

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты – ***Попова Лариса Геннадьевна***

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Ремизова Маргарита Васильевна

доктор биологических наук, старший преподаватель кафедры высших растений биологического факультета ФГБОУ ВО “МГУ имени М.В.Ломоносова”

Медведев Сергей Семёнович

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета ФГБОУ ВО СПбГУ

Защита диссертации состоится «24» мая 2024 г. в 15 часов 35 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы д.1 стр.12, ауд. М1.

E-mail dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2943>

Автореферат разослан «__» марта 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 ограничение, 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 апертурах 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).

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в работе, получены самим соискателем или при его непосредственном участии в период с 2007 по 2023 г. Автору принадлежит выбор и обоснование темы, разработка задач и методических подходов, непосредственная подготовка и анализ материала, обобщение и изложение полученных результатов. Все описания и иллюстрации в диссертации являются оригинальными или взяты в переработанном виде из работ, написанных автором.

Публикации по теме диссертации

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

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы из 501 наименования. Текст изложен на 238 страницах и содержит 80 рисунков и 10 таблиц.

Благодарности

Я бесконечно признательна моему наставнику в научной карьере Матвеевой Наталии Павловне, и с огромной благодарностью вспоминаю многолетнего руководителя нашей лаборатории профессора Ермакова Игоря Павловича. Без них этой работы бы не было. Я считаю огромным везением, что в самом начале своей научной деятельности попала в продуктивный и дружный коллектив, который работал под их руководством. Благодаря моим учителям и коллективу кафедры лаборатория стала моим вторым домом. Особую благодарность выражаю Кате Клименко, коллеге и другу, преданной лаборатории, как и я, а также Ксении Бабушкиной, которая помогала в подготовке этой работы на финальной стадии.

Благодарю моего мужа д.б.н. Колбасова Г.А. за всестороннюю поддержку и ценные советы. Я также благодарна другим членам моей семьи, которые поддерживали меня.

Я признательна всем коллегам, принимавшим участие в получении данных, в том числе, студентам, аспирантам и сотрудникам, работавших под моим руководством в период выполнения работы, а также многолетним коллабораторам с кафедры биофизики (Лунёвой О.Г.) и высших растений (Полевой С.В.), а также Абрамочкину Д.В., Воронкову А.С., Шилову Е.С., Мамаевой А.В. и другим уважаемым соавторам, благодаря которым эта работа включила в себя столько разных методов и подходов.

Студенты и аспиранты, которые являлись соавторами представленных данных:

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

Финансирование исследований:

В качестве исполнителя

- РФФИ 08-04-00746-а (2008 – 2010), 11-04-00605 (2011 – 2013)

В качестве руководителя

- РФФИ 14-04-31431мол_а (2014 – 2015), 19-04-00282а (2019 – 2021)
- РНФ 19-74-00036 (2019 – 2021), 21-74-10054 (2021 – 2024).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. Обзор литературы

Включает два основных раздела, которые посвящены начальным этапам прорастания пыльцевого зерна и полярному росту пыльцевой трубки. В первом разделе рассматриваются этапы прорастания, предшествующие полярному росту: гидратация, активация и поляризация пыльцевого зерна, отдельно освещены результаты протеомных исследований, а также особенности опыления у голосеменных растений. Первый раздел включает также основные литературные данные по следующим темам: ионная регуляция прорастания мужского гаметофита и значение активных форм кислорода. Во втором разделе рассматриваются цитологические и физиологические аспекты полярного роста пыльцевой трубки.

Глава II. Материалы и методы

Объекты исследования. Мужской гаметофит. Пыльца ели (*Picea pungens* Engelm.) с деревьев, растущих в ботаническом саду биологического факультета МГУ, пыльца срезанных растений лилии (*Lilium longiflorum* Thunb. cv. 'White Heaven') и пыльца с растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), выращенных в климатической камере. Пыльцевые зёрна и трубки использовали как для микроскопических наблюдений и измерений, так и для выделения протопластов с помощью ферментативной обработки. Протопласты использовались для проточной цитометрии, микроскопии и электрофизиологических исследований.

Экссудат рыльца. Для сбора экссудата использовали растения, произрастающие в Ботаническом саду МГУ и на территории МГУ (*Paeonia* × *suffruticosa* Andrews, *Aristolochia manshuriensis* Kom., *A. contorta* Bunge, *Berberis vulgaris* L.) и в климатической камере (*Nicotiana tabacum* L. var. Petit Havana SR1, *Lilium*, LA-гибриды var. Royal Trinity, Formose, ОТ-гибриды var. Zambesi). Экссудат собирали «методом капли».

Опылительные капли. Боковые побеги туи (*Thuja occidentalis* L.), тиса (*Taxus baccata* L.), сосны (*Pinus sylvestris* L.) и ели (*Picea pungens* Engelm.) были срезаны с растений, произраставших на территории и в Ботаническом саду МГУ.

Количественная флуоресцентная микроскопия. Измерения мембранного потенциала проводили методом количественной флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов DiBAC₄(3) и Di-4-ANEPPS, pH цитозоля регистрировали с помощью BCECF-AM, уровень внутриклеточного кальция оценивали, окрашивая клетки Fluo3.

Конфокальная микроскопия. Для картирования внутриклеточных АФК использовали разработанный соискателем метод, основанный на одновременном окрашивании MitoSOX и PFBS, особенностью которого является его высокая специфичность к H_2O_2 (Maeda et al. 2004).

Электрофорез и зимография. Электрофорез проводили по методу Леммли с использованием 5% полиакриламидного геля в качестве концентрирующего геля и 10, 12,5 или 15% ПААГ в качестве разделяющего геля. Для зимографического исследования активности ферментов редокс-гомеостаза электрофорез проводили при температуре 4°C. Гель разделяли на две части, одну из которых использовали для проявления активности соответствующих ферментов, а вторую окрашивали для оценки количества и эффективности разделения белка.

ЭПР-спектроскопия. Все работы по измерению спектров ЭПР выполнялись в соавторстве с доцентом кафедры биофизики О.Г.Лунёвой. В работе использовали два типа спиновых ловушек: DMPO для регистрации $OH\cdot$ и DEPMPO для детекции $O_2^{\cdot-}$, а также спиновый зонд из группы гидроксилamines CAT-1H для оценки суммарной генерации АФК с высокой чувствительностью.

Электронная микроскопия. Все работы со сканирующей электронной микроскопией проводились в соавторстве с с.н.с. кафедры высших растений С.В.Полевой.

Другие методические подходы а именно: проточная цитометрия протопластов, пэтч-кламп, протеомные исследования, рентгеноспектральный микроанализ, ГХ-МС жирных кислот, спектрофлуориметрия и спектрофотометрия, подробно описаны в диссертации.

Глава III. Роль АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна

Первый этап прорастания мужского гаметофита включает в себя активацию метаболизма, которая приходит на смену состоянию физиологического покоя, в котором зрелое пыльцевое зерно находится до попадания на пестик или женскую шишку. После этого происходит запуск полярного роста. Ранее в нашей лаборатории для представителя цветковых растений – табака обыкновенного – было показано, что на раннем этапе активации происходит генерация АФК, а низкие концентрации пероксида водорода стимулируют прорастание. На голосеменных растениях такие исследования не проводились.

Мы регистрировали генерацию АФК в пыльцевых зёрнах ели колючей двумя методами: спектрофотометрически с использованием внеклеточного красителя OxyBurst было выявлено достоверное увеличение количества АФК в суспензии

уже после 10 минут инкубации, которое отсутствовало при обработке пыльцевых зёрен ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодонием (ДФИ). Позже более длительные измерения проводили с использованием ЭПР спектроскопии. Неспецифический спиновый зонд ТМТ показал пиковое увеличение сигнала после 9 часов инкубации, что соответствует моменту появления пыльцевых трубок. Во время роста трубок генерация была ниже. Каталаза снижала уровень сигнала в суспензии примерно в 2 раза, что указывает на заметную долю H_2O_2 в общем содержании АФК. Таким образом, можно заключить, что пыльцевые зёрна генерируют АФК, включая H_2O_2 . Необходимо было выяснить, насколько это важно для прорастания.

Мы изучили влияние различных антиоксидантов и ингибиторов на эффективность прорастания пыльцы ели, при этом самыми эффективными оказались ДФИ и тушитель H_2O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$ MnTMPPP (Рисунок 1). Они резко снижали прорастание уже в низких концентрациях. Из этих результатов следует, что генерация АФК пыльцевыми зёрнами важна для их прорастания.

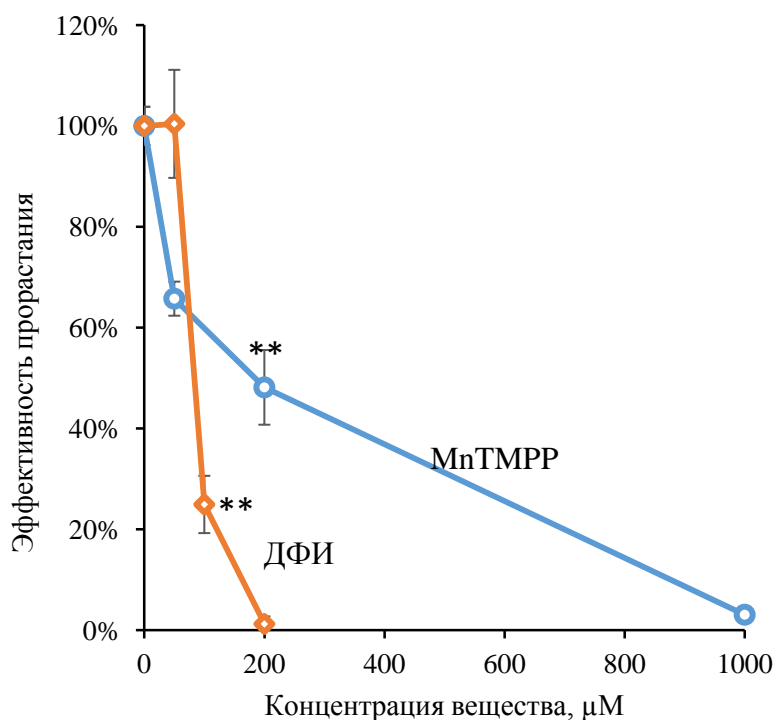


Рисунок 1 Влияние тушителя H_2O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$ MnTMPPP и ингибитора НАДФН-оксидазы ДФИ на прорастание ПЗ ели (24 часа). Значения нормированы к контролю (100%). Значимость по критерию Стьюдента: ** $P < 0,01$.

Эксперименты с действием на пыльцевые зёрна ели экзогенных АФК показали, что как пероксид водорода, так и супероксид радикал стимулируют прорастание, однако последний гораздо эффективнее: после 14 часов стимуляция составляла около 30%. В то же время $\text{O}_2^{\bullet-}$ повышал долю биполярного

прорастания, которое заключается в появлении 2 трубок из одного пыльцевого зерна. Мы впервые описали это явление, и обнаружили, что в норме доля таких зёрен составляет около 20%, его подавляет гидроксил радикал, а также избыточное или недостаточное осмотичность среды или дефицит углеводов в среде культивирования. В присутствии $O_2^{\bullet-}$ доля биполярных зёрен увеличилась более чем в 2 раза (**Рисунок 2**).

