119
- Bednarska E (1989b) Localization of calcium on the stigma surface of *Ruscus aculeatus* L. - Studies using chlorotetracycline and X-ray microanalysis. *Planta* 179:11–16. doi: 10.1007/BF00395765
- Bednarska E, Lenartowska M, Niekraás L (2005) Localization of pectins and Ca<sup>2+</sup> ions in unpollinated and pollinated wet (*Petunia hybrida* Hort.) and dry (*Haemanthus albiflos* L.) stigma. *Folia Histochem Cytobiol*

Benkő P, Jee S, Kaszler N, et al (2020) Polyamines treatment during pollen germination and pollen tube elongation in tobacco modulate reactive oxygen species and nitric oxide homeostasis. *J Plant Physiol* 244:153085. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153085>

Bhatla SC, Gogna M, Jain P, et al (2021) Signaling mechanisms and biochemical pathways regulating pollen-stigma interaction, seed development and seedling growth in sunflower under salt stress. *Plant Signal Behav* 16:1958129. doi: 10.1080/15592324.2021.1958129

Bienert GP, Müller ALB, Kristiansen KA, et al (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282:1183–1192. doi: 10.1074/jbc.M603761200

Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758:994–1003. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015

Binder WD, Ballantyne DJ (1975) The respiration and fertility of *Pseudotsuga menziesii* (Douglas fir) pollen. *Can J Bot* 53:819–823. doi: 10.1139/b75-099

Blackmore S, Cannon M (1983) Palynology and systematics of morinaceae. *Rev Palaeobot Palynol* 40:207–226.

Bloch D, Pleskot R, Pejchar P, et al (2016) Exocyst SEC3 and Phosphoinositides Define Sites of Exocytosis in Pollen Tube Initiation and Growth. *Plant Physiol* 172:980–1002. doi: 10.1104/pp.16.00690

Boisson-Dernier A, Frietsch S, Kim T-H, et al (2008) The peroxin loss-of-function mutation abstinence by mutual consent disrupts male-female gametophyte recognition. *Curr Biol* 18:63–68. doi: 10.1016/j.cub.2007.11.067

Bolinder K, Niklas KJ, Rydin C (2015) Aerodynamics and pollen ultrastructure in *Ephedra*. *Am J Bot* 102:457–470. doi: 10.3732/ajb.1400517

Bosch M, Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17:3219–3226.

Bredemeijer GMM (1984) The role of peroxidases in pistil-pollen interactions. *Theor Appl Genet* 68:193–206. doi: 10.1007/BF00266889

Brewbaker JL, Kwack BH (1963) The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *Am J Bot* 50:859. doi: 10.2307/2439772

Breygina M, Abramochkin DV, Maksimov N, Yermakov I (2017) Effects of Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> currents in lily pollen protoplasts. *Funct Plant Biol* 44:1171–1177. doi: 10.1071/FP17033

Breygina M, Klimenko E (2020) ROS and ions in cell signaling during sexual plant reproduction. *Int J Mol Sci* 21:9476. doi: 10.3390/ijms21249476

Breygina M, Klimenko E, Podolyan A, Voronkov A (2020) Dynamics of pollen activation and the role of H<sup>+</sup>-ATPase in pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*). *Plants* 9:1760. doi: 10.3390/plants9121760

Breygina M, Klimenko E, Schekaleva O (2021a) Pollen germination and pollen tube growth in gymnosperms. *Plants* 10:1301. doi: 10.3390/plants10071301

Breygina M, Klimenko E, Shilov E, et al (2021b) Hydrogen peroxide in tobacco stigma exudate affects pollen proteome and membrane potential in pollen tubes. *Plant Biol* 23:592–602. doi: 10.1111/plb.13255

- Breygina M, Luneva O, Schekaleva O, et al (2023a) Pattern of ROS generation and interconversion on wet stigmas in basal and divergent angiosperms. *Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s10725-023-01033-w
- Breygina M, Maksimov N, Polevova S, Evmenyeva A (2019) Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*). *Protoplasma* 256:941–949. doi: 10.1007/s00709-018-01333-3
- Breygina M, Matveyeva N, Polevova S, et al (2012) Ni<sup>2+</sup> effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. *BioMetals.* doi: 10.1007/s10534-012-9584-0
- Breygina M, Schekaleva O, Klimenko E, Luneva O (2022) The balance between different ROS on tobacco stigma during flowering and its role in pollen germination. *Plants* 11:993.
- Breygina M, Smirnova A, Matveeva N, Yermakov I (2010a) The role of anion channels in pollen germination and tube growth. In: Kaiser BJ (ed) *Pollen: Structure, Types and Effects*. Nova Science Publishers, Inc., pp 1–19
- Breygina M, Smirnova A, Matveeva N, Yermakov I (2010b) The role of anion channels in pollen germination and tube growth. In: *Pollen: Structure, Types and Effects*. pp 173–178
- Breygina M, Voronkov A, Ivanova T, Babushkina K (2023b) Fatty acid composition of dry and germinating pollen of Gymnosperm and Angiosperm plants. *Int J Mol Sci* 24:9717.
- Breygina MA, Abramochkin DV, Maksimov NM, Yermakov IP (2016) Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. *Plant Biol* 18:761–767. doi: 10.1111/plb.12470
- Bright J, Hiscock SJ, James PE, Hancock JT (2009) Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiol Biochem* 47:49–55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.005>
- Brink RA (1924) The Physiology of Pollen. III. Growth In vitro and In vivo. *Am J Bot* 11:351. doi: 10.2307/2435322
- Brummer B, Felle H, Parish RW (1984) Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump. *FEBS Lett* 174:223–227.
- Bunzel M (2010) Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem Rev* 9:47–64. doi: 10.1007/s11101-009-9139-3
- Byng JW, Smets EF, Vugt R Van, et al (2018) The phylogeny of angiosperms poster: a visual summary of APG IV family relationships and floral diversity. *The Gloral Flora* 1:4–7.
- Cai G, Parrotta L, Cresti M (2015) Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. *J Integr Plant Biol* 57:63–78. doi: 10.1111/jipb.12289
- Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK (2008) Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol* 146:1611–1621. doi: 10.1104/pp.107.113035
- Cárdenas L, McKenna ST, Kunkel JG, Hepler PK (2006) NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *Plant Physiol* 142:1460–1468. doi: 10.1104/pp.106.087882
- Carmichael JS, Friedman WE (1996) Double fertilization in *Gnetum gnemon* (Gnetaceae): Its bearing on the evolution of sexual reproduction within the gnetales and the anthophyte clade. *Am J Bot* 83:767–780. doi: 10.2307/2445854
- Carol RJ, Dolan L (2006) The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot* 57:1829–34. doi: 10.1093/jxb/erj201

- Certal AC, Almeida RB, Carvalho LM, et al (2008) Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Plant Cell* 20:614–34. doi: 10.1105/tpc.106.047423
- Çetinbaş-Genç A, Yanik F, Vardar F (2019) Histochemical and Biochemical Alterations in the Stigma of *Hibiscus syriacus* (Malvaceae) During Flower Development. *Caryologia* 72:3–13. doi: 10.13128/cayologia-196
- Chae K, Lord EM (2011) Pollen tube growth and guidance : roles of small , secreted proteins. *Ann Bot* 108:627–636. doi: 10.1093/aob/mcr015
- Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, et al (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc* 181:1–20. doi: 10.1111/BOJ.12385
- Chaturvedi P, Ghatak A, Weckwerth W (2016) Pollen proteomics: from stress physiology to developmental priming. *Plant Reprod* 29:119–132. doi: 10.1007/s00497-016-0283-9
- Che W, Mao D, Zhang T, et al (2021) Phytohormone requirements for pollination drop secretion in ginkgo biloba ovules. *Botany* 99:251–260. doi: 10.1139/cjb-2020-0113
- Chebli Y, Kroeger J, Geitmann A (2013) Transport logistics in pollen tubes. *Mol Plant* 6:1037–1052. doi: 10.1093/mp/sst073
- Chen CY, Wong EI, Vidali L, et al (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* 14:2175–2190. doi: 10.1105/tpc.003038
- Chen KM, Wu GL, Wang YH, et al (2008) The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of *Picea wilsonii* by changing the deposition of cell wall components. *Protoplasma* 233:39–49. doi: 10.1007/s00709-008-0310-2
- Chen L, Lianping S, Yu X, et al (2021) Pollen PCP-B peptides unlock a stigma peptide–receptor kinase gating mechanism for pollination. *Science* (80- ) 372:171–175. doi: 10.1126/science.abc6107
- Chen T, Teng N, Wu X, et al (2007a) Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking. *Plant Cell Physiol* 48:19–30. doi: 10.1093/pcp/pcl036
- Chen T, Wu X, Chen Y, et al (2007b) Pollen and Pollen Tube Proteomics. In: Šamaj J, Thelen JJ (eds) *Plant Proteomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 270–282
- Chen T, Wu X, Chen Y, et al (2009) Combined proteomic and cytological analysis of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth. *Plant Physiol* 149:1111–1126. doi: 10.1104/pp.108.127514
- Chen Y, Chen T, Shen S, et al (2006) Differential display proteomic analysis of *Picea meyeri* pollen germination and pollen-tube growth after inhibition of actin polymerization by latrunculin B. *Plant J* 47:174–195. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02783.x
- Cheung AY, Wu H-M (2008) Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu Rev Plant Biol* 59:547–572. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092921
- Ching TM, Ching KK (1962) Fatty acids in pollen of some coniferous species. *Science* (80- ) 138:890–891. doi: 10.1126/science.138.3543.890
- Chung HK, Lee KY (1977) A study of the chemical constituents of gymnosperm pollens. *Seoul J Med* 18:125–136.