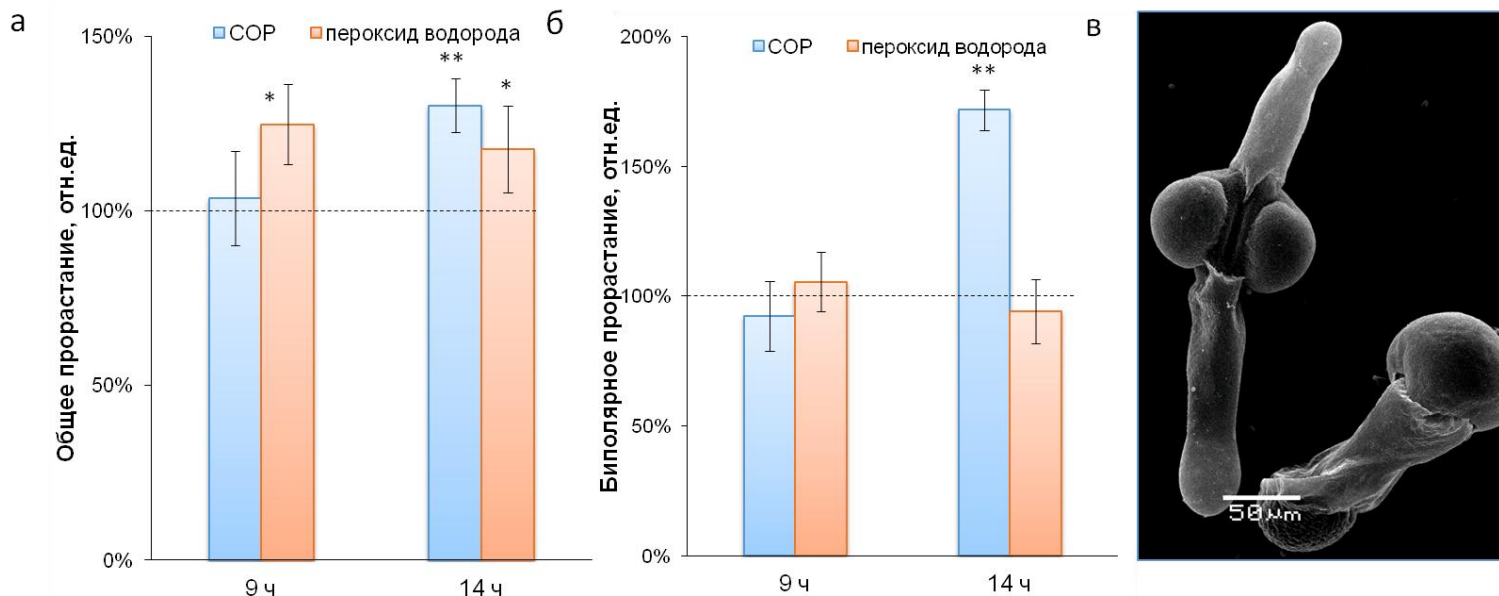


Рисунок 2 Стимуляция прорастания пыльцы *Picea pungens in vitro* H_2O_2 (100 μM) и $O_2^{\bullet-}$, сгенерированным в системе X/XO: а – общая эффективность прорастания; б – доля биполярной пыльцы (каждый результат по эффективности прорастания нормирован к контролю, отмеченному пунктирной линией). Значимость по критерию Стьюдента: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; в – сканирующая электронная микрофотография биполярно и униполярно прорастающих пыльцевых зёрен ели после 21 ч инкубации.

Таким образом, на пыльцевых зёрнах ели мы показали, что радикальные АФК могут быть не менее, а даже более эффективным воздействием на мужской гаметофит. Однако все исследования, касающиеся воздействия АФК на пыльцевые зёрна и трубки цветковых растений, до сих пор были связаны лишь с пероксидом водорода. Считалось, что, поскольку H_2O_2 – наиболее стабильная АФК, то она является значимой для пыльцы. Мы проверили это предположение на классическом модельном объекте – растущих пыльцевых трубках лилии длинноцветковой. Сравнивая H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ (генерация в системе рибофлавин/УФ) и OH^{\bullet} (генерация в реакции Фентона с $H_2O_2/FeSO_4$), мы выяснили, что первый не оказывает значимого влияния на рост трубок, второй стимулирует, а третий ингибирует рост трубок. Рост также был замедлен в присутствии тушителя АФК MnTMPPP. В обоих случаях ингибирование роста сопровождалось аномалиями: кончики трубок увеличивались в размере, формируя утолщения или шары.

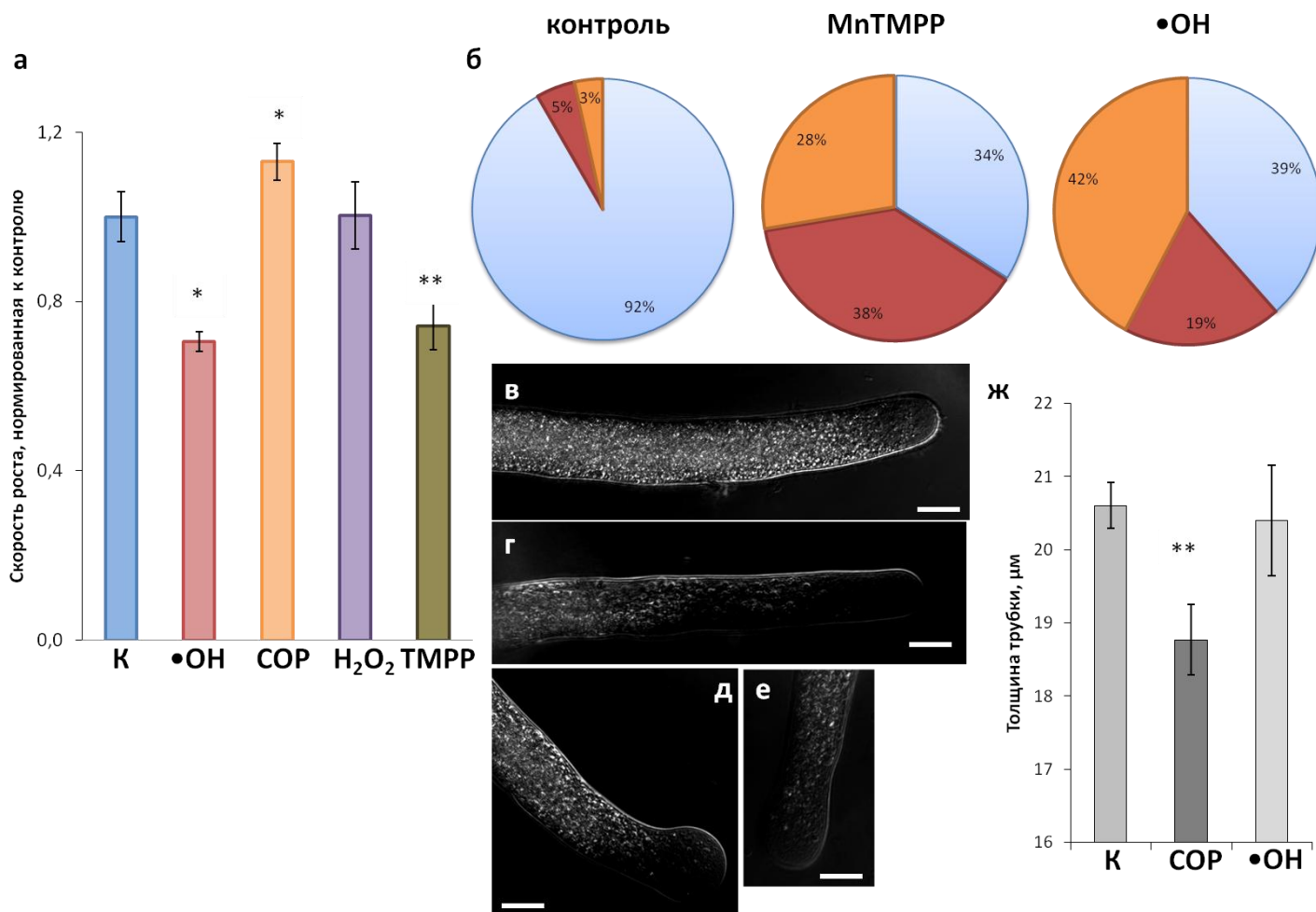


Рисунок 3 Эффект АФК на рост пыльцевых трубок лилии: а – скорость роста трубок; б-е – форма трубок, на которую влияет изменение редокс-статуса: б – средние значения для популяции трубок (голубой - нормальные трубки, красный – утолщенный кончик, оранжевый - шаровидный кончик); и Mn-TMPP, и OH• влияют 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• – «шаровидный кончик» (д); ж – средняя толщина пыльцевых трубок. Масштабная линейка – 20 мкм. Значимость по критерию Стьюдента: * P < 0,05, ** P < 0,01.

Таким образом, мужскому гаметофиту цветковых и хвойных растений свойственна чувствительность к экзогенным АФК, включая ранее неизученные радикальные АФК. При этом различные АФК оказывают на один и тот же объект противоположные или разные по силе эффекты.

Глава IV. Роль ионного транспорта в регуляции прорастания мужского гаметофита

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.

Для пыльцевых зёрен табака методами спектрофотометрии по тушению флуоресценции внеклеточного сенсора MEQ и пламенной фотометрии оценивали, соответственно, выход суммарных анионов и ионов калия в среду инкубации в процессе активации пыльцевых зёрен (**Рисунок 4**). Оказалось, что на начальный этап активации приходится массиванный выход как анионов, так и калия. 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. Исходя из полного подавления выхода анионов ингибитором NPPB – он происходит через анионные каналы. 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.

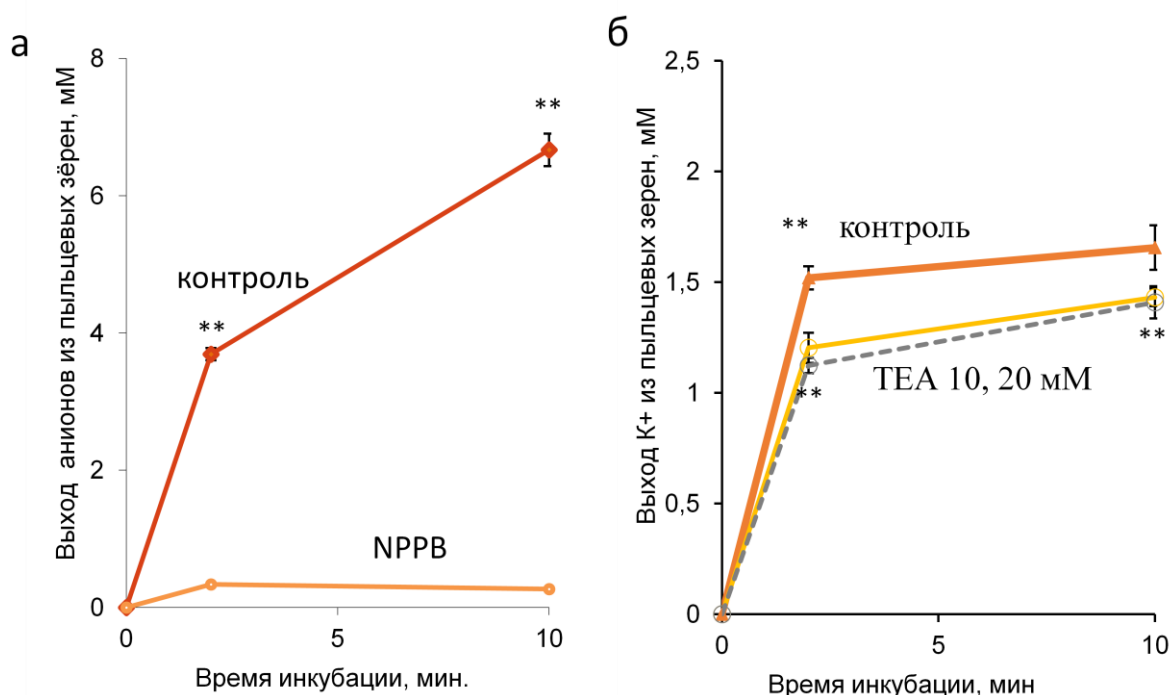


Рисунок 4. Выход суммарных анионов (а) и ионов калия (б) в среду инкубации в процессе активации пыльцевых зёрен табака. Данные спектрофотометрии по тушению флуоресценции внеклеточного сенсора MEQ (а) и пламенной фотометрии (б). Приводятся средние и стандартные ошибки, n (число суспензий) =9-11. Значимость по критерию Стьюдента: ** P < 0,01.

Подавление прорастания пыльцевых зёрен и роста трубок табака в условиях блокирования выхода анионов демонстрирует необходимость этого процесса для активации мужского гаметофита и полярного роста (**Таблица 1**).

Таблица 1 Влияние ингибитора анионных каналов NPPB (40 μM) на пыльцевые зёрна и трубки табака

Показатель	Контроль	NPPB
Эффективность прорастания, %	47 ± 2	0 ± 1
Скорость роста трубок, $\mu\text{m}/\text{ч}$	83 ± 11	1 ± 2

После выхода анионов и калия в ходе активации пыльцевых зёрен табака происходит гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки, обнаруженная оптическим методом с помощью медленного потенциал-зависимого красителя DiBAC₄(3) (**Рисунок 5а**). В контрольных пыльцевых зёрнах мембранный потенциал становится более отрицательным, в то время как в обработанных NPPB зёрнах этого не происходит. Таким образом, можно заключить, что анионные каналы в пыльцевом зерне участвуют в регуляции мембранного потенциала.

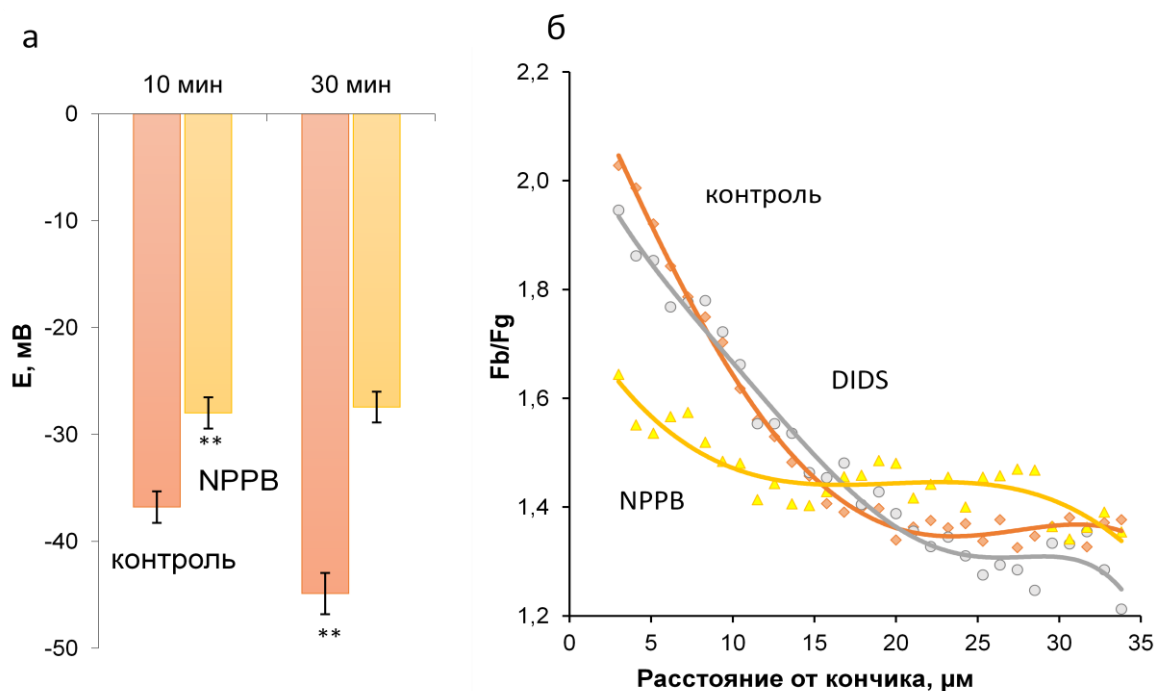


Рисунок 5 Гиперполяризация плазматической мембраны (а) и градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке (б) в процессе активации и прорастания пыльцевых зёрен табака, измеренные оптическим методом с красителем DiBAC₄(3) (а) и ратиометрическим потенциал-чувствительным зондом Di-4-ANNEPPS (б). Fb и Fg – интенсивность флуоресценции, возбуждаемой синим и зеленым светом, соответственно. Их отношение пропорционально величине мембранного потенциала (повышение означает деполяризацию). Значимость по критерию Стьюдента: ** P < 0,01.

Мембранный потенциал неравномерно распределен в пыльцевых трубках. С помощью оптического потенциал-чувствительного сенсора Di-4-ANNEPPS мы впервые обнаружили градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака: кончик был деполаризован относительно стержневой части (*Рисунок 5б*). В поддержании градиента важную роль играли анионные NPPB-чувствительные каналы, т.к. в присутствии ингибитора градиент нивелировался. В соответствии с нашими данными, в поддержании градиента участвуют и другие ион-транспортные системы, однако эффекты других ингибиторов были более локальными.

Если для цветковых растений многие параметры активации пыльцевого зерна уже были описаны, а именно: сдвиг рН в щелочную сторону и активация дыхания, в дополнение к которым мы обнаружили выход анионов и гиперполяризацию плазмалеммы, для голосеменных о процессе активации практически ничего не было известно. Мы провели исследование на пыльцевых зёрнах ели с использованием комплекса методов и выявили сходство ключевых параметров активации с таковыми у цветковых растений. Следует упомянуть, что скорость прорастания пыльцы у ели, и вообще у хвойных растений сильно отличается от цветковых. Так, появление трубок у ели при оптимальных условиях *ин витро* происходит после 9 часов инкубации, тогда как у табака короткие трубки видны уже через 50 минут. В связи с этим временные точки корректировали исходя из динамики прорастания для конкретного вида.

Динамика активации пыльцевых зёрен в целом была сходна с таковой у табака. Наиболее ранним показателем активации был выход анионов, который регистрировали уже через полчаса после начала инкубации, до начала прорастания выход анионов был уже завершён (*Рисунок 6а*). За ним следовало поглощение кислорода, достигавшее максимума в момент выхода трубок (*Рисунок 6б*), а защелачивание цитоплазмы и сдвиг рН происходили одновременно (*Рисунок 6в,г*).

Нами было установлено, что градиент мембранного потенциала присутствовал и в пыльцевых трубках ели, причем имел то же направление, что и у цветковых растений, то есть, гиперполяризацию от кончика к зерну, но более плавную форму. С помощью ингибиторного анализа мы проверили участие в поддержании потенциала несколько ключевых ион-транспортных систем, все воздействия оказались эффективными, включая ингибирование анионных каналов NPPB, калиевых каналов тетраэтиламмонием, кальций-проводящих каналов хлоридом лантана и H^+ -АТФазы ортованадатом натрия. Эффекты были сходными у табака и ели, однако у ели ортованадат полностью нивелировал градиент

мембранного потенциала, что указывает на большую роль протонной помпы в его регуляции. Действие NPPВ также было более выражено: ингибитор вызывал сильную гиперполяризацию с полным сглаживанием градиента. Похожие эффекты оказывали ингибиторы калиевых и кальциевых каналов.

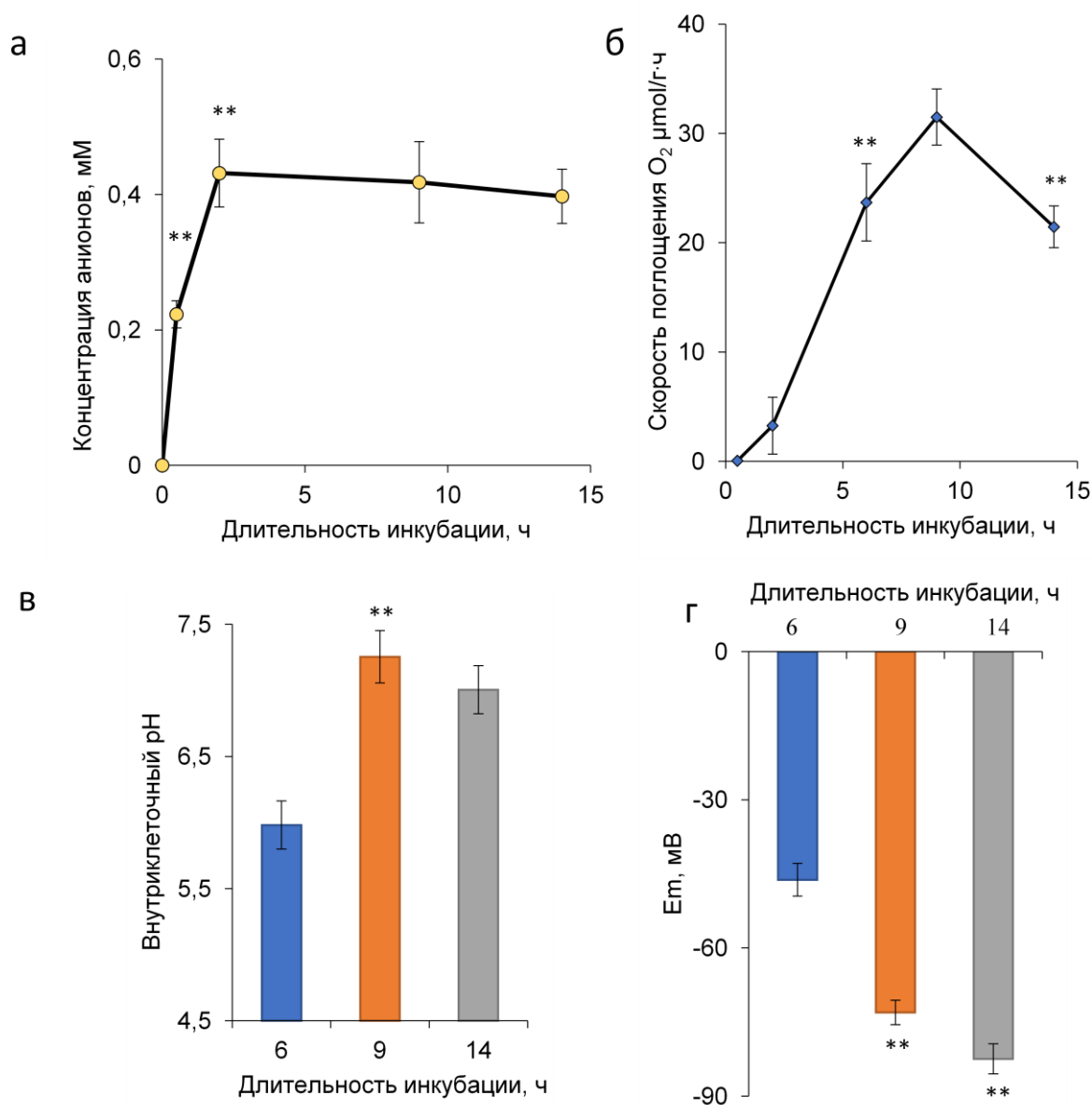


Рисунок 6 Динамика активации в пыльцевых зёрнах ели *in vitro*: выход анионов (а), изменение скорости поглощения кислорода по данным полярографии (б), внутриклеточного рН (в) и мембранного потенциала (г). Мембранный потенциал измерен оптическим методом с красителем DiBAC₄(3), анионы – с использованием внеклеточного сенсора MEQ, рН - путем окрашивания ратиометрическим красителем BCECF. Значимость по критерию Стьюдента: ** P < 0,01.

Таким образом, мы изучили функционирование ионного транспорта в процессе активации мужского гаметофита и градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке покрытосеменных и голосеменных растений.