- Cocucci SM, Morgutti S (1986) Stimulation of proton extrusion by K<sup>+</sup> and divalent cations (Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in maize root segments. *Physiol Plant* 68:497–501.
- Colmenero-Flores JM, Martínez G, Gamba G, et al (2007) Identification and functional characterization of cation–chloride cotransporters in plants. *Plant J* 50:278–292.
- Corem S, Carpaneto A, Soliani P, et al (2009) Response to cytosolic nickel of Slow Vacuolar channels in the hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Eur Biophys J* 38:495–501. doi: 10.1007/s00249-008-0400-2
- Coulter A, Poullis BAD, von Aderkas P (2012) Pollination drops as dynamic apoplastic secretions. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 207:482–490. doi: 10.1016/j.flora.2012.06.004
- Cresti M, Ciampolini F, Mulcahy DLM, Mulcahy G (1985) Ultrastructure of *Nicotiana alata* Pollen, Its Germination and Early Tube Formation. *Am J Bot* 72:719–727. doi: 10.2307/2443685
- Cresti M, Keijzer CJ, Tiezzi A, et al (1986) Stigma of *Nicotiana*: ultrastructural and biochemical studies. *Am J Bot* 73:1713–1722.
- Cui X, Liu S, Zhang L, et al (2022) Endophytic extract *Zhinengcong* alleviates heat stress-induced reproductive defect in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* 13:
- Cui Y, Ling Y, Zhou J, Li X (2015) Interference of the histone deacetylase inhibits pollen germination and pollen tube growth in *Picea wilsonii* mast. *PLoS One* 10:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0145661
- Dafni A (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press
- Dafni A, Maués MM (1998) A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sex Plant Reprod* 11:177–180.
- Dai S, Chen T, Chong K, et al (2007a) Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Mol Cell Proteomics* 6:207–230. doi: 10.1074/mcp.M600146-MCP200
- Dai S, Li L, Chen T, et al (2006) Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* 6:2504–2529. doi: 10.1002/pmic.200401351
- Dai S, Wang T, Yan X, Chen S (2007b) Proteomics of pollen development and germination. *J Proteome Res* 6:4556–4563. doi: 10.1021/pr070474y
- De Nisi P, Dell’Orto M, Pirovano L, Zocchi G (1999) Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 209:187–194. doi: 10.1007/s004250050621
- De Win AHN, Knuiman B, Pierson ES, et al (1996) Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 9:93–101. doi: 10.1007/BF02153056
- Dehgan B, Dehgan NB (1988) COMPARATIVE POLLEN MORPHOLOGY AND TAXONOMIC AFFINITIES IN CYCADALES. *Am J Bot* 75:1501–1516. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb11224.x>
- Demidchik V (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci* 116:81–88. doi: 10.1242/jcs.00201
- Demidchik V (2018) ROS-activated ion channels in plants: Biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *Int J Mol Sci* 19:17–21. doi: 10.3390/ijms19041263

- Demidchik V, Cui T a, Svistunenko D, et al (2010) Arabidopsis root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J Cell Sci* 123:1468–79. doi: 10.1242/jcs.064352
- Demidchik V, Maathuis FJM (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol* 175:387–404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
- Deng M-H, Wen J-F, Huo J-L, et al (2012) Relationship of metabolism of reactive oxygen species with cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hortic (Amsterdam)* 134:232–236. doi: 10.1016/j.scienta.2011.10.027
- Derksen J, Li Y, Knuiman B, Geurts H (1999) The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes. *Protoplasma* 208:26–36.
- Diao M, Qu X, Huang S (2018) Calcium imaging in Arabidopsis pollen cells using G-CaMP5. *J Integr Plant Biol.* doi: 10.1111/jipb.12642
- Dickinson DB (1965) Germination of lily pollen: Respiration and tube growth. *Science (80- )* 150:1818–1819. doi: 10.1126/science.150.3705.1818
- Dickinson DB (1968) Rapid starch synthesis associated with increased respiration in germinating lily pollen. *Plant Physiol* 43:1–8. doi: 10.1104/pp.43.1.1
- Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, Grigor'Ev IA (2011) EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res* 45:417–430. doi: 10.3109/10715762.2010.540242
- Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I (2018) Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxidants Redox Signal* 28:1433–1443. doi: 10.1089/ars.2017.7396
- Djanaguiraman M, Perumal R, Jagadish SVK, et al (2018) Sensitivity of sorghum pollen and pistil to high-temperature stress. *Plant Cell Environ* 41:1065–1082. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.13089>
- Do THT, Choi H, Palmgren M, et al (2019) Arabidopsis ABCG28 is required for the apical accumulation of reactive oxygen species in growing pollen tubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:12540–12549. doi: 10.1073/pnas.1902010116
- Domingos P, Dias PN, Tavares B, et al (2019) Molecular and electrophysiological characterization of anion transport in Arabidopsis thaliana pollen reveals regulatory roles for pH, Ca<sup>2+</sup> and GABA. *New Phytol* 223:1353–1371. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.15863>
- Domingos P, Prado AM, Wong A, et al (2015) Nitric oxide: A multitasked signaling gas in plants. *Mol Plant* 8:506–520. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.010
- Duan Q, Kita D, Johnson E a, et al (2014) Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in Arabidopsis. *Nat Commun* 5:3129.
- Dumas C (1977) Lipochemistry of the progamic stage of a self-incompatible species: Neutral lipids and fatty acids of the secretory stigma during its glandular activity, and of the solid style, the ovary and the anther in *Forsythia intermedia* Zab. (Heterostylic species). *Planta* 137:177–184. doi: 10.1007/BF00387556
- Dumas C, Gaude T (2006) Fertilization in plants : Is calcium a key player ? *17*:244–253. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.02.005
- El-Ghazaly G, Rowley J, Hesse M (1998) Polarity, aperture condition and germination in pollen grains of Ephedra (Gnetales). *Plant Syst Evol* 213:217–231. doi: 10.1007/BF00985202



- Fábián A, Sáfrán E, Szabó-Eitel G, et al (2019) Stigma Functionality and Fertility Are Reduced by Heat and Drought Co-stress in Wheat. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2019.00244
- Falhof J, Pedersen JT, Fuglsang AT, Palmgren M (2016) Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Mol. Plant* 9:323–337.
- Fan L-M, Wang Y-F, Wu W-H (2003) Outward K<sup>+</sup> channels in *Brassica chinensis* pollen protoplasts are regulated by external and internal pH. *Protoplasma* 220:143–52. doi: 10.1007/s00709-002-0037-4
- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH (2001) In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *J Exp Bot* 52:1603–1614. doi: 10.1093/jexbot/52.361.1603
- Fancy NN, Bahlmann A, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ* 40:462–472.
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. In: Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V (eds) *Plant Proteomics: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 9–14
- Feijó J a., Costa SS, Prado AM, et al (2004) Signalling by tips. *Curr Opin Plant Biol* 7:589–598. doi: 10.1016/j.pbi.2004.07.014
- Feijó JA, Malhó R, Obermeyer G (1995) Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 187:155–167. doi: 10.1007/BF01280244
- Feijó JA, Malhó R, Pais MSS, et al (1992) A cytochemical study on the role of ATPases during pollen germination in *Agapanthus umbelatus* L'Her. *Sex Plant Reprod* 5:138–145. doi: 10.1007/BF00194873
- Feijo JA, Sainhas J, Hackett GR, et al (1999) Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J Cell Biol* 144:483–496.
- Feijo JA, Sainhas J, Holdaway-Clarke T, et al (2001) Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *BioEssays* 23:86–94.
- Feijó JA, Wudick MM (2018) “Calcium is life.” *J Exp Bot* 69:4147–4150. doi: 10.1093/jxb/ery279
- Feng H, Liu C, Fu R, et al (2019) LORELEI-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINS 2/3 regulate pollen tube growth as chaperones and coreceptors for ANXUR/BUPS receptor kinases in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 12:1612–1623.
- Ferguson C, Teeri TT, Siika-Aho M, et al (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206:452–460. doi: 10.1007/s004250050421
- Fernandes AR, Sa-Correia I (2001) The activity of plasma membrane H<sup>+</sup> -ATPase is strongly stimulated during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth under high copper stress , accompanying intracellular acidi ® cation. *Yeast* 18:511–521.
- Fernando DD (2005) Characterization of pollen tube development in *Pinus strobus* (Eastern white pine) through proteomic analysis of differentially expressed proteins. *Proteomics* 5:4917–4926. doi: 10.1002/pmic.200500009
- Fernando DD, Lazzaro MD, Owens JN (2005) Growth and development of conifer pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 18:149–162. doi: 10.1007/s00497-005-0008-y
- Fernando DD, Owens JN, Yu X, Ekramoddoullah AKM (2001) RNA and protein synthesis during in vitro pollen germination and tube elongation in *Pinus monticola* and other conifers. *Sex Plant Reprod* 13:259–217

264. doi: 10.1007/s004970100069

Fernando DD, Quinn CR, Brenner ED, Owens JN (2010) Male gametophyte development and evolution in extant gymnosperms. *Int J Plant Dev Biol* 4:47–63.

Firon N, Nepi M, Pacini E (2012) Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Ann Bot* 109:1201–1213. doi: 10.1093/aob/mcs070

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, et al (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442–6. doi: 10.1038/nature01485

Franchi GG, Piotto B, Nepi M, et al (2011) Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. *J Exp Bot* 62:5267–5281. doi: 10.1093/jxb/err154

Frankis Jr. RC (1990) RNA and Protein Synthesis in Germinating Pine Pollen. *J Exp Bot* 41:1469–1473. doi: 10.1093/jxb/41.11.1469

Franklin-Tong V (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11:727–38.

Franklin-Tong VE, Holdaway-clarke TL, Straatman KR, et al (2002) Involvement of extracellular calcium influx in the self- incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J* 29:333–345.

Fricker MD, White NS, Obermeyer G (1997) pH gradients are not associated with tip growth in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J Cell Sci* 110 ( Pt 1:1729–40.

Friedman WE (1987a) Growth and Development of the Male Gametophyte of *Ginkgo biloba* within the Ovule (in vivo). *Am J Bot* 74:1797–1815.

Friedman WE (1987b) Morphogenesis and Experimental Aspects of Growth and Development of the Male Gametophyte of *Ginkgo biloba* in Vitro. *Am J Bot* 74:1816–1830.