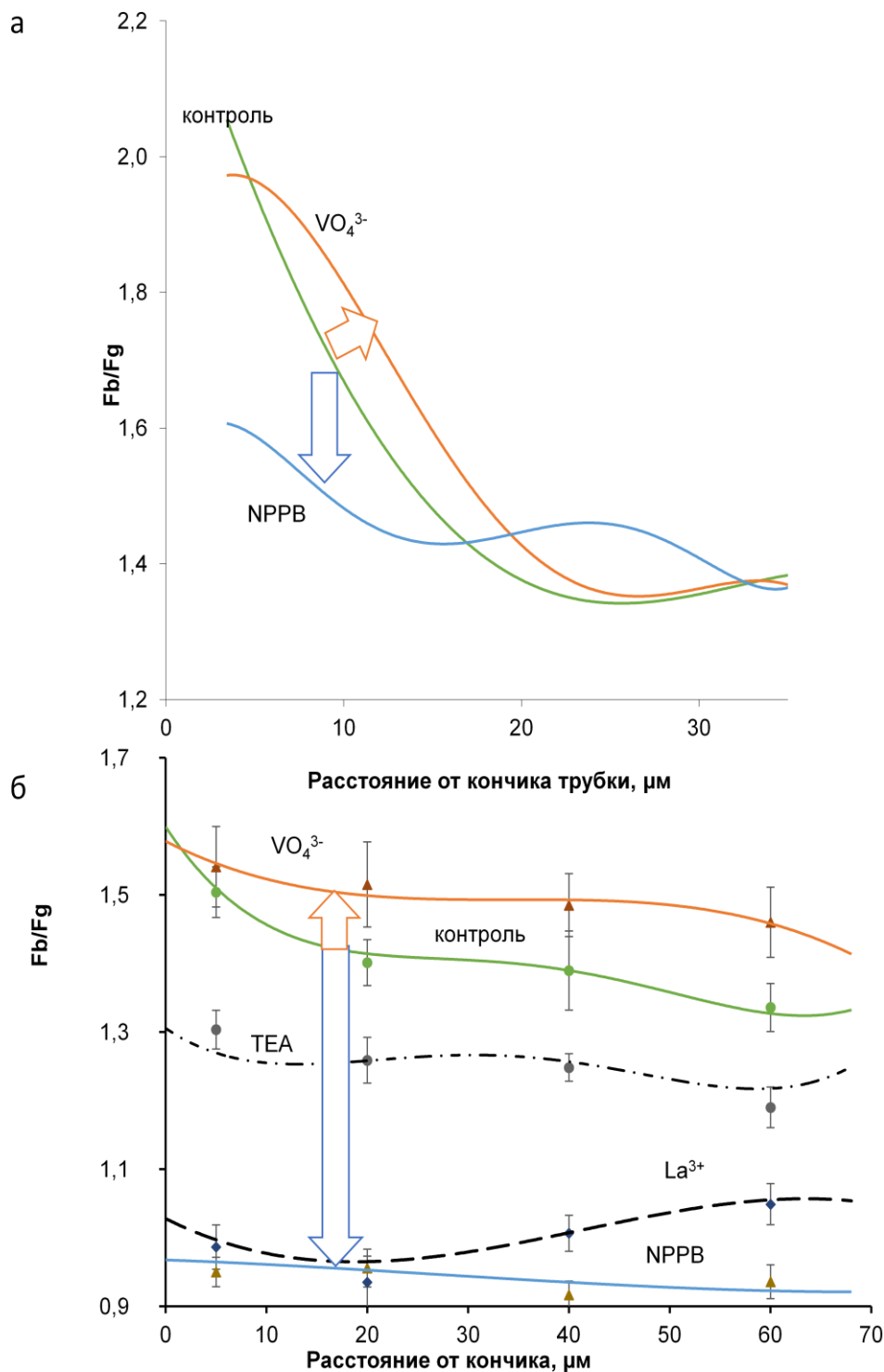


Рисунок 7 Градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака (а) и ели (б), выявленный с помощью ратиометрического красителя Di-4-ANNEPPS. Ингибиторы: NPPB – анионные каналы, ортованадат – H⁺-АТФаза, ТЕА – калиевые каналы, лантан – кальций-проводящие каналы. Приведены средние и стандартные ошибки. Fb и Fg – интенсивность флуоресценции, возбуждаемой синим и зеленым светом, соответственно.

Глава V. Влияние АФК на ионный транспорт в мужском гаметофите

Необходимо было выяснить, как на влияют АФК на мембранный потенциал и ионный транспорт в мужском гаметофите. В этих исследованиях мы применяли

две группы количественных методов и подходящие для них модельных 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.

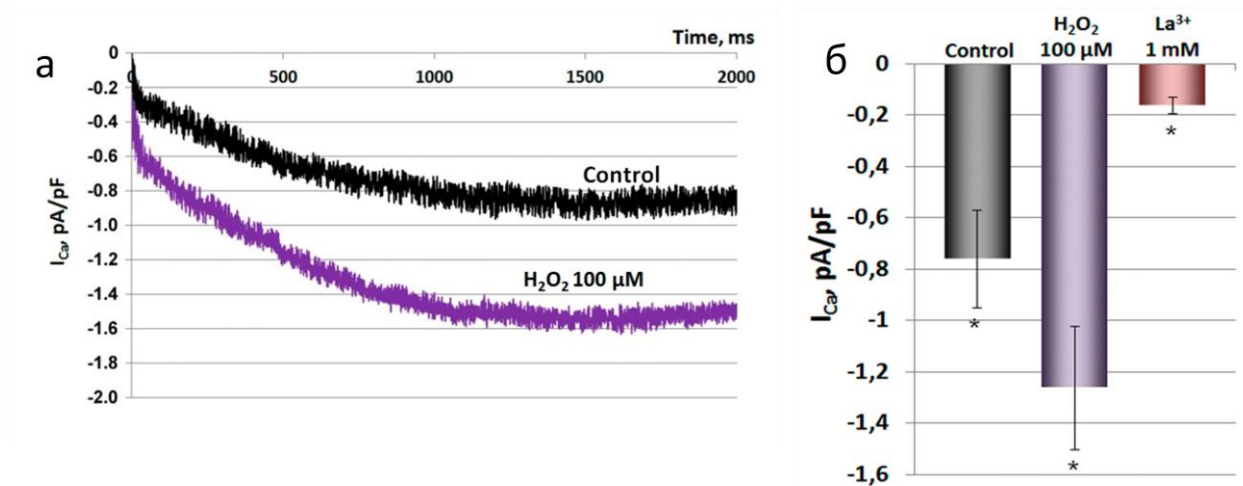


Рисунок 8 H₂O₂-индуцированное усиление входящего тока Ca²⁺ в протопластах из пыльцевых зёрен лилии по данным пэтч-кламп: а – оригинальная запись тока, б – усредненные значение тока. Данные получены в соавторстве с Абрамочкиным Д.В. Значимость по критерию Манна-Уитни: * P < 0,05.

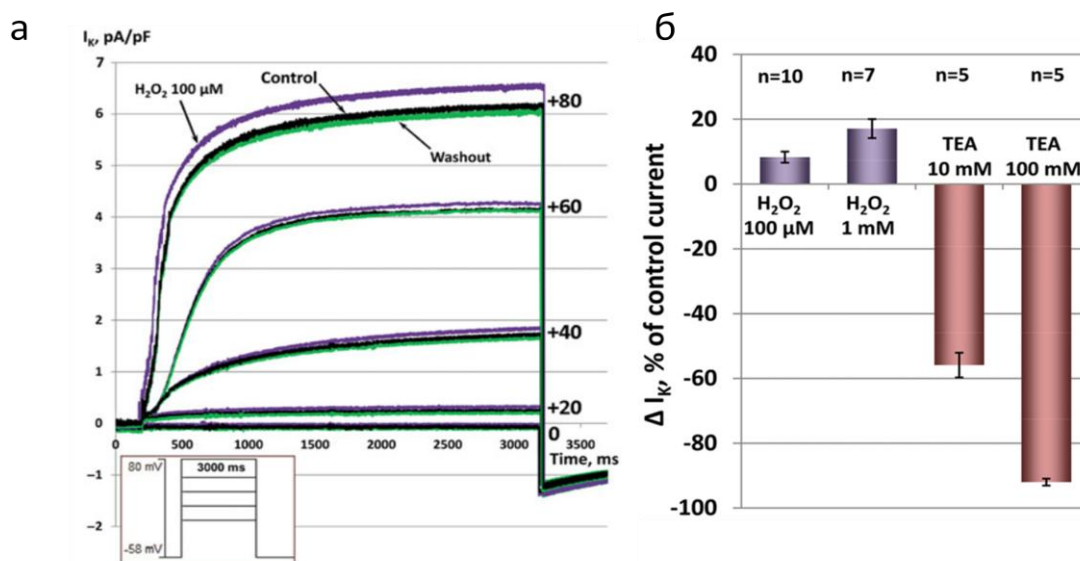


Рисунок 9 H₂O₂-индуцированное усиление выходящего тока K⁺ в протопластах из пыльцевых зёрен лилии по данным пэтч-кламп: а – оригинальная запись тока, б – усредненные значение тока. Данные получены в соавторстве с Абрамочкиным Д.В.

Для проверки влияния H₂O₂ методом пэтч-кламп в разновидности «целая клетка» измеряли токи, описанные ранее в литературе для этого объекта. Было обнаружено усиление входящего Ca²⁺ тока и выходящего тока K⁺ под действием H₂O₂ (**Рисунок 8****Рисунок 9**). Ионная специфичность тока проверялась

соответствующими ингибиторами: LaCl_3 блокировал ток Ca^{2+} (**Рисунок 8б**), ТЕА – ток K^+ (**Рисунок 9б**).

Индукцированные АФК изменения ионного транспорта были обнаружены и в другом модельном объекте: субпротопластах из пыльцевых трубок табака: $10\ \mu\text{M}$ пероксида водорода вызывал повышение цитоплазматического уровня Ca^{2+} по данным окрашивания флуоресцентным Ca^{2+} -чувствительным красителем Fluo-3, которое было заблокировано в присутствии ингибитора Ca^{2+} -проводящих каналов нифедипина (**Рисунок 10а**). Та же концентрация пероксида водорода индуцировала гиперполяризацию мембраны по данным окрашивания флуоресцентным потенциал-чувствительным красителем Di-4-ANEPPS (**Рисунок 10б**).

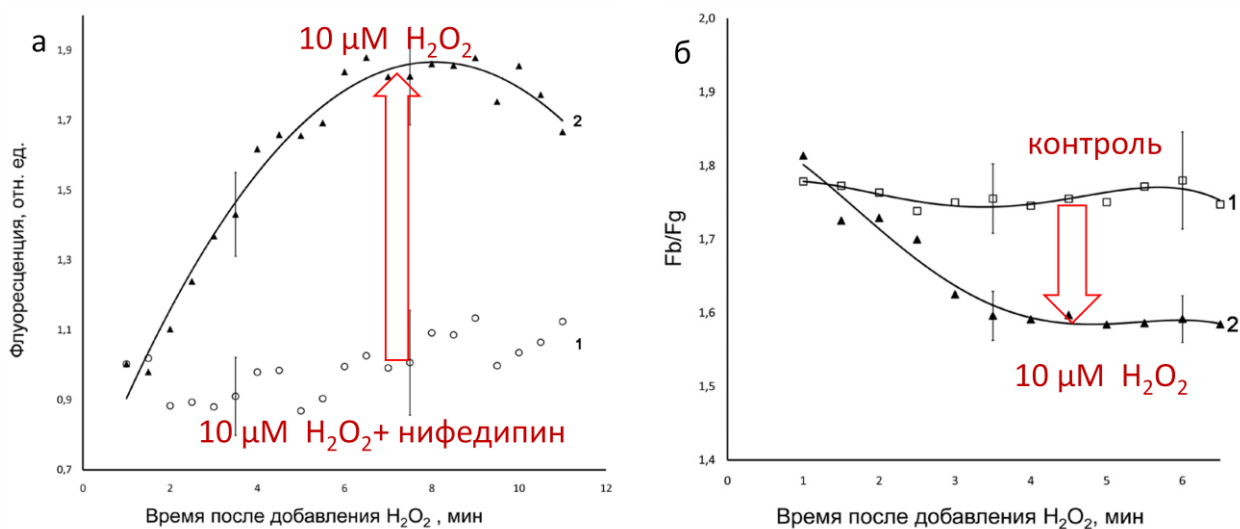


Рисунок 10 H_2O_2 -индуцированные эффекты в субпротопластах из пыльцевых трубок табака (в): вход Ca^{2+} через нифедипин-чувствительные каналы по данным окрашивания флуоресцентным Ca^{2+} -чувствительным красителем Fluo-3 (а) и гиперполяризация мембраны по данным окрашивания флуоресцентным потенциал-чувствительным красителем Di-4-ANEPPS (б).

Сравнивая описанные выше данные, полученные на протопластах из мужского гаметофита двух видов растений, можно заключить, что для лилии эффекты вызывали на порядок более высокие концентрации пероксида водорода по сравнению с табаком, то есть, мужской гаметофит табака был к H_2O_2 на порядок более чувствителен. В связи с этим, а также учитывая влияние радикальных АФК на рост пыльцевых трубок лилии, мы протестировали влияние $\text{O}_2^{\cdot-}$ и $\text{OH}\cdot$ на градиенты, ассоциированные с полярным ростом и ионным транспортом.

Так, мы исследовали влияние АФК на градиент рН, который оценивали с помощью ратиометрического окрашивания BCECF-AM (**Рисунок 11а**). Мы показали, что в присутствии H_2O_2 в концентрации $100\ \mu\text{M}$ градиент достоверно не меняется, при $1\ \text{mM}$ исчезает «щелочная полоса», обусловленная активностью

протонной помпы. Вероятно, этот результат связан с активацией кальциевых каналов, которую мы ранее описали (*Рисунок 8*), и входом кальция в трубки. $O_2^{\bullet-}$, напротив, вызывал защелачивание по всей длине трубки при сохранении градиента рН, что, по-видимому, указывает на активацию H^+ -АТФазы. С этим согласуются данные о влиянии АФК на градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках лилии. В этих экспериментах было обнаружено, что супероксид радикал вызывает гиперполяризацию в пыльцевых трубках, в то время как гидроксид радикал вызывал деполяризацию мембраны (*Рисунок 12*), что согласуется с остановкой и нарушением полярности роста трубок (*Рисунок 3*).

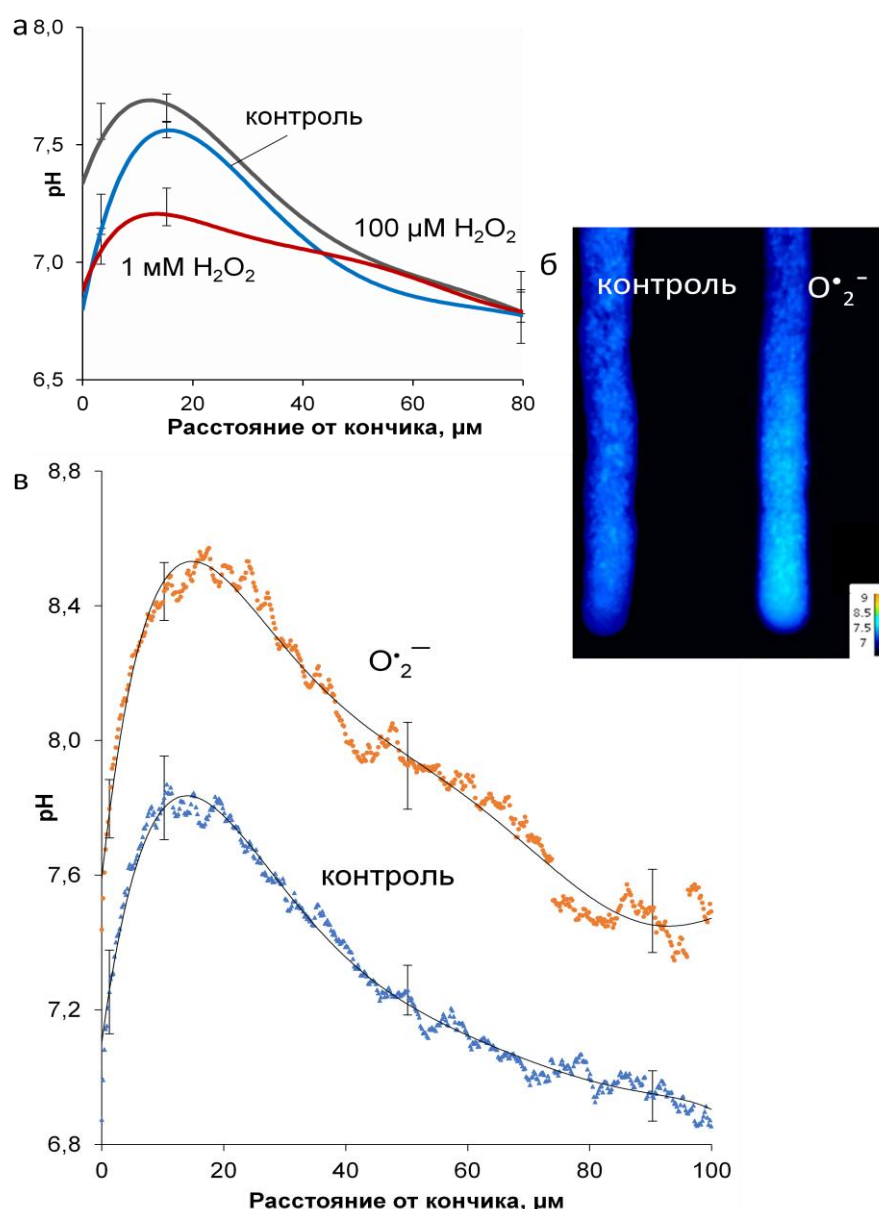


Рисунок 11 Градиент рН цитоплазмы в пыльцевых трубках лилии, на который влияет $O_2^{\bullet-}$, оценивали с помощью ратиометрического окрашивания BCECF-AM. а – типичное рН-чувствительное окрашивание пыльцевых трубок, LUT (псевдоцвет). б – кривые, полученные в результате обсчета градиентов для 15-20 трубок, и стандартные ошибки.

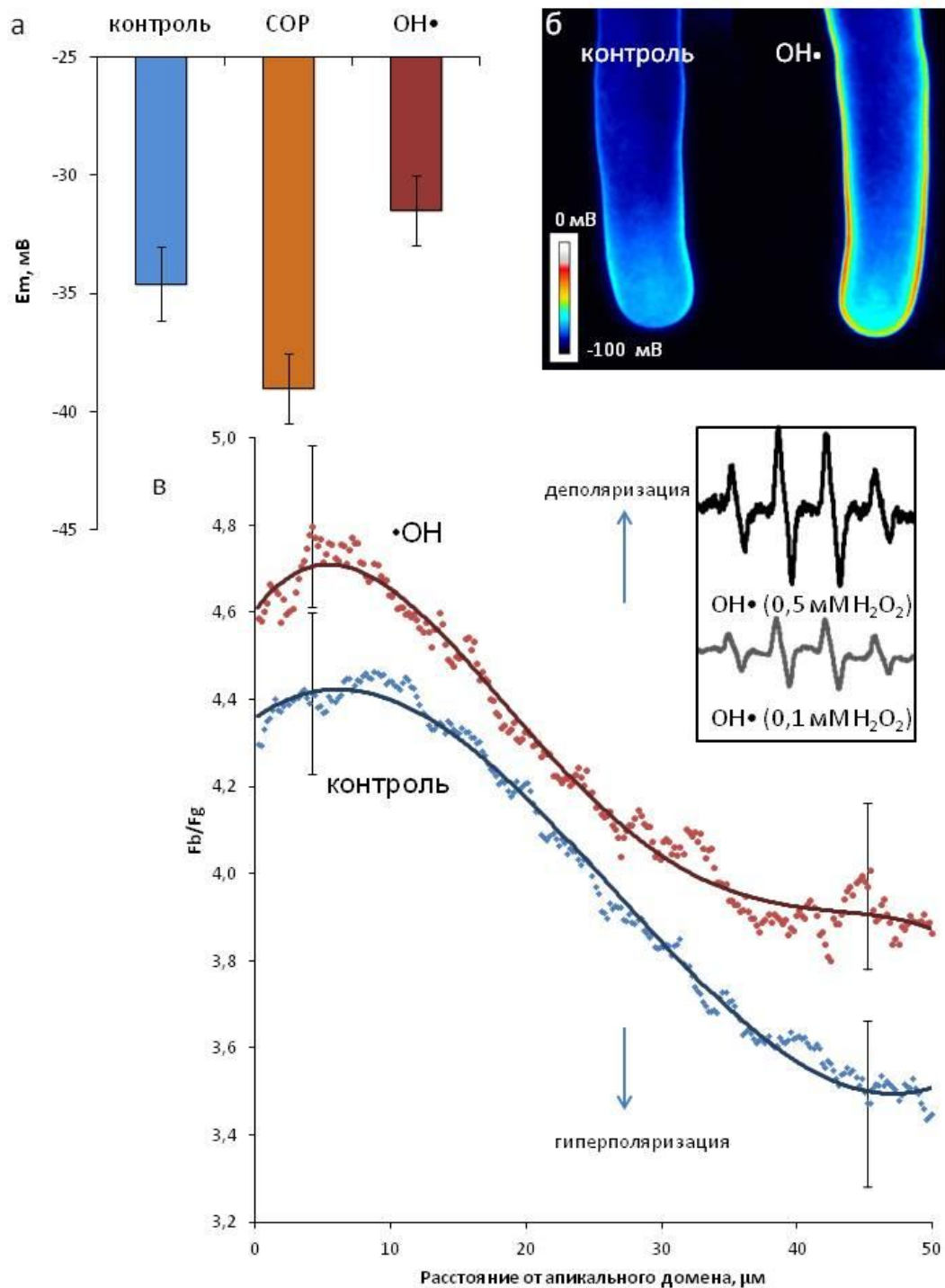


Рисунок 12 Мембранный потенциал в пыльцевых трубках лилии, оцененный с помощью ратиометрического окрашивания Di-4-ANEPPS и цитоплазматического окрашивания DiBAC₄(3). а – $\text{O}_2^{\cdot-}$ и $\text{OH}\cdot$ оказывают противоположное влияние на мембранный потенциал в пыльцевых трубках лилии (DiBAC₄(3)); б, в – в контрольных трубках имеется латеральный градиент (Di-4-ANEPPS). б – типичное окрашивание пыльцевых трубок Di-4-ANEPPS, псевдоцвет; в – усредненные кривые 15-20 трубок. Врезка – уровень продукции $\text{OH}\cdot$, оцененный методом ЭПР со спиновой ловушкой DMPO.

Суммируя полученные данные, 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.

На основании полученных данных мы предположили, что у разных видов растений ведущей 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, а $\bullet OH$ – 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 , а также стимуляция прорастания пыльцы табака пероксидом водорода 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, полученные в сотрудничестве с лабораторией протеомики ИБХ РАН. 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

Продукция АФК пестиком может быть задокументирована 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.