Fu Y (2015) The cytoskeleton in the pollen tube. *Curr Opin Plant Biol* 28:111–119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.004>

Fujiwara MT, Yoshioka Y, Hirano T, et al (2012) Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 7:34–37. doi: 10.4161/psb.7.1.18484

Galen C, Plowright RC (1987) Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Can J Bot* 65:107–111. doi: 10.1139/b87-015

Gamero-Sandemetrio E, Gómez-Pastor R, Matallana E (2017) Zymography Methods to Simultaneously Analyze Superoxide Dismutase and Catalase Activities: Novel Application for Yeast Species Identification. *Methods Mol Biol* 1626:189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4\_17

Gao XQ, Liu CZ, Li DD, et al (2016) The Arabidopsis KIN $\beta$  $\gamma$  Subunit of the SnRK1 Complex Regulates Pollen Hydration on the Stigma by Mediating the Level of Reactive Oxygen Species in Pollen. *PLoS Genet* 12:1–25. doi: 10.1371/journal.pgen.1006228

Ge LL, Xie CT, Tian HQ, Russell SD (2009) Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. *Sex Plant Reprod* 22:87–96. doi: 10.1007/s00497-009-0094-3

Ge Z, Cheung AY, Qu LJ (2019) Pollen tube integrity regulation in flowering plants: insights from molecular assemblies on the pollen tube surface. *New Phytol* 222:687–693. doi: 10.1111/nph.15645

Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, et al (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell Mol Life Sci* 59:708–714. doi: 10.1007/S00018-002-

- Gehwolf R, Griessner M, Pertl H, Obermeyer G (2002) First patch, then catch: Measuring the activity and the mRNA transcripts of a proton pump in individual *Lilium* pollen protoplasts. *FEBS Lett* 512:152–156. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02246-9
- Geitmann A (2011) Generating a Cellular Protuberance: Mechanics of Tip Growth. In: Wojtaszek P (ed) *Signaling and Communication in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 117–132
- Geitmann A (2010) How to shape a cylinder: pollen tube as a model system for the generation of complex cellular geometry. *Sex Plant Reprod* 23:63–71. doi: 10.1007/s00497-009-0121-4
- Geitmann A, Emons AMC (2000) The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *J Microsc* 198:218–245.
- Geitmann A, Parre E (2004) The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements. *Sex Plant Reprod* 17:9–16.
- Geitmann A, Steer M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: *The pollen tube*. Springer, pp 177–200
- Gelbart G, von Aderkas P (2002) Ovular secretions as part of pollination mechanisms in conifers. *Ann For Sci* 59:345–357. doi: 10.1051/forest
- Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11:2349–63.
- Griessner M, Obermeyer G (2003) Characterization of whole-cell K<sup>+</sup> currents across the plasma membrane of pollen grain and tube protoplasts of *Lilium longiflorum*. *J Membr Biol* 193:99–108. doi: 10.1007/s00232-002-2011-7
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, et al (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* 169:127–138. doi: 10.1083/jcb.200409140
- Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z (2013) Signaling in pollen tube growth: Crosstalk, feedback, and missing links. *Mol Plant* 6:1053–1064.
- Gür N, Topdemir A (2008) Effects of Some Heavy Metals on in vitro Pollen Germination and Tube Growth of Apricot (*Armenica vulgaris* Lam .) And Cherry (*Cerasus avium* L .). *World Appl Sci J* 4:195–198.
- Gutermuth T, Herbell S, Lassig R, et al (2018) Tip-localized Ca<sup>2+</sup>-permeable channels control pollen tube growth via kinase-dependent R- and S-type anion channel regulation. doi: 10.1111/nph.15067
- Gutermuth T, Lassig R, Portes M-T, et al (2013) Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20. *Plant Cell* 25:4525–43. doi: 10.1105/tpc.113.118463
- Hafidh S, Fila J, Honys D (2016) Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reprod* 29:31–51. doi: 10.1007/s00497-015-0272-4
- Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, et al (2018) *Illustrated Pollen Terminology*. Springer International Publishing, Cham
- Hamilton ES, Jensen GS, Maksaev G, et al (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* (80- ) 350:438–441.

- Hao H, Li Y, Hu Y, Lin J (2005) Inhibition of RNA and protein synthesis in pollen tube development of *Pinus bungeana* by actinomycin D and cycloheximide. *New Phytol* 165:721–729. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01290.x
- Hasegawa Y, Nakamura S, Uheda E, Nakamura N (2000) Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. *Grana* 39:46–55. doi: 10.1080/00173130150503803
- Hawker JS, Sedgley M, Loveys BR (1983) Composition of Stigmatic Exudate, Nectar and Pistil of Watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum; Nakai, Before and After Pollination. *Funct Plant Biol* 10:257–264.
- Haywood R (2013) Spin-Trapping: Theory and Applications. In: *Encyclopedia of Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg, pp 2447–2453
- Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ (2012) Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci* 17:32–38. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.007
- Hepler PK, Lovy-Wheeler A, McKenna ST, Kunkel JG (2006) Ions and Pollen Tube Growth.
- Hepler PK, Rounds CM, Winship LJ (2013) Control of cell wall extensibility during pollen tube growth. *Mol. Plant* 6:998–1017.
- Hepler PK, Winship LJ (2015) The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *J Integr Plant Biol* 57:79–92. doi: 10.1111/jipb.12315
- Herbell S, Gutermuth T, Konrad KR (2018) An interconnection between tip-focused Ca and anion homeostasis controls pollen tube growth pollen tube growth. *Plant Signal Behav* 13:1–6. doi: 10.1080/15592324.2018.1529521
- Herrero M, Dickinson HG (1981) Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *J Cell Sci* 47:365 LP – 383.
- Heslop-Harrison J (1979) Aspects of the Structure, Cytochemistry and Germination of the Pollen of Rye. *Ann Bot* 44:2–47.
- Heslop-Harrison J (1975) The Croonian Lecture, 1974 - The physiology of the pollen grain surface. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 190:275–299. doi: 10.1098/rspb.1975.0093
- Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Int Rev Cytol* 107:1–78.
- Heslop-Harrison Y (2000) Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. *Ann Bot* 85:5–13. doi: 10.1006/anbo.1999.1063
- Hesse M (1980) Pollenkitt is lacking in *Gnetum gnemon* (Gnetaceae). *Plant Syst Evol* 136:41–46. doi: 10.1007/BF00985310
- Hesse M, Zetter R, Halbritter H, et al (2009) *Pollen terminology. An illustrated handbook*, 1st edn. Springer, Wien, New York
- Hiscock SJ, Allen AM (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: The search for consensus. *New Phytol* 179:286–317. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x
- Hiscock SJ, Bright J, McInnis SM, et al (2007) Signaling on the stigma. Potential new roles for ROS and NO in plant cell signaling. *Plant Signal Behav* 2:23–24. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01875.x
- Hoekstra FA (1979) Mitochondrial development and activity of binucleate and trinucleate pollen during

germination in vitro. *Planta* 145:25–36. doi: 10.1007/BF00379924

Hoekstra FA, Bruinsma J (1975) Respiration and Vitality of Binucleate and Trinucleate Pollen. *Physiol Plant* 34:221–225. doi: 10.1111/j.1399-3054.1975.tb03825.x

Hoffmann RD, Portes MT, Olsen LI, et al (2020) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases sustain pollen tube growth and fertilization. *Nat Commun* 11:1–15. doi: 10.1038/s41467-020-16253-1

Holdaway-Clarke TL, Hepler PK (2003) Control of pollen tube growth: Role of ion gradients and fluxes. *New Phytol* 159:539–563. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00847.x

Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, et al (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 5:4864–4884. doi: 10.1002/pmic.200402011

Hou C, Saunders RMK, Deng N, et al (2019) Pollination drop proteome and reproductive organ transcriptome comparison in gnetum reveals entomophilous adaptation. *Genes (Basel)* 10:1–21. doi: 10.3390/genes10100800

Hu W, Huang Y, Bai H, et al (2020) Influence of drought stress on pistil physiology and reproductive success of two *Gossypium hirsutum* cultivars differing in drought tolerance. *Physiol Plant* 168:909–920. doi: <https://doi.org/10.1111/ppl.13030>

Huang L, Zhang C, Fang M, et al (2011) The cell death in CMS plants. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 1:297. doi: 10.7763/ijbbb.2011.v1.56

Hwang J-U, Gu Y, Lee Y-J, Yang Z (2005) Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes. *Mol Biol Cell* 16:5385–5399.

Inupakutika MA, Sengupta S, Devireddy AR, et al (2016) The evolution of reactive oxygen species metabolism. *J Exp Bot* 67:5933–5943. doi: 10.1093/jxb/erw382

Ischebeck T (2016) Lipids in pollen — They are different. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1861:1315–1328. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.023

Ischebeck T, Valledor L, Lyon D, et al (2014) Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth. *Mol Cell Proteomics* 13:295–310. doi: 10.1074/mcp.M113.028100

Ivanova T V., Voronkov AS, Kuznetsova EI, et al (2019) Lipid Fatty Acids from the Pericarp of *Cydonia oblonga* Mill. and *Mespilus germanica* L. are Involved in Plant Adaptation to Altitudinal Zonality. *Dokl Biochem Biophys* 486:229–233. doi: 10.1134/S1607672919030189

Iwano M, Entani T, Shiba H, et al (2009) Fine-tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol* 150:1322–34. doi: 10.1104/pp.109.139329

Iwano M, Shiba H, Miwa T, et al (2004) Ca<sup>2+</sup> dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136:3562–3571. doi: 10.1104/pp.104.046961

Jaffe LA, Weisenseel MH, Jaffe LF (1975) Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. *J Cell Biol* 67:488–492.

Jimenez-Quesada MJ, Carmona R, Lima-Cabello E, et al (2017) Generation of nitric oxide by olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination and assessment of the S-nitroso- and nitro-proteomes by computational predictive methods. *Nitric Oxide* 68:23–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.06.005>

Jimenez-Quesada MJ, Traverso JA, Potocký M, et al (2019) Generation of Superoxide by OeRbohH, a NADPH Oxidase Activity During Olive (*Olea europaea* L.) Pollen Development and Germination. *Front* 221

Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.01149

Jin J, He K, Tang X, et al (2015) An arabidopsis transcriptional regulatory map reveals distinct functional and evolutionary features of novel transcription factors. *Mol Biol Evol* 32:1767–1773. doi: 10.1093/molbev/msv058

Jin J, Tian F, Yang D-C, et al (2016) PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res* 45:D1040–D1045. doi: 10.1093/nar/gkw982

Johnson MA, Harper JF, Palanivelu R (2019) A Fruitful Journey: Pollen Tube Navigation from Germination to Fertilization. *Annu Rev Plant Biol* 70:809–837. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100133

Johri BM (1992) Haustorial Role of Pollen Tubes. *Ann Bot* 471–475.