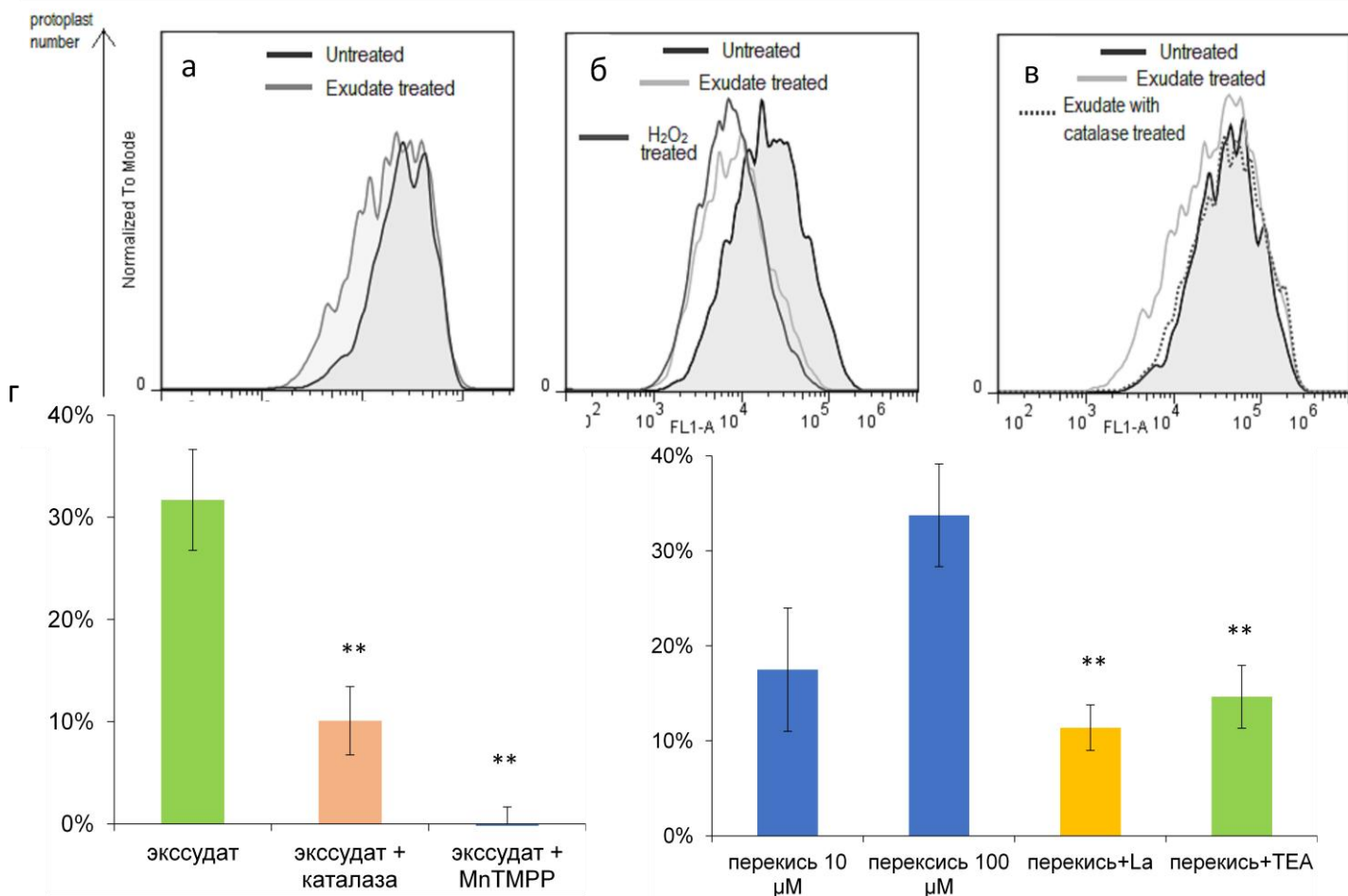


Рисунок 13 Гиперполяризация (ГП) протопластов из пыльцевых трубок табака в присутствии экссудата рыльца табака. а-в – флуоресценция протопластов, окрашенных DiBAC₄(3). Снижение интенсивности флуоресценции отражает ГП; После обработки каталазой экссудат утратил способность вызывать ГП (в); г, д – средняя ГП для всех опытов (изменения интенсивности флуоресценции, нормированные к контролю) в присутствии экссудата (г) без или с каталазой/MnTMP; (д) в присутствии H₂O₂ с или без блокаторов кальций-проводящих каналов LaCl₃ и калиевых каналов TEA. Для тестирования ингибиторов использовали 100 μM H₂O₂. Значимость по критерию Стьюдента: ** P < 0,01. Данные получены в соавторстве с Е.С. Шиловым.

Применение модельной системы – субпротопластов из пыльцевых трубок табака – позволило использовать проточную цитометрию и выявить в большой популяции гиперполяризацию плазмалеммы под действием экссудата рыльца (Рисунок 13а,г). Эффект был сходен с тем, который ранее был показан нами для пероксида водорода (Рисунок 10). Для проверки значимости H₂O₂ в составе экссудата сравнивали чистый экссудат рыльца и экссудат, обработанный каталазой

и тушителем АФК MnTMPРР. После такой обработки эксудат не вызывал гиперполяризацию (**Рисунок 13в,г**). Для проверки гипотезы об участии катионных каналов в передаче сигнала АФК тестировали влияние на субпротопласты H_2O_2 в комбинации с ингибиторами кальций-проводящих и калиевых каналов (**Рисунок 13д**). Мы показали, что эффект $100 \mu M H_2O_2$ и эксудата совпадает (**Рисунок 13б**), 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.

Гиперполяризация в ответ на эксудат рыльца выявлялась и в интактных пыльцевых трубках табака с помощью ратиометрического окрашивания Di-4-ANEPPS и количественной флуоресцентной микроскопии, что подтвердило актуальность данных, полученных на упрощённой модельной системе – протопластах (**Рисунок 14**).

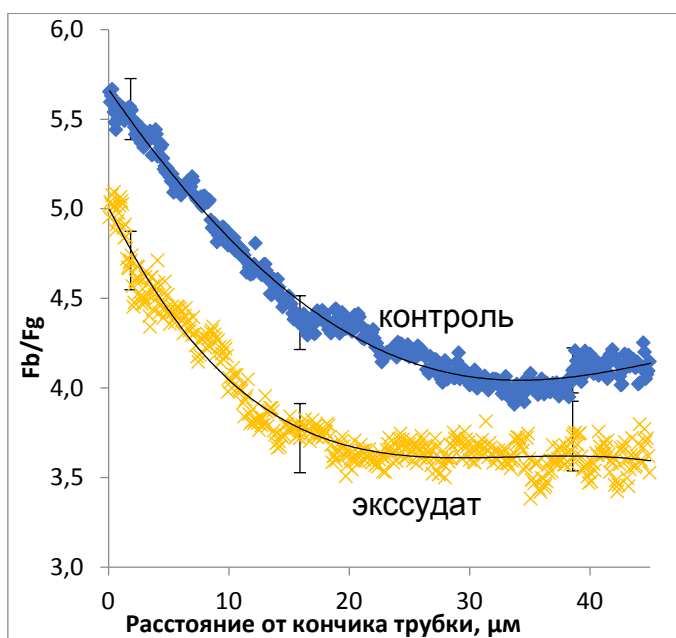


Рисунок 14 Гиперполяризация мембраны в пыльцевых трубках табака под действием эксудата фертильного рыльца (стадия III), выявленный с помощью окрашивания Di-4-ANEPPS. Приводятся средние и стандартные ошибки, $n=15$.

Анализ содержания АФК в эксудате сначала проводили неспецифическим методом с помощью АФК-чувствительного красителя DCFH (**Рисунок 15а**), затем уже специфически с помощью цветной реакции на H_2O_2 с ксиленоловым оранжевым (**Рисунок 15б**). Общий уровень АФК в эксудате ожидаемо снижался при обработке MnTMPРР, а концентрация пероксида водорода - в присутствии каталазы и аскорбиновой кислоты.

Таким образом, можно заключить, что в рыльцевом эксудате табака присутствует H_2O_2 и он важен для физиологии мужского гаметофита *semi-in-vivo*.

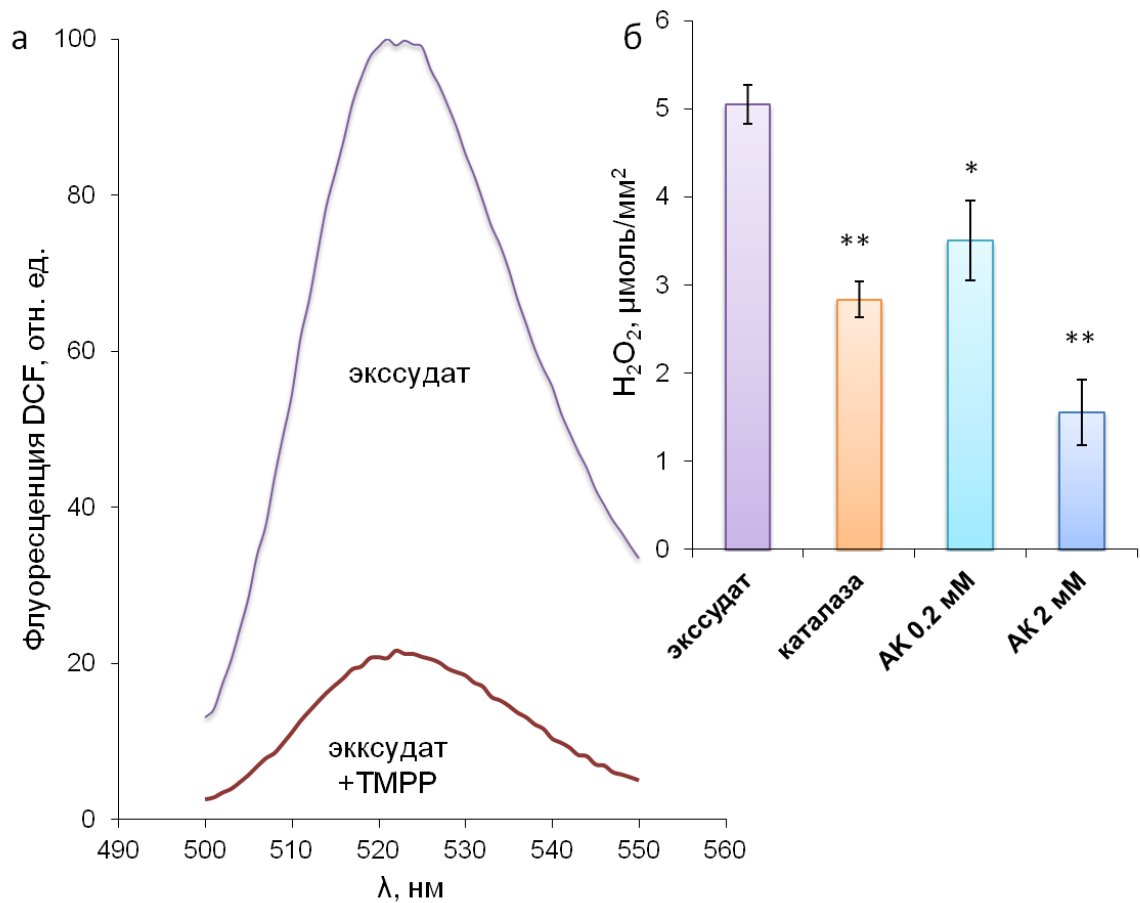


Рисунок 15 Спектрофлуориметрическое определение общего уровня АФК с помощью внеклеточной формы красителя DCF (а) и спектрофотометрическое определение содержания H₂O₂ в рыльцевом экссудате табака методом FOX1 (б): а – характерный спектр флуоресценции DCF после инкубации в экссудате в отсутствии и присутствии тушителя АФК; б – усредненные данные для экссудата без и с добавлением каталазы и аскорбиновой кислоты (АК). Значимость по критерию Стьюдента: * P < 0,05, ** P < 0,01.