Joseph PD (1985) Oxidative activation of benzidine and its derivatives by peroxidases. *Environ Health Perspect VOL.* 64:171–178. doi: 10.1289/ehp.8564171

Justus CD, Anderhag P, Goins JL, Lazzaro MD (2004) Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips. *Planta* 219:103–109. doi: 10.1007/s00425-003-1193-2

Kandasamy MK, Vivekanandan M (1983) Biochemical composition of stigmatic exudate of *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *Aquat Bot* 16:41–47. doi: 10.1016/0304-3770(83)90050-5

Karapanos IC, Akoumianakis KA, Olympios CM, Passam HC (2010) Tomato pollen respiration in relation to in vitro germination and pollen tube growth under favourable and stress-inducing temperatures. *Sex Plant Reprod* 23:219–224. doi: 10.1007/s00497-009-0132-1

Kärkönen A, Kuchitsu K (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112:22–32. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.016

Kaya H, Iwano M, Takeda S, et al (2015) Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* doi: 10.4161/15592324.2014.989050

Kaya H, Nakajima R, Iwano M, et al (2014) Ca<sup>2+</sup>-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26:1069–1080. doi: 10.1105/tpc.113.120642

Kim YJ, Zhang D, Jung KH (2019) Molecular Basis of Pollen Germination in Cereals. *Trends Plant Sci* 24:1126–1136. doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.005

Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K (1995) Cytosolic concentration of Ca<sup>2+</sup> regulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 7:1333 LP – 1342. doi: 10.1105/tpc.7.8.1333

Kiyono H, Katano K, Suzuki N (2021) Links between Regulatory Systems of ROS and Carbohydrates in Reproductive Development. *Plants* 10:

Klahre U, Becker C, Schmitt AC, Kost B (2006) Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J* 46:1018–1031. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02757.x

Klavins SD, Kellogg DW, Krings M, et al (2005) Coprolites in a Middle Triassic cycad pollen cone: Evidence for insect pollination in early cycads? *Evol Ecol Res* 7:479–488.

Konar RN, Linskens HF (1966) Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. *Planta* 71:372–387. doi: 10.1007/BF00396322

- Konrad KR, Maierhofer T, Hedrich R (2018) Spatio-temporal aspects of Ca<sup>2+</sup> signalling: lessons from guard cells and pollen tubes. *J Exp Bot* 69:4195–4214. doi: 10.1093/jxb/ery154
- Kost B (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol* 18:119–127. doi: 10.1016/j.tcb.2008.01.003
- Kovaleva L, Voronkov A, Zakharova E, et al (2016) Regulation of Petunia pollen tube growth by phytohormones: identification of their potential targets. *J Agric Sci Technol A* 6:239–254. doi: 10.17265/2161-6256/2016.04.004
- Kroeger JH, Daher FB, Grant M, Geitmann A (2009) Microfilament Orientation Constrains Vesicle Flow and Spatial Distribution in Growing Pollen Tubes. *Biophys J* 97:1822–1831. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.038>
- Krzesłowska M (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 33:35–51.
- Kukavica B, Mojović M, Vucčinić Ž, et al (2009) Generation of Hydroxyl Radical in Isolated Pea Root Cell Wall, and the Role of Cell Wall-Bound Peroxidase, Mn-SOD and Phenolics in Their Production. *Plant Cell Physiol* 50:304–317. doi: 10.1093/pcp/pcn199
- Labandeira CC, Kvaček J, Mostovski MB (2007) Pollination drops, pollen, and insect pollination of Mesozoic gymnosperms. *Taxon* 56:663–695. doi: 10.2307/25065853
- Labarca C, Loewus F (1972) The Nutritional Role of Pistil Exudate in Pollen Tube Wall Formation in *Lilium longiflorum*: I. Utilization of Injected Stigmatic Exudate 1. *Plant Physiol* 50:7–14. doi: 10.1104/pp.50.1.7
- Lai HY, Setyawati MI, Duarte CV, et al (2022) Human hair proteins as natural reactive oxygen species scavengers for in vitro applications.
- Lan X, Yang J, Abhinandan K, et al (2017) Flavonoids and ROS Play Opposing Roles in Mediating Pollination in Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Mol Plant* 10:1361–1364. doi: 10.1016/j.molp.2017.08.002
- Lang V, Pertl-Obermeyer H, Safiarian MJ, Obermeyer G (2014) Pump up the volume - a central role for the plasma membrane H<sup>+</sup> pump in pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 251:477–488. doi: 10.1007/s00709-013-0555-2
- Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, et al (2014) Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J* 78:94–106. doi: 10.1111/tpj.12452
- Lazzaro MD (1996) The actin microfilament network within elongating pollen tubes of the gymnosperm *Picea abies* (Norway spruce). *Protoplasma* 194:186–194. doi: 10.1007/BF01882026
- Lazzaro MD, Cardenas L, Bhatt AP, et al (2005) Calcium gradients in conifer pollen tubes; dynamic properties differ from those seen in angiosperms. *J Exp Bot* 56:2619–2628. doi: 10.1093/jxb/eri256
- Lazzaro MD, Donohue JM, Soodavar FM (2003) Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes. *Protoplasma* 220:201–207. doi: 10.1007/s00709-002-0042-7
- Lazzaro MD, Marom EY, Reddy ASN (2013) Polarized cell growth, organelle motility, and cytoskeletal organization in conifer pollen tube tips are regulated by KCBP, the calmodulin-binding kinesin. *Planta* 238:587–597. doi: 10.1007/s00425-013-1919-8
- Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R (1998) Molecular cloning and expression of active Ole e

- 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem* 258:454–459. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580454.x
- Lefebvre B, Arango M, Oufattole M, et al (2005) Identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expressed in the pollen tube. *Plant Mol Biol* 58:775–787.
- Leslie AB (2010) Flotation preferentially selects saccate pollen during conifer pollination. *New Phytol* 188:273–279. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03356.x>
- Leung DWM, Moon B, Wang Y (2006) Superoxide dismutase activity in the reproductive tissues of petunia flowers. *Floriculture Ornamental Plant Biotechnol* 117–122.
- Li HJ, Yang WC (2018) Ligands Switch Model for Pollen-Tube Integrity and Burst. *Trends Plant Sci.* 23:369–372.
- Li K, Prada J, Damineli DSC, et al (2021) An optimized genetically encoded dual reporter for simultaneous ratio imaging of Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> reveals new insights into ion signaling in plants. *New Phytol* 230:2292–2310.
- Li M, Sha A, Zhou X, Yang P (2012) Comparative proteomic analyses reveal the changes of metabolic features in soybean (*Glycine max*) pistils upon pollination. *Sex Plant Reprod* 25:281–291. doi: 10.1007/s00497-012-0197-0
- Li N, Xu C, Li-Beisson Y, Philippar K (2016) Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends Plant Sci* 21:145–158. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.011
- Li S, Wan C, Kong J, et al (2004) Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol* 31:369–376.
- Li Z-G (2019) Chapter 5 - Measurement of signaling molecules calcium ion, reactive sulfur species, reactive carbonyl species, reactive nitrogen species, and reactive oxygen species in plants. In: Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NABT-PSM (eds) *Plant Signaling Molecules Role and Regulation Under Stressful Environments*. Woodhead Publishing, pp 83–103
- Lindsay SE, Fry SC (2007) Redox and Wall-Restructuring. In: Verbelen J-P, Vissenberg K (eds) *The Expanding Cell*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 159–190
- Lipchinsky A (2018) Electromechanics of polarized cell growth. *BioSystems* 173:114–132. doi: S030326471830296X
- Lipchinsky A (2015) Osmophoresis—a possible mechanism for vesicle trafficking in tip-growing cells. *Phys Biol* 12:66012. doi: 10.1088/1478-3975/12/6/066012
- Little S, Prior N, Pirone C, von Aderkas P (2014) Pollen-ovule Interactions in Gymnosperms. In: *Reproductive Biology of Plants*. pp 97–117
- Liu T, Kim DW, Niitsu M, et al (2014) Polyamine Oxidase 7 is a Terminal Catabolism-Type Enzyme in *Oryza sativa* and is Specifically Expressed in Anthers. *Plant Cell Physiol* 55:1110–1122. doi: 10.1093/pcp/pcu047
- Lopes AL, Moreira D, Ferreira MJ, et al (2019) Insights into secrets along the pollen tube pathway in need to be discovered. *J Exp Bot* 70:2979–2992. doi: 10.1093/jxb/erz087
- Lora J, Hormaza JI, Herrero M (2016) The Diversity of the Pollen Tube Pathway in Plants: Toward an Increasing Control by the Sporophyte. *Front Plant Sci* 7:107. doi: 10.3389/fpls.2016.00107
- Losada JM, Leslie AB (2018) Why are the seed cones of conifers so diverse at pollination? *Ann Bot* 224



121:1319–1331. doi: 10.1093/aob/mcy029

Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Allwood EG, et al (2006) Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily. *Plant Cell* 18:2182–2193. doi: 10.1105/tpc.106.044867

Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221:95–104.

Lu Y, Jin B, Wang L, et al (2011a) Adaptation of male reproductive structures to wind pollination in gymnosperms: Cones and pollen grains. *Can J Plant Sci* 91:897–906. doi: 10.4141/cjps2011-020

Lu Y, Ran JH, Guo DM, et al (2014) Phylogeny and divergence times of gymnosperms inferred from single-copy nuclear genes. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0107679

Lu Y, Wang L, Wang D, et al (2011b) Male cone morphogenesis, pollen development and pollen dispersal mechanism in *Ginkgo biloba* L. *Can J Plant Sci* 91:971–981. doi: 10.4141/cjps2011-036

Lu Y, Zhang L, Cheng F, et al (2016) The morphology, ultrastructure, element distribution and motion behaviour in pollen of *Ginkgo biloba* L. *Trees* 30:2189–2201. doi: 10.1007/s00468-016-1444-z

Lu Z, Jiang B, Zhao B, et al (2020) Liquid profiling in plants: Identification and analysis of extracellular metabolites and miRNAs in pollination drops of *Ginkgo biloba*. *Tree Physiol* 40:1420–1436. doi: 10.1093/TREEPHYS/TPAA073

Luo N, Yan A, Liu G, et al (2017) Exocytosis-coordinated mechanisms for tip growth underlie pollen tube growth guidance. *Nat Commun* 8:1–10.