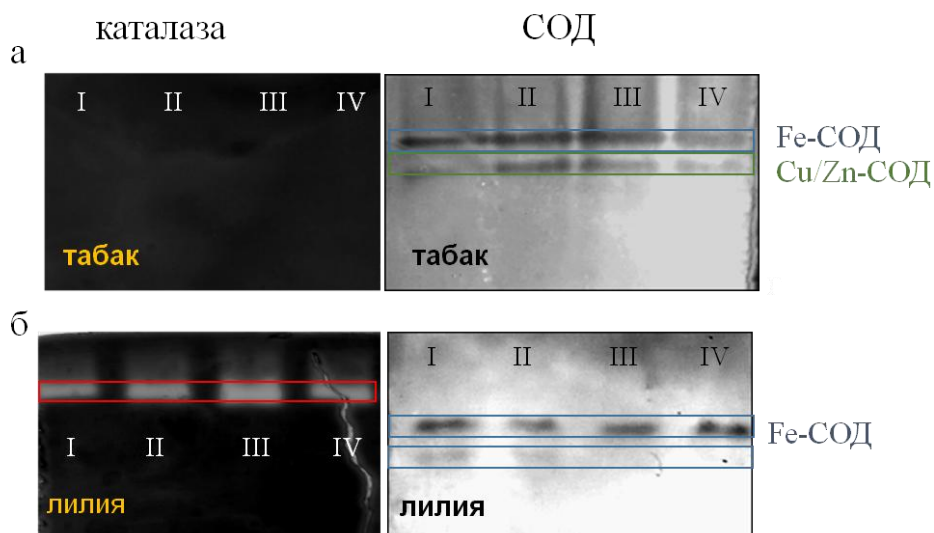


Рисунок 16 Зимографическое определение активности ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в белковых экстрактах рыльцев табака (а) и лилии (б). Номер дорожки соответствует стадии развития рыльца.

Результаты, полученные в упрощенных модельных системах, необходимо было проверить на интактных растениях. Для этого нами была разработана система контролируемого опыления *in vivo*. Чтобы воздействовать на баланс АФК максимально бережно, с помощью зимографического метода мы определили активность ферментов редокс-метаболизма в рыльце табака и лилии. Мы исследовали динамику развития пестика начиная от ювенильной стадии, когда цветок закрыт (I стадия), и заканчивая зрелым рыльцем, которое контактирует с пылью (III стадия). Промежуточную стадию мы назвали пре(д)-зрелостью (II стадия). Оказалось, что каталаза в рыльце табака не активна на всех стадиях развития пестика, в то время как у лилии ее активность высока, особенно на стадии фертильности (**Рисунок 16**). Активность СОД наблюдается у обоих видов, причем у табака активны два изофермента: Fe- и Cu/Zn-СОД (**Рисунок 16а**).

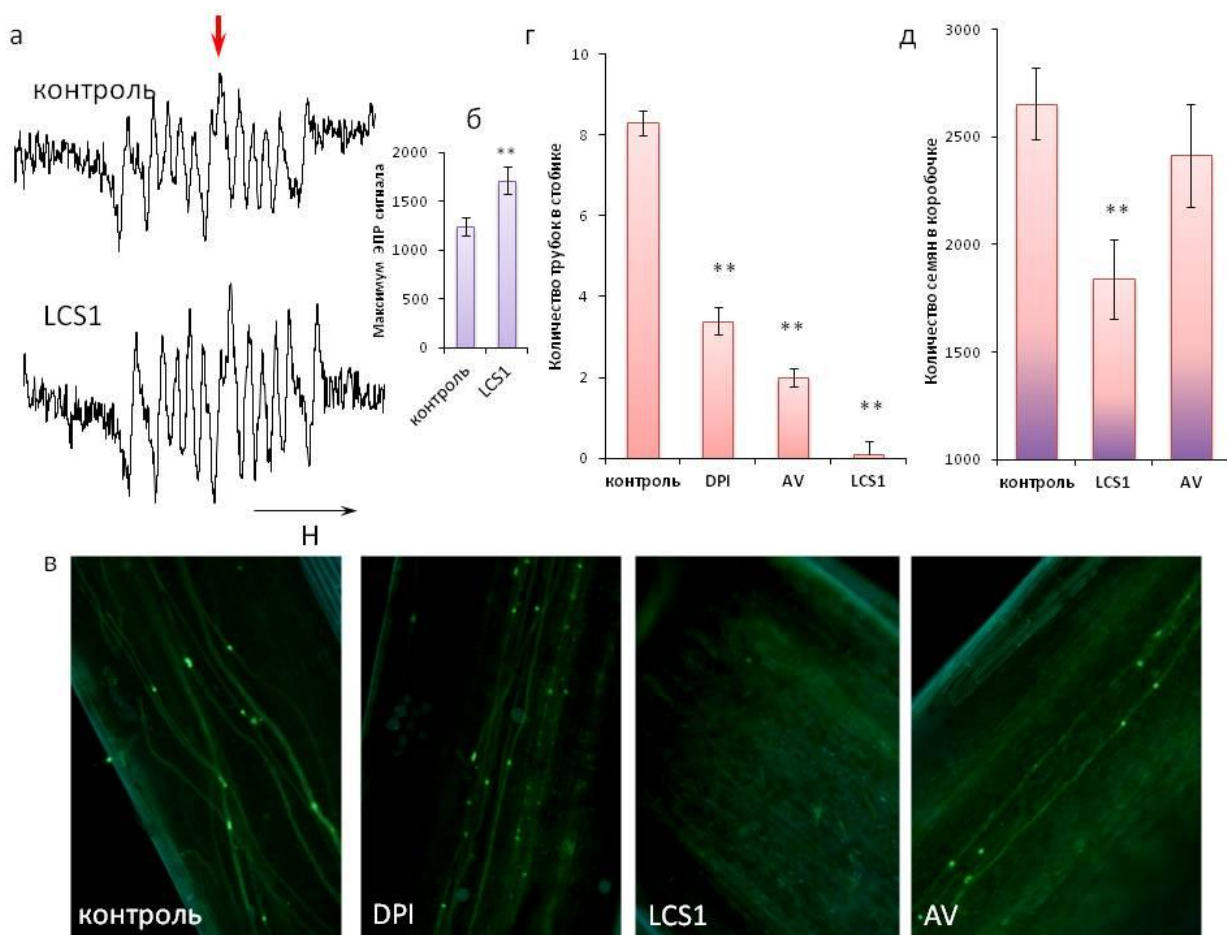


Рисунок 17 Значение баланса АФК на рыльце для скорости и эффективности прорастания пыльцы *in vivo*. а – типичные сигналы ЭПР экссудата рыльца контрольного цветка и цветка, обработанного LCS1; б – усредненные значения сигналов ЭПР (второй пик, указан стрелкой), n=6; в – типичные срезы столбиков через 30 мин после опыления (ПО), пыльцевые трубки окрашены анилиновым голубым, ДФИ и АВ – ингибиторы НАДФН-оксидазы, LCS1 – ингибитор Cu/Zn-СОД; г – среднее количество трубок в столбике через 30 мин ПО; д – среднее количество семян в коробочке. Значимость по критерию Стьюдента: ** P < 0,01.

Воздействуя на рыльце табака специфичным ингибитором Cu/Zn-СОД LCS1, мы смещали баланс АФК на рыльце в сторону супероксид радикала, что было подтверждено измерениями ЭПР (**Рисунок 17а,б**). Поскольку вторая изоформа СОД оставалась активной, H_2O_2 присутствовал на рыльце, однако его уровень был ниже, чем в контроле. Это приводило к резкому снижению скорости роста пыльцевых трубок – после получасового наблюдения они не детектировались в средней части столбика пестика (**Рисунок 17в,г**). Подсчёт количества семян в коробочках показал, что ингибитор СОД снизил его почти в 2 раза, то есть, баланс между двумя АФК имеет первостепенное значение для эффективности опыления *in vivo* (**Рисунок 17д**). Ингибиторы НАДФН-оксидазы ДФИ и ацетованиллон также снижали число трубок в столбике, однако число семян достоверно не отличалось от контроля: по-видимому, снижение генерации АФК замедляло рост трубок, но их количество оказывалось достаточно для оплодотворения семязпочек.

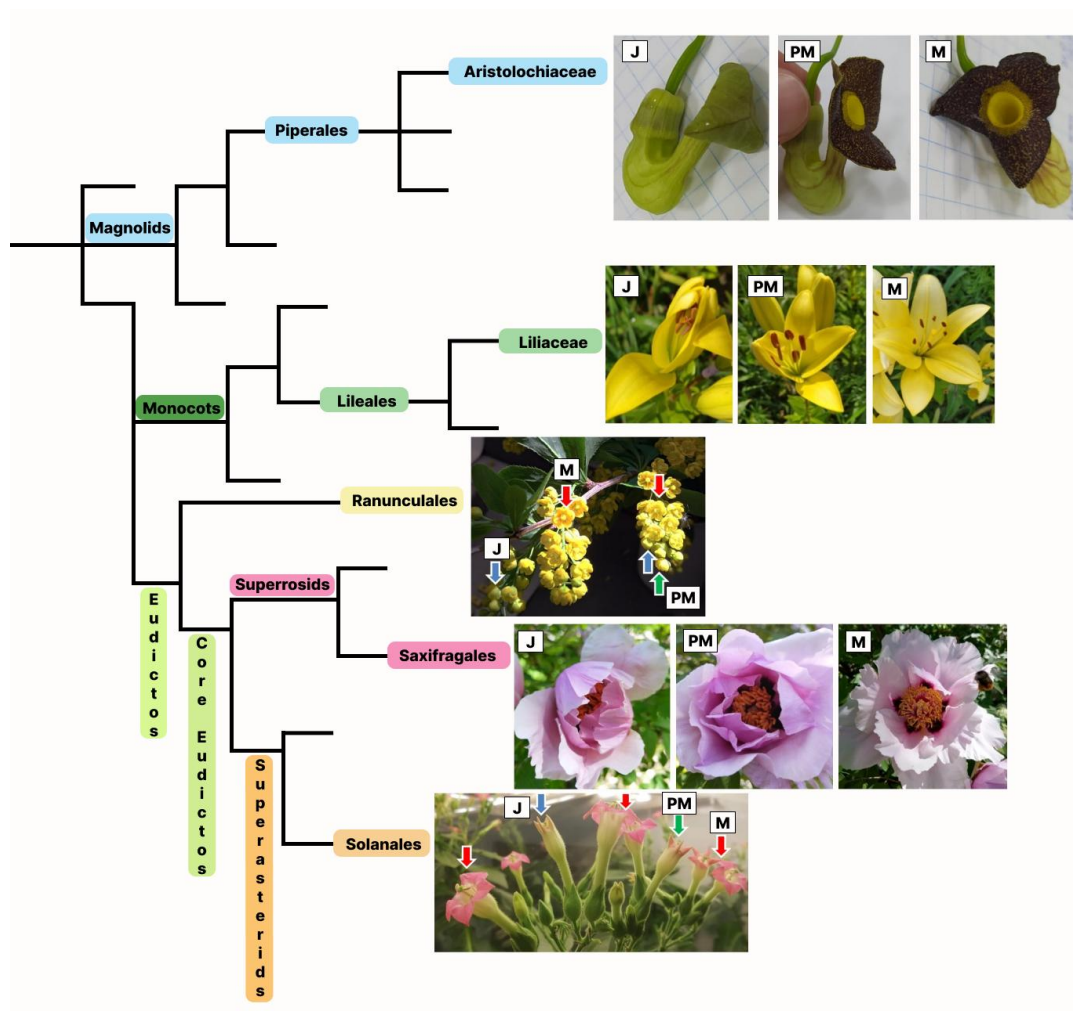


Рисунок 18 Систематическое положение изучаемых видов цветковых растений в соответствии с филогенией растений (APG IV). Различные стадии развития цветка, взятые для анализа, показаны для крупных цветков на отдельных изображениях (кирказон, лилия, пион), для мелких – стрелками (барбарис, табак): синими стрелками – ювенильная стадия, зелеными – пред-зрелая, красный – зрелая.