Lyons JM, Wheaton TA, Pratt HK (1964) Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plants. *Plant Physiol* 39:262–268. doi: 10.1104/pp.39.2.262

Maeda H, Fukuyasu Y, Yoshida S, et al (2004) Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. *Angew Chemie - Int Ed* 43:2389–2391. doi: 10.1002/anie.200452381

Magler I, Nüss D, Hauser M, et al (2010) Molecular metamorphosis in polcalcin allergens by EF-hand rearrangements and domain swapping. *FEBS J* 277:2598–2610. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07671.x

Maksimov N, Evmenyeva A, Breygina M, Yermakov I (2018) The role of reactive oxygen species in pollen germination in *Picea pungens* (blue spruce). *Plant Reprod* 18:761–767. doi: 10.1007/s00497-018-0335-4

Malhó R, Coelho PC, Pierson E, Derksen J (2005) Endocytosis and membrane recycling in pollen tubes. In: *Plant endocytosis*. Springer, pp 277–291

Malho R, Read ND, Pais MS, Trewavas AJ (1994) Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *Plant J* 5:331–341.

Malho R, Read ND, Trewavas a. J, Pais MS (1995) Calcium Channel Activity during Pollen Tube Growth and Reorientation. *Plant Cell* 7:1173–1184. doi: 10.1105/tpc.7.8.1173

Malhó R, Serrazina S, Saavedra L, et al (2015) Ion and lipid signaling in apical growth—a dynamic machinery responding to extracellular cues. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00816

Malho R, Trewavas AJ (1996) Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8:1935–1949.

Mangalore C, Negi M, Pant S. (2017) Pollen Studies in Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa* Chive.). *Int J Agric* 225

Mangano S, Denita Juarez S, Estevez J (2016) ROS regulation of polar-growth in plant cells. *Plant Physiol* 171:pp.00191.2016. doi: 10.1104/pp.16.00191

Mangin ML (1886) Recherches Sur Le Pollen (suite). *Bull la Société Bot Fr* 33:512–517. doi: 10.1080/00378941.1886.10828486

Martin FW (1969) Compounds from the stigmas of ten species. *Am J Bot* 56:1023–1027.

Mascarenhas JP (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5:1303–1314. doi: 10.1105/tpc.5.10.1303

Mascarenhas JP (1971) RNA and Protein Synthesis During Pollen Development and Tube Growth. In: HESLOP-HARRISON JBT-P (ed). Butterworth-Heinemann, pp 201–222

Mascarenhas JP, Bell E (1969) Protein synthesis during germination of pollen: Studies on polyribosome formation. *BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth* 179:199–203. doi: 10.1016/0005-2787(69)90136-1

Mascarenhas NT, Bashe D, Eisenberg A, et al (1984) Messenger RNAs in corn pollen and protein synthesis during germination and pollen tube growth. *Theor Appl Genet* 68:323–326. doi: 10.1007/BF00267885

McInnis SM, Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, et al (2005) Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Plant Mol Biol* 57:659–677. doi: 10.1007/s11103-005-1426-9

McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk? *New Phytol* 172:221–228. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01875.x

Mei S, Yang C, Song X, et al (2021) Analysis of the effect of sterilization and storage on the quality of *Pinus yunnanensis* pollen based on untargeted metabolomics. *J Food Process Preserv* 45:e16033. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16033>

Mellema S, Eichenberger W, Rawyler A, et al (2002) The ethanolic fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen. *Plant J* 30:329–336. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01293.x>

Messerli MA, Robinson KR (2003) Ionic and osmotic disruptions of the lily pollen tube oscillator: testing proposed models. *Planta* 217:147–157. doi: 10.1007/s00425-003-0972-0

Michard E, Alves F, Feijó J a (2009) The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int J Dev Biol* 53:1609–22. doi: 10.1387/ijdb.072296em

Michard E, Simon AA, Tavares BB, et al (2017) Signaling with ions: the keystone for apical cell growth and morphogenesis in pollen tubes. *Plant Physiol* 173:91–111. doi: 10.1104/pp.16.01561

Miki-Hirosige H, Hoek IHS, Nakamura S (1987) Secretions from the pistil of *Lilium longiflorum*. *Am J Bot* 74:1709–1715. doi: 10.1002/j.1537-2197.1987.tb08772.x

Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15681–6. doi: 10.1073/pnas.1005776107

Mishra V, Singh P, Kushwaha BK, et al (2022) HPCA1 and HSL3: two plasma membrane proteins that probably cooperate to modulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling under drought conditions. *Plant Growth Regul* 98:1–3. doi: 10.1007/s10725-022-00829-6

- Mizuta Y, Higashiyama T (2018) Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.208447
- Möller M, Mill RR, Glidewell SM, et al (2000) Comparative biology of the pollination mechanisms in *Acmopyle pancheri* and *Phyllocladus hypophyllus* (Podocarpaceae s. l.). *Ann Bot* 86:149–158. doi: 10.1006/anbo.2000.1167
- Mollet J-C, Leroux C, Dardelle F, Lehner A (2013) Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth. *Plants* 2:107–147. doi: 10.3390/plants2010107
- Morgutti S, Ferrari-Bravo P, Marre MT, Cocucci SM (1981) Effects of Ni<sup>2+</sup> on proton extrusion and related transport processes and on the transmembrane electrical potential in maize roots. *Plant Sci Lett* 23:123–128. doi: doi:10.1016/0304-4211(81)90001-8
- Mou W, Kao Y-T, Michard E, et al (2020) Ethylene-independent signaling by the ethylene precursor ACC in *Arabidopsis* ovular pollen tube attraction. *Nat Commun* 11:4082. doi: 10.1038/s41467-020-17819-9
- Mouline K, Véry A, Gaymard F, et al (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 16:339–350. doi: 10.1101/gad.213902.scribes
- Moutinho A, Trewavas AJ, Malhó R (1998) Relocation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase activity during pollen tube reorientation. *Plant Cell* 10:1499–1509.
- Muhlemann JK, Younts TLB, Muday GK (2018) Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E11188–E11197. doi: 10.1073/pnas.1811492115
- Muren RC, Ching TM, Ching KIMK (1979) Metabolic Study of Douglas-fir Pollen Germination in vitro. *Physiol Plant* 46:287–292. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb02623.x>
- Nekrasov E V., Tallon SJ, Vyssotski M V., Catchpole OJ (2021) Extraction of lipids from New Zealand fern fronds using near-critical dimethyl ether and dimethyl ether–water–ethanol mixtures. *J Supercrit Fluids* 170:105137. doi: 10.1016/j.supflu.2020.105137
- Nie H, Cheng C, Hua J (2020) Mitochondrial proteomic analysis reveals that proteins relate to oxidoreductase activity play a central role in pollen fertility in cotton. *J Proteomics* 225:103861. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103861
- Nitsch JP (1965) Deux espaces photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. *Bull Bot Fr* 112:517–522.
- Nobel PS (2009) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, Fourth Edition, 4th edn. Elsevier
- Nobiling R, Reiss H-D (1987) Quantitative Analysis of Calcium Gradients and Activity in Growing Pollen Tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* 139:20–24.
- Noir S, Bräutigam A, Colby T, et al (2005) A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome. *Biochem Biophys Res Commun* 337:1257–1266. doi: 10.1016/J.BBRC.2005.09.185
- Nygaard P (1969) Studies on the Germination of Pine Pollen (*Pinus mugo*) in vitro. I. Growth Conditions and Effects of pH and Temperature on Germination, Tube Growth and Respiration. *Physiol Plant* 22:338–346. doi: 10.1111/j.1399-3054.1969.tb07384.x
- Nygaard PER (1973) Nucleotide Metabolism during Pine Pollen Germination. *Physiol Plant* 28:361–371. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1973.tb01202.x>

- Nygaard PER (1977) Utilization of Exogenous Carbohydrates for Tube Growth and Starch Synthesis in Pine Pollen Suspension Cultures. *Physiol Plant* 39:206–210. doi: 10.1111/j.1399-3054.1977.tb04037.x
- Obermeyer G, Blatt MR (1995) Electrical properties of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*: Characteristics of the non-germinating pollen grain. *J Exp Bot* 46:803–813. doi: 10.1093/jxb/46.7.803
- Obermeyer G, Lützelshwab M, Heumann HG, Weisenseel MH (1992) Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPases in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* 171:55–63. doi: 10.1007/BF01379280
- Okolo EC, Abigor RD (2006) Components Of The Stigmatic Exudate Of *Raphia hookeri*, Mann And Wendl. *J Agric For Soc Sci* 4:83–88.
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, et al (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458:357–361.
- Owens JN, Molder M (1980a) Sexual reproduction in western red cedar (*Thuja plicata*). *Can J Bot* 58:1376–1393. doi: 10.1139/b80-169
- Owens JN, Molder M (1980b) Sexual reproduction of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Can J Bot* 58:886–901. doi: 10.1139/b80-113
- Owens JN, Simpson SJ, Caron GE (1987) The pollination mechanism of Engelmann spruce (*Picea engelmannii*). *Can J Bot* 65:1439–1450. doi: 10.1139/b87-199
- Owens JN, Takaso T, John Runions C (1998) Pollination in conifers. *Trends Plant Sci* 3:479–485. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01337-5
- Pacini E, Franchi GG, Ripaccioli M (1999) Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. *Plant Syst Evol* 217:81–99. doi: 10.1007/BF00984923
- Pacini E, Hesse M (2005) Pollenkitt - Its composition, forms and functions. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 200:399–415. doi: 10.1016/j.flora.2005.02.006
- Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* 114:47–59.
- Palanivelu R, Preuss D (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol* 6:7. doi: 10.1186/1471-2229-6-7
- Pan J, Wang W, Li D, et al (2016) Gene expression profile indicates involvement of NO in *Camellia sinensis* pollen tube growth at low temperature. *BMC Genomics* 17:1–22.
- Parre E, Geitmann A (2005a) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220:582–592.
- Parre E, Geitmann A (2005b) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol* 137:274–286. doi: 10.1104/pp.104.050773
- Parton RM, Fischer-Parton S, Watahiki MK, Trewavas AJ (2001) Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes. *J Cell Sci* 114:2685–2695.
- Pasqualini S, Cresti M, Del Casino C, et al (2015) Roles for NO and ROS signalling in pollen germination and pollen-tube elongation in *Cupressus arizonica*. *Biol Plant* 59:735–744. doi: 10.1007/s10535-015-0538-6
- Penner R, Marty A, Neher E, et al (1995) *Single-Channel Recording*, 2nd edn. Springer

- Pertl H, Himly M, Gehwolf R, et al (2001) Molecular and physiological characterisation of a 14-3-3 protein from lily pollen grains regulating the activity of the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase during pollen grain germination and tube growth. *Planta* 213:132–141. doi: 10.1007/s004250000483
- Pertl H, Pöckl M, Blaschke C, Obermeyer G (2010) Osmoregulation in *Lilium* pollen grains occurs via modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity by 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 154:1921–1928. doi: 10.1104/pp.110.165696
- Pierson ES, Cresti M (1992) Cytoskeleton and Cytoplasmic Organization of Pollen and Pollen Tubes. *Int Rev Cytol* 140:73–125. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61094-3
- Pierson ES, Miller DD, Callahan D a, et al (1996) Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 174:160–73. doi: 10.1006/dbio.1996.0060
- Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJ (1998) Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod* 11:65–80. doi: 10.1007/s004970050122
- Podolyan A, Luneva O, Klimenko E, Breygina M (2021) Oxygen radicals and cytoplasm zoning in growing lily pollen tubes. *Plant Reprod* 34:103–115. doi: 10.1007/s00497-021-00403-6
- Podolyan A, Maksimov N, Breygina M (2019) Redox-regulation of ion homeostasis in growing lily pollen tubes. *J Plant Physiol* 243:153050. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153050>
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, et al (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* 174:742–51. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02042.x
- Potocký M, Pejchar P, Gutkowska M, et al (2012) NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *J Plant Physiol* 169:1654–1663. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.014
- Pottosin I, Shabala S (2014) Polyamines control of cation transport across plant membranes: Implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Front. Plant Sci.* 5:154.
- Prado AM, Colaço R, Moreno N, et al (2008) Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. *Mol Plant* 1:703–714. doi: 10.1093/mp/ssn034
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131:2707–2714. doi: 10.1242/dev.01153
- Prior N, Little SA, Boyes I, et al (2019) Complex reproductive secretions occur in all extant gymnosperm lineages: a proteomic survey of gymnosperm pollination drops. *Plant Reprod* 32:153–166. doi: 10.1007/s00497-018-0348-z
- Prior N, Little SA, Pirone C, et al (2013) Application of proteomics to the study of pollination drops. *Appl Plant Sci* 1:1300008.
- Qian D, Xiang Y (2019) Actin cytoskeleton as actor in upstream and downstream of calcium signaling in plant cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1403.
- Qin Y, Yang Z (2011) Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Semin Cell Dev Biol* 22:816–824. doi: 10.1016/j.semcd.2011.06.004
- Qu H-Y, Shang Z-L, Zhang S-L, et al (2007) Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *New Phytol* 174:524–36. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02069.x
- Qu H, Jiang X, Shi Z, et al (2012) Fast loading ester fluorescent Ca<sup>2+</sup> and pH indicators into pollen of *Pyrus pyrifolia*. *J Plant Res* 125:185–195. doi: 10.1007/s10265-011-0440-z

- Qu H, Xing W, Wu F, Wang Y (2016) Rapid and inexpensive method of loading fluorescent dye into pollen tubes and root hairs. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0152320
- Rafinska K, Zienkiewicz K, Bednarska E (2010) Pollen Transcriptome and Proteome: Molecular and Functional Analysis. *Med J Cell Biol* 2:29–58. doi: <https://doi.org/10.2478/v10052-010-0003-9>
- Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, et al (2015) GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nat Commun* 6:1–10.
- Ran JH, Shen TT, Wang MM, Wang XQ (2018) Phylogenomics resolves the deep phylogeny of seed plants and indicates partial convergent or homoplastic evolution between Gnetales and angiosperms. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Rathore KS, Cork RJ, Robinson KR (1991) A cytoplasmic gradient of Ca<sup>2+</sup> is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev Biol* 148:612–9.
- Reese RN, Roberts LW (1985) Effects of cadmium on whole cell and mitochondrial respiration in tobacco cell suspension cultures (*Nicotiana tabacum* L. var. xanthi). *J Plant Physiol* 120:123–130.
- Rehman S, Rha ES, Ashraf M, et al (2004) Does barley (*Hordeum vulgare* L.) pollen swell in fractions of a second? *Plant Sci* 167:137–142. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.03.013
- Rehman S, Yun SJ (2006) 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* 57:1315–1321. doi: 10.1093/jxb/erj106
- Reichler SA, Torres J, Rivera AL, et al (2009) Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *J Exp Bot* 60:2129–2138. doi: 10.1093/jxb/erp091
- Reiss H, Herth W, Nobiling R (1985) Development of membrane- and calcium-gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum*. *Planta* 84–90.
- Reiss HD, Herth W (1978) Visualization of the Ca<sup>2+</sup>-gradient in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum* with chlorotetracycline fluorescence. *Protoplasma* 97:373–377. doi: 10.1007/BF01276294
- Reiss HD, Nobiling R (1986) Quin-2 fluorescence in lily pollen tube: distribution of free cytoplasmic calcium. *Protoplasma* 131:244–246.
- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, et al (2013) Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. *J Exp Bot* 64:5695–5705. doi: 10.1093/jxb/ert345
- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, et al (2014) The plant stigma exudate: A biochemically active extracellular environment for pollen germination? *Plant Signal Behav*. doi: 10.4161/psb.28274
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN (2006) Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiol* 141:357 LP – 366. doi: 10.1104/pp.106.079129
- Roberts IN, Harrod G, Dickinson HG (1984) Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*. II. The fate of stigma surface proteins following pollination and their role in the self-incompatibility response. *J Cell Sci* 66:255 LP – 264.
- Robinson KM, Janes MS, Beckman JS (2008) The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc* 3:941–947. doi: 10.1038/nprot.2008.56

- Robinson KR, Messerli MA (2003) Left/right, up/down: The role of endogenous electrical fields as directional signals in development, repair and invasion. *BioEssays* 25:759–766. doi: 10.1002/bies.10307
- Rodrigo-Moreno A, Andrés-Colás N, Poschenrieder C, et al (2013) Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell Environ* 36:844–55. doi: 10.1111/pce.12020
- Rodriguez-Rosales MP, Roldan M, Belver A, Donaire JP (1989) Correlation between in vitro germination capacity and proton extrusion in olive pollen. *Plant Physiol Biochem* 27:723–728.
- Ros Barceló A (1998) Hydrogen Peroxide Production is a General Property of the Lignifying Xylem from Vascular Plants. *Ann Bot* 82:97–103. doi: 10.1006/ANBO.1998.0655
- Rounds CM, Bezanilla M (2013) Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 64:243–65. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120150
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ (2011) Propidium iodide competes with Ca(2+) to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs. *Plant Physiol* 157:175–87. doi: 10.1104/pp.111.182196
- Rozwadowski K, Zhao R, Jackman L, et al (1999) Characterization and immunolocalization of a cytosolic calcium-binding protein from *Brassica napus* and *Arabidopsis* pollen. *Plant Physiol* 120:787–797. doi: 10.1104/pp.120.3.787
- Rudall PJ, Bateman RM (2007) Developmental bases for key innovations in the seed-plant microgametophyte. *Trends Plant Sci* 12:317–326. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.004
- Rutley N, Twell D (2015) A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod.* 28:73–89.
- Rydin C, Hoorn C (2016) The Gnetales: past and present. *Grana* 55:1–4. doi: 10.1080/00173134.2015.1118530
- Sabrine H, Afif H, Mohamed B, et al (2010) Effects of cadmium and copper on pollen germination and fruit set in pea (*Pisum sativum* L.). *Sci Hortic (Amsterdam)* 125:551–555. doi: 10.1016/j.scienta.2010.05.031
- Sankaranarayanan S, Ju Y, Kessler SA (2020) Reactive Oxygen Species as Mediators of Gametophyte Development and Double Fertilization in Flowering Plants. *Front Plant Sci* 11:1199. doi: 10.3389/fpls.2020.01199
- Santiago JP, Sharkey TD (2019) Pollen development at high temperature and role of carbon and nitrogen metabolites. *Plant Cell Environ* 42:2759–2775. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.13576>
- Sassen MMA (1964) Fine structure of *Petunia* pollen grain and pollen tube. *Acta Bot Neerl* 13:175–181. doi: 10.1111/j.1438-8677.1964.tb00150.x
- Sawidis T (2008) Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 233:95–106. doi: 10.1007/s00709-008-0306-y
- Sawidis T, Reiss H (1995) Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma* 185:113–122.
- Schiøtt M, Romanowsky SM, Baekgaard L, et al (2004) A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9502–9507. doi: 10.1073/pnas.0401542101
- Scholz P, Anstatt J, Krawczyk HE, Ischebeck T (2020) Signalling pinpointed to the tip: The complex regulatory network that allows pollen tube growth. *Plants* 9:1–30. doi: 10.3390/plants9091098

- Selinski J, Scheibe R (2014) Pollen tube growth: Where does the energy come from? *Plant Signal Behav* 9:e977200-1-e977200-9. doi: 10.4161/15592324.2014.977200
- Senesi N, Senesi GS (2005) ELECTRON-SPIN RESONANCE SPECTROSCOPY. In: Hillel D (ed) *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, pp 426–437
- Serrano I, Romero-Puertas MC, Sandalio LM, Olmedilla A (2015) The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *J Exp Bot* 66:2869–2876. doi: 10.1093/jxb/erv083
- Serrano R, Cano A, Pestaña A (1985) The plasma membrane ATPase of *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 812:553–560. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90330-X](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(85)90330-X)
- Shah T, Noor MA, Hasanuzzaman M (2019) Role of Nitric Oxide in Growth Regulation and Re-orientation of Pollen Tubes. In: *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*. pp 591–608
- Shang Z, Ma L, Zhang H, et al (2005) Ca<sup>2+</sup> influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiol* 46:598–608. doi: 10.1093/pcp/pci063
- Sharma B, Bhatla SC (2013) Accumulation and scavenging of reactive oxygen species and nitric oxide correlate with stigma maturation and pollen – stigma interaction in sunflower. *Acta Physiol Plant* 35:2777–2787. doi: 10.1007/s11738-013-1310-1
- Sheng X, Zhang S, Jiang L, et al (2012) Lead stress disrupts the cytoskeleton organization and cell wall construction during *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth. *Biol Trace Elem Res* 146:86–93. doi: 10.1007/s12011-011-9212-9
- Sheoran IS, Pedersen EJ, Ross ARS, Sawhney VK (2009) Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (*Brassica napus*). *Planta* 230:779–793. doi: 10.1007/s00425-009-0983-6
- Shi J, Cui M, Yang L, et al (2015) Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. *Trends Plant Sci* 20:741–753. doi: 10.1016/j.tplants.2015.07.010
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, et al (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53:1305–1319. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1305
- Shivanna KR (2020) The Pistil: Structure in Relation to Its Function. In: *Reproductive Ecology of Flowering Plants: Patterns and Processes*. pp 41–50
- Shivanna KR, Jaiswal VS, Mohan Ram HY (1974a) Effect of cycloheximide on cultured pollen grains of *Trigonella foenum-graecum*. *Plant Sci Lett* 3:335–339. doi: 10.1016/0304-4211(74)90005-4
- Shivanna KR, Jaiswal VS, Mohan Ram HY (1974b) Inhibition of gamete formation by cycloheximide in pollen tubes of *Impatiens balsamina*. *Planta* 117:173–177. doi: 10.1007/BF00390799
- Sidorov RA, Kuznetsova EI, Pchelkin VP, et al (2016) Fatty acid composition of the pollen lipids of *Cycas revoluta* Thunb. *Grasas y aceites* 67:5. doi: DOI:<http://dxdoiorg/103989/gya0446161>
- Šírová J, Sedlářová M, Piterková J, et al (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci* 181:560–572. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.014>
- Smirnova A, Matveyeva N, Yermakov I (2013) Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics. *Plant Biol* 16:252–257. doi: 10.1111/plb.12004
- Smirnova AV, Timofeyev KN, Breygina MA, et al (2012) Antioxidant properties of the pollen exine polymer matrix. *Biophysics (Oxf)* 57:174–178. doi: 10.1134/S0006350912020224



- Somoza SC, Sede AR, Boccardo NA, Muschietti JP (2021) Keeping up with the RALFs: how these small peptides control pollen–pistil interactions in *Arabidopsis*. *New Phytol* 229:14–18. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.16817>
- Southworth D, Dickinson DB (1981) Ultrastructural changes in germinating lily pollen. *Grana* 20:29–35. doi: 10.1080/00173138109436734
- Souza EH, Carmello-Guerreiro SM, Souza FVD, et al (2016) Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. *Sci Hortic (Amsterdam)* 203:118–125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.022>
- Sowunmi MA (1968) Pollen morphology in the palmae, with special reference to trends in aperture development. *Rev Palaeobot Palynol* 7:45–53. doi: 10.1016/0034-6667(68)90015-8
- Speranza A, Crinelli R, Scoccianti V, Geitmann A (2012) Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biol* 14:64–76. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00479.x
- Speranza A, Taddei AR, Gambellini G, et al (2009) The cell wall of kiwifruit pollen tubes is a target for chromium toxicity: alterations to morphology, callose pattern and arabinogalactan protein distribution. *Plant Biol (Stuttg)* 11:179–93. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00129.x
- Staff IA, Taylor P, Kenrick J, Knox RB (1989) Ultrastructural analysis of plastids in angiosperm pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 2:70–76. doi: 10.1007/BF00191993
- Stanley RG (1971) Pollen Chemistry and Tube Growth. In: *Pollen development and physiology*. Elsevier, pp 131–155
- Steffen-Heins A, Steffens B (2015) EPR spectroscopy and its use in planta—a promising technique to disentangle the origin of specific ROS. *Front Environ Sci* 3:1–6. doi: 10.3389/fenvs.2015.00015
- Steinebrunner I, Wu J, Sun Y, et al (2003) Disruption of apyrases inhibits pollen germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:1638–1647.
- Stone LM, Seaton KA, Kuo J, McComb JA (2004) Fast pollen tube growth in Conospermum species. *Ann Bot* 93:369–378. doi: 10.1093/aob/mch050
- Stützel T, Röwekamp I (1999) Female reproductive structures in Taxales. *Flora* 194:145–157. doi: 10.1016/S0367-2530(17)30893-9
- Surso M (2018) Pollination and pollen germination in common juniper (*Juniperus communis*: Cupressaceae). *Arct Environ Res* 18:162–174. doi: 10.3897/issn2541-8416.2018.18.4.162
- Sze H, Frietsch S, Li X, et al (2006) Genomic and molecular analyses of transporters in the male gametophyte. *Plant Cell Monogr* 3:71–93. doi: 10.1007/7089\_044
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2015) *Plant physiology and development*. Sinauer Associates
- Takeuchi H, Higashiyama T (2016) Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*. *Nature* 531:245–248. doi: 10.1038/nature17413
- Tanaka I, Kitazume C, Ito M (1987) The isolation and culture of lily pollen protoplasts. *Plant Sci* 50:205–211.
- Tavares B, Moura TF, Dias PN, et al (2011) Calcium-regulated anion channels in the plasma membrane of *Lilium longiflorum* pollen protoplasts. *New Phytol* 192:45–60. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03780.x
- Taylor a R, Assmann SM (2001) Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells. *Plant Physiol* 125:329–338. doi: 10.1104/pp.125.1.329

- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:461–491. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.461
- Tekleva M V., Krassilov VA (2009) Comparative pollen morphology and ultrastructure of modern and fossil gnetophytes. *Rev Palaeobot Palynol* 156:130–138. doi: 10.1016/j.revpalbo.2008.12.007
- Tekleva M V, Polevova S V, Zavialova NE (2007) On some peculiarities of sporoderm structure in members of the Cycadales and Ginkgoales. *Paleontol J* 41:1162–1178. doi: 10.1134/S0031030107110159
- Tian HQ, Kuang A, Musgrave ME, Russell SD (1998) Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. *Planta* 204:183–192.
- Tiezzi A, Focardi S, Ciampolini F, Oresti M (1981) La componente lipidica dell'essudato stigmatico di citrus limon (L.) burm. *G Bot Ital* 115:95–101. doi: 10.1080/11263508109427999
- Tsukagoshi H (2016) Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr Opin Plant Biol* 29:57–63. doi: 10.1016/j.pbi.2015.10.012
- Tulecke W (1957) The Pollen of *Ginkgo Biloba*: In Vitro Culture and Tissue Formation. *Am J Bot* 44:602–608. doi: 10.2307/2438934
- Tuna AL, Bürün B (2002) The Effects of Heavy Metals on Pollen Germination and Pollen Tube Length in the Tobacco Plant. *Turk J Biol* 26:109–113.
- Tupý J, Řhová L (1984) Changes and growth effect of pH in pollen tube culture. *J Plant Physiol* 115:1–10.
- Tushabe D, Rosbakh S (2021) A Compendium of in vitro Germination Media for Pollen Research. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2021.709945
- Tyanova S, Temu T, Cox J (2016a) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc*. doi: 10.1038/nprot.2016.136
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al (2016b) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods*
- Van Aelst AC, Pierson ES, Van Went JL, et al (1993) Ultrastructural changes of *Arabidopsis thaliana* pollen during final maturation and rehydration. *Zygote* 1:173–179. doi: 10.1017/S096719940000143X
- Van Camp W, Inzé D, Van Montagu M (1997) The Regulation and Function of Tobacco Superoxide Dismutases. *Free Radic Biol Med* 23:515–520. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00112-3)
- Van Hemelryck M, Bernal R, Rojas E, et al (2017) A Fresh Look at Growth Oscillations in Pollen Tubes: Kinematic and Mechanistic Descriptions. In: Obermeyer G, Feijó J (eds) *Pollen Tip Growth: From Biophysical Aspects to Systems Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp 369–389
- Verhoeven T, Feron R, Wolters-Arts M, et al (2005) STIG1 Controls Exudate Secretion in the Pistil of *Petunia* and Tobacco. *Plant Physiol* 138:153 LP – 160. doi: 10.1104/pp.104.054809
- Vidali L, McKenna ST, Hepler PK (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol Biol Cell* 12:2534–2545. doi: 10.1091/mbc.12.8.2534
- Viehweger K (2014) How plants cope with heavy metals. *Bot Stud* 55:35. doi: 10.1186/1999-3110-55-35
- Vogler H, Santos-Fernandez G, Mecchia MA, Grossniklaus U (2019) To preserve or to destroy, that is the question: the role of the cell wall integrity pathway in pollen tube growth. *Curr Opin Plant Biol* 52:131–139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.002>

- Volkov AG (2012) Plant electrophysiology: Signaling and responses. Springer, Berlin Heidelberg
- von Aderkas P, Nepi M, Rise M, et al (2012) Post-pollination prefertilization drops affect germination rates of heterospecific pollen in larch and Douglas-fir. *Sex Plant Reprod* 25:215–225. doi: 10.1007/s00497-012-0193-4
- von Aderkas P, Prior NA, Little SA (2018) The evolution of sexual fluids in gymnosperms from pollination drops to nectar. *Front Plant Sci* 871:1–21. doi: 10.3389/fpls.2018.01844
- Voronkov AS, Ivanova T V. (2021) Fatty Acids Composition of the Epiphytic Ferns, *Platyserium bifurcatum* and *Asplenium nidus*, and the Terrestrial Fern, *Asplenium trichomanes*. *Am Fern J* 111:117–128. doi: 10.1640/0002-8444-111.2.117
- Voronkov AS, Ivanova T V., Kuznetsova EI, Kumachova TK (2019) Adaptations of *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) Fruits Grown at Different Altitudes. *Russ J Plant Physiol* 66:922–931. doi: 10.1134/S1021443719060153
- Wallace S, Williams JH (2017) Evolutionary origins of pectin methylesterase genes associated with novel aspects of angiosperm pollen tube walls. *Biochem Biophys Res Commun* 487:509–516. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.027
- Wang T, Liang L, Xue Y, et al (2016a) A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature* 531:241–244.
- Wang W, Sheng X, Shu Z, et al (2016b) Combined cytological and transcriptomic analysis reveals a nitric oxide signaling pathway involved in cold-inhibited *Camellia sinensis* pollen tube growth. *Front Plant Sci* 7:456.
- Wang Y-FF, Fan L-MM, Zhang WW-ZZ, et al (2004) Ca<sup>2+</sup>-permeable channels in the plasma membrane of arabidopsis pollen are regulated by actin microfilaments. *Plant Physiol* 136:3892–3904.
- Wang Y, Chen T, Zhang C, et al (2009) Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytol* 182:851–862. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02820.x
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, et al (2008) Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in arabidopsis. *Plant Physiol* 148:1201–1211. doi: 10.1104/pp.108.126375
- Wang YH, Li XC, Zhu-Ge Q, et al (2012) Nitric Oxide Participates in Cold-Inhibited *Camellia sinensis* Pollen Germination and Tube Growth Partly via cGMP In Vitro. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0052436
- Wei D-M, Qiu Y-L, Liu R-S, Tian H-Q (2010a) Calcium distribution in the stigmas and styles of lettuce (*Lactuca sativa*). In: *Annales Botanici Fennici*. BioOne, pp 361–366
- Wei LQ, Xu WY, Deng ZY, et al (2010b) Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in *Oryza sativa*. *BMC Genomics* 11:338. doi: 10.1186/1471-2164-11-338
- Weisenseel MH, Jaffe LF (1976) The major growth current through lily pollen tubes enters as K<sup>+</sup> and leaves as H<sup>+</sup>. *Planta* 7:1–7.
- Weisenseel MH, Nuccitelli R, Jaffe LF (1975) Large electrical currents traverse growing pollen tubes. *J Cell Biol* 66:556–67.
- Weisenseel MH, Wenisch HH (1980) The membrane potential of growing lily pollen. *Zeitschrift für* 235

Pflanzenphysiologie 99:313–323. doi: 10.1016/S0044-328X(80)80145-0

Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, et al (2011) Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver. *Plant Physiol* 156:404–416. doi: 10.1104/pp.110.167510

Williams CG (2009) *Conifer Reproductive Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht

Williams JH (2012) Pollen Tube Growth Rates and the Diversification of Flowering Plant Reproductive Cycles. *Int J Plant Sci* 173:649–661. doi: 10.1086/665822

Williams JH (2008) Novelty of the flowering plant pollen tube underlie diversification of a key life history stage. *Pnas* 105:11259–11263. doi: 10.1073/pnas.0800036105

Winship LJ, Rounds C, Hepler PK (2016) Perturbation Analysis of Calcium, Alkalinity and Secretion during Growth of Lily Pollen Tubes. doi: 10.3390/plants6010003

Wodehouse RP (1936) Evolution of pollen grains. *Bot Rev* 2:67–84. doi: 10.1097/00005053-193707000-00047

Wolff RL, Comps B, Marpeau AM, Deluc LG (1997) Taxonomy of *Pinus* species based on the seed oil fatty acid compositions. *Trees - Struct Funct* 12:113–118. doi: 10.1007/PL00009698

Wolffe AP (1996) Histone Deacetylase--A Regulator of Transcription. *Science* (80- ) 272:371 LP – 371. doi: 10.1126/science.272.5260.371

Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C (1998) Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392:818–821. doi: 10.1038/33929

Woollard AAD, Moore I (2008) The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr Opin Plant Biol* 11:610–619. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.09.010>

Wu J, Shang Z, Wu J, et al (2010) Spermidine oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and pollen tube growth. *Plant J* 63:1042–1053. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04301.x

Wu J, Teinebrunner I, Sun Y, et al (2007) Apyrases (Nucleoside Triphosphate-Diphosphohydrolases) Play a Key Role in Growth Control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:961–975. doi: 10.1104/pp.107.097568

Wu SZ, Bezanilla M (2018) Actin and microtubule cross talk mediates persistent polarized growth. *J Cell Biol* 217:3531–3544. doi: 10.1083/JCB.201802039

Wu X, Chen T, Zheng M, et al (2008) Integrative proteomic and cytological analysis of the effects of extracellular Ca<sup>2+</sup> influx on *pinus bungeana* pollen tube development. *J Proteome Res* 7:4299–4312. doi: 10.1021/pr800241u

Xie D-L, Zheng X-L, Zhou C-Y, et al (2022) Functions of Redox Signaling in Pollen Development and Stress Response. *Antioxidants* 11:

Xiong T, Ye F, Chen J, et al (2023) Peptide signaling in anther development and pollen-stigma interactions. *Gene* 147328.

Xiong Z-T, Peng Y-H (2001) Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 48:51–55.

Xu X, Wang W, Sun Y, et al (2021) MicroRNA Omics Analysis of *Camellia sinesis* Pollen Tubes in Response to Low-Temperature and Nitric Oxide. *Biomolecules* 11:

- Yang H, You C, Yang S, et al (2021a) The Role of Calcium/Calcium-Dependent Protein Kinases Signal Pathway in Pollen Tube Growth . *Front. Plant Sci.* 12:346.
- Yang HY (1986) Fluorescein diacetate used as a vital stain for labeling living pollen tubes. *Plant Sci* 44:59–63.
- Yang S, Liu X, He J, Liu M (2021b) Insight into Seasonal Change of Phytochemicals, Antioxidant, and Anti-Aging Activities of Root Bark of *Paeonia suffruticosa* (Cortex Moutan) Combined with Multivariate Statistical Analysis. *Mol.* 26:
- Yang Y, Ferguson DK, Liu B, et al (2022) Recent advances on phylogenomics of gymnosperms and a new classification. *Plant Divers* 44:340–350. doi: 10.1016/j.pld.2022.05.003
- Yang YL, Zhang F, He WL, et al (2003) Iron-mediated inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane vesicles isolated from wheat roots. *Cell Mol Life Sci* 60:1249–1257. doi: 10.1007/s00018-003-3093-9
- Yang Z, Lavagi I (2012) Spatial control of plasma membrane domains: ROP GTPase-based symmetry breaking. *Curr Opin Plant Biol* 15:601–607.
- Yatomi R, Nakamura S, Nakamura N (2002) Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms. *Grana* 41:21–28. doi: 10.1080/00173130260045468
- Young LCT, Stanley RG (1963) Incorporation of tritiated nucleosides thymidine, uridine and cytidine in nuclei of germinating pine pollen. *Nucleus* 6:83–90.
- Zafra A, Rejón JD, Hiscock SJ, Alché JDD (2016) Patterns of ROS accumulation in the stigmas of angiosperms and visions into their multi-functionality in plant reproduction. *Front Plant Sci* 7:1112–1119. doi: 10.3389/fpls.2016.01112
- Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché JDD (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biol* 10:1–14. doi: 10.1186/1471-2229-10-36/FIGURES/9
- Žárský V, Kulich I, Fendrych M, Pečenková T (2013) Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. *Curr Opin Plant Biol* 16:726–733.
- Zhang MJ, Zhang XS, Gao X-Q (2020) ROS in the Male–Female Interactions During Pollination: Function and Regulation. *Front Plant Sci* 11:1–8. doi: 10.3389/fpls.2020.00177
- Zhang X, Liu W, Nagae TT, et al (2017) Structural basis for receptor recognition of pollen tube attraction peptides. *Nat Commun* 8:1–9.
- Zhang X, Zhang L, Chen Y, et al (2021) Genome-wide identification of the SOD gene family and expression analysis under drought and salt stress in barley. *Plant Growth Regul* 94:49–60. doi: 10.1007/s10725-021-00695-8
- Zhang Y, McCormick S (2010) The regulation of vesicle trafficking by small GTPases and phospholipids during pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.*
- Zhao L-N, Shen L-K, Zhang W-Z, et al (2013) Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K<sup>+</sup> channels in *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Cell* 25:649–661. doi: 10.1105/tpc.112.103184
- Zheng M, Wang Q, Teng Y, et al (2010) The speed of mitochondrial movement is regulated by the cytoskeleton and myosin in *Picea wilsonii* pollen tubes. *Planta* 231:779–791. doi: 10.1007/s00425-009-1086-0

Zheng RH, de Su S, Xiao H, et al (2019) Calcium: a critical factor in pollen germination and tube elongation. *Int J Mol Sci* 20:1–12. doi: 10.3390/ijms20020420

Zhou J, Fan C, Liu K, Jing Y (2015) Extracellular ATP is involved in the initiation of pollen germination and tube growth in *Picea meyeri*. *Trees - Struct Funct* 29:563–574. doi: 10.1007/s00468-014-1135-6

Zhu H (2016) Assays for Detecting Biological Superoxide. *React Oxyg Species* 1:65–80. doi: 10.20455/ros.2016.813

Zonia L, Cordeiro S (2002) Oscillatory Chloride Efflux at the Pollen Tube Apex Has a Role in Growth and Cell Volume Regulation and Is Targeted by Inositol 3 , 4 , 5 , 6-Tetra kis phosphate. *Plant Cell* 14:2233–2249. doi: 10.1105/tpc.003830.these

Zonia L, Cordeiro S, Tupý J, Feijó JA (2002) Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-Tetrakisphosphate. *Plant Cell* 14:2233–2249. doi: 10.1105/tpc.003830.these

Zou J, Song L, Zhang W, et al (2009) Comparative proteomic analysis of arabidopsis mature pollen and germinated pollen. *J Integr Plant Biol* 51:438–455. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00823.x