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 (**Рисунок 18**).

Методом ЭПР с применением неспецифического спинового зонда мы оценили суммарную генерацию АФК в экссудате разных растений в процессе развития (**Рисунок 19**). У всех видов уровень АФК повышался при переходе к фертильной стадии, однако наиболее резкое повышение наблюдалось у кирказона, у остальных видов повышение было плавным или начиналось раньше, ещё на ювенильных рыльцах, а позже замедлялось или прекращалось. Наиболее ранний подъем уровня АФК был характерен для табака.

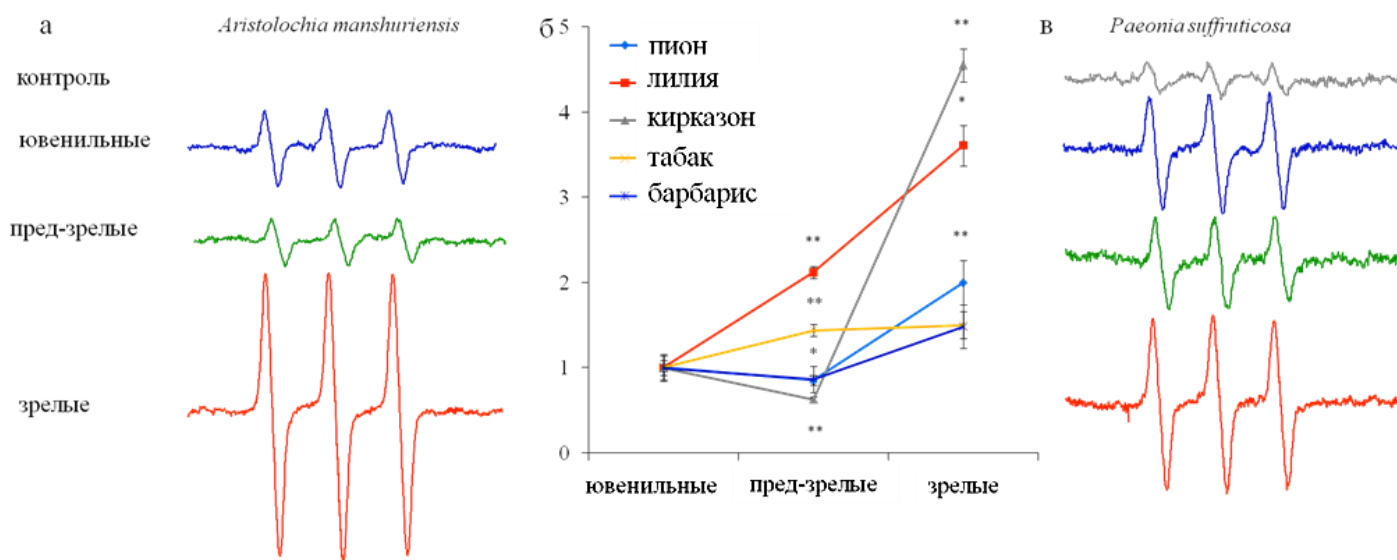


Рисунок 19 Динамика общего содержания АФК в рыльцевом экссудате, выявленная методом ЭПР спектроскопии с использованием неспецифического зонда САТ1Н, для растений из разных систематических групп: а, в - примеры характерных спектров, б – обшчёт средних максимумов ЭПР. Значимость по критерию Стьюдента: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Измерения концентрации пероксида водорода в экссудате позволили не только увидеть динамику для каждого вида, но и оценить общий уровень пероксида на рыльце (**Таблица 2**). Наибольшие значения были характерны для табака, далее по убыванию значений располагается пион, далее барбарис, что соответствует систематическому положению этих растений от наиболее

дивергентным к более базальным. У лилии и кирказона уровень H_2O_2 был на пределе чувствительности метода, что указывает на преобладание супероксид радикала среди АФК на пестике этих растений. В соответствии с этим у кирказона отсутствовала активность СОД, а у лилии СОД присутствовала, однако ее активность компенсировалась высоким уровнем каталазы, что было установлено нами ранее (*Рисунок 16*). Таким образом, более продвинутым признаком у двудольных растений можно считать преобладание пероксида водорода над супероксид радикалом и более ранняя генерация АФК в процессе развития цветка. Базальным признаком является доминирование $O_2^{\bullet-}$. О разнообразии паттернов АФК у однодольных растений мы пока что судить не можем, эта работа продолжается с привлечением новых видов.

Таблица 2 Концентрации H_2O_2 в в смыве с рылец различных растений, μM

стадия развития рыльца	табак, n=8	пион, n=6	лилия, n=6	кирказон, n=5	барбарис, n=5
ювенильное	348.9±10.6	262±0.2	26.2±1.2	41.0±7.4	97.7±2.9
пре-зрелое	239.5±4.0	122.3±6.7	44.8±3.2	29.8±1.7	41.1±10.5
зрелое	158.9±5.1	73.9±6.6	69.3±3.1	23.6±4.8	61.6±12.3

Расширяя круг объектов для анализа рецептивных жидкостей, мы впервые проанализировали уровень АФК в опылительных каплях хвойных растений методом ЭПР спектроскопии и спектрофотометрии. На *Рисунок 20* представлены женские шишки в период фертильности. опылительная капля – внеклеточный секрет, который продуцирует нуцеллус семязпочки на поверхность женской шишки для захвата пыльцы, однако эта жидкость может выполнять ряд параллельных функций, таких, как защита от заражения.

Применение ранее разработанного методического подхода к изучению опылительных капель голосеменных растений показало, что суммарные АФК есть во всех опылительных каплях (*Рисунок 21а, Рисунок 22а*). При этом у тиса, ели и сосны преобладающей формой является супероксид радикал (*Рисунок 21б*), а H_2O_2 в детектируемых концентрациях отсутствует (*Рисунок 22б*). У туи, напротив $O_2^{\bullet-}$ не выявляется, а уровень H_2O_2 довольно высок. 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.



Рисунок 20 Женские шишки изучаемых видов. Боковые побеги 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. Масштабная линейка – 1 мм (б), 5 мм (а, в-е).

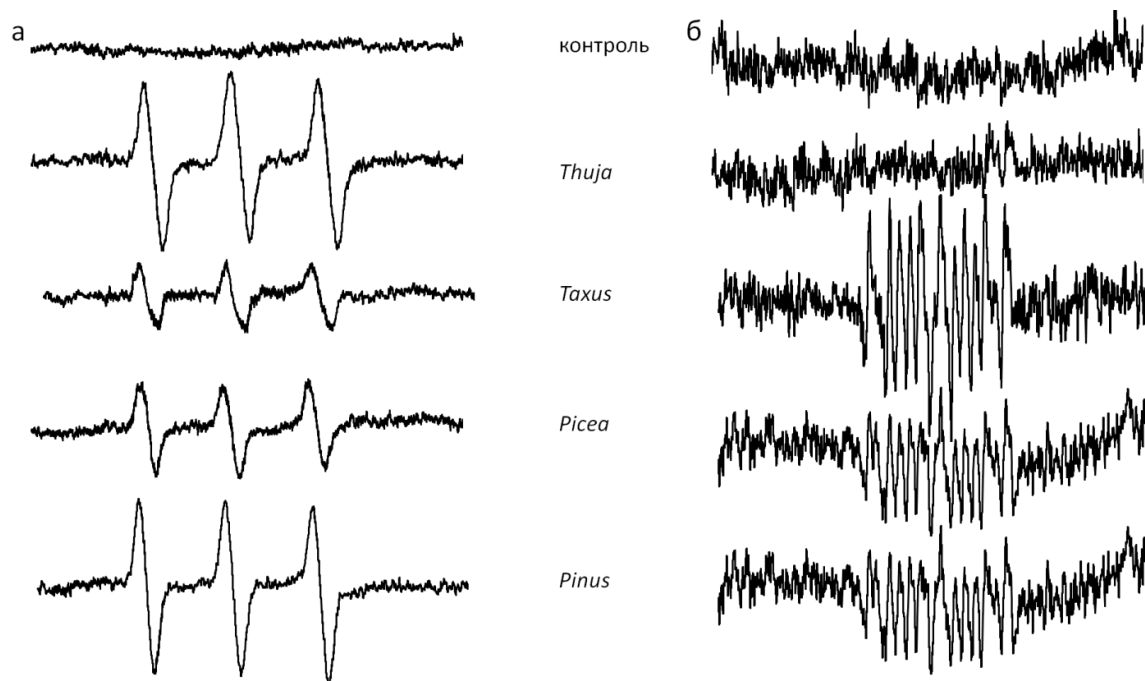


Рисунок 21 АФК в опылительных каплях хвойных растений. Характерные спектры ЭПР неспецифического спинового зонда CAT-1H, отражающие суммарный уровень АФК (а) и специфической спиновой ловушки DEPMPO, отражающие генерацию $O_2^{\bullet-}$ (б). Данные получены при участии Луневой О.Г.

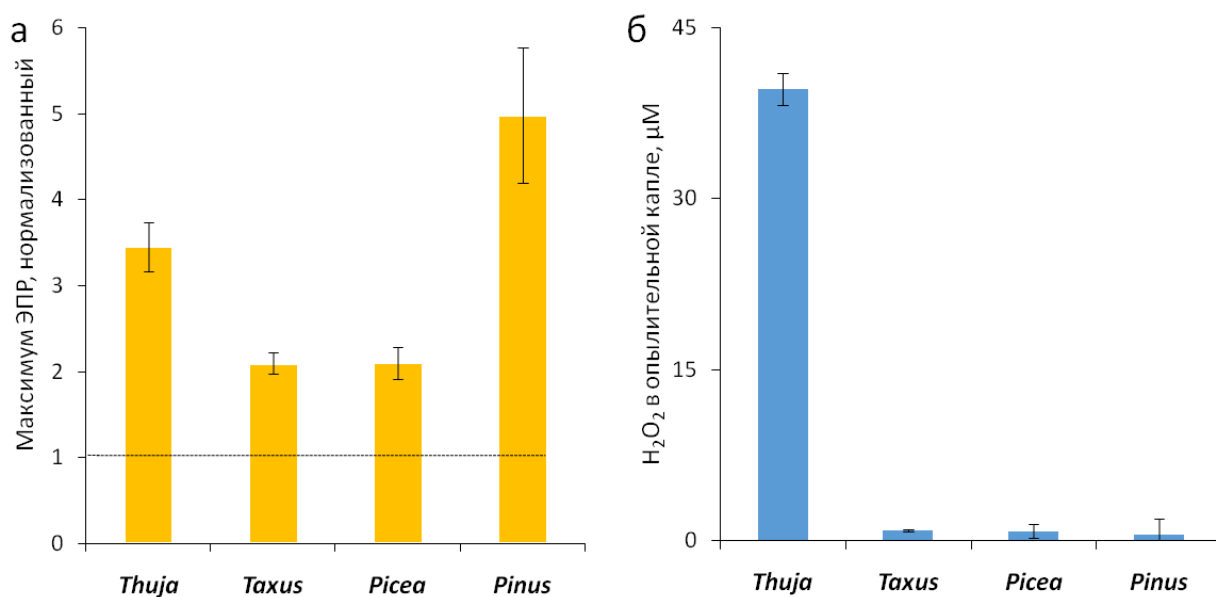


Рисунок 22 Общее содержание АФК и пероксида водорода в опылительных каплях по данным ЭПР спектроскопии с использованием спинового зонда CAT-1H (а) и по данным спектрофотометрии и окрашивания методом FOX1 (б).

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 23**), и от единственной активной формы кислорода к более сложному балансу между ними.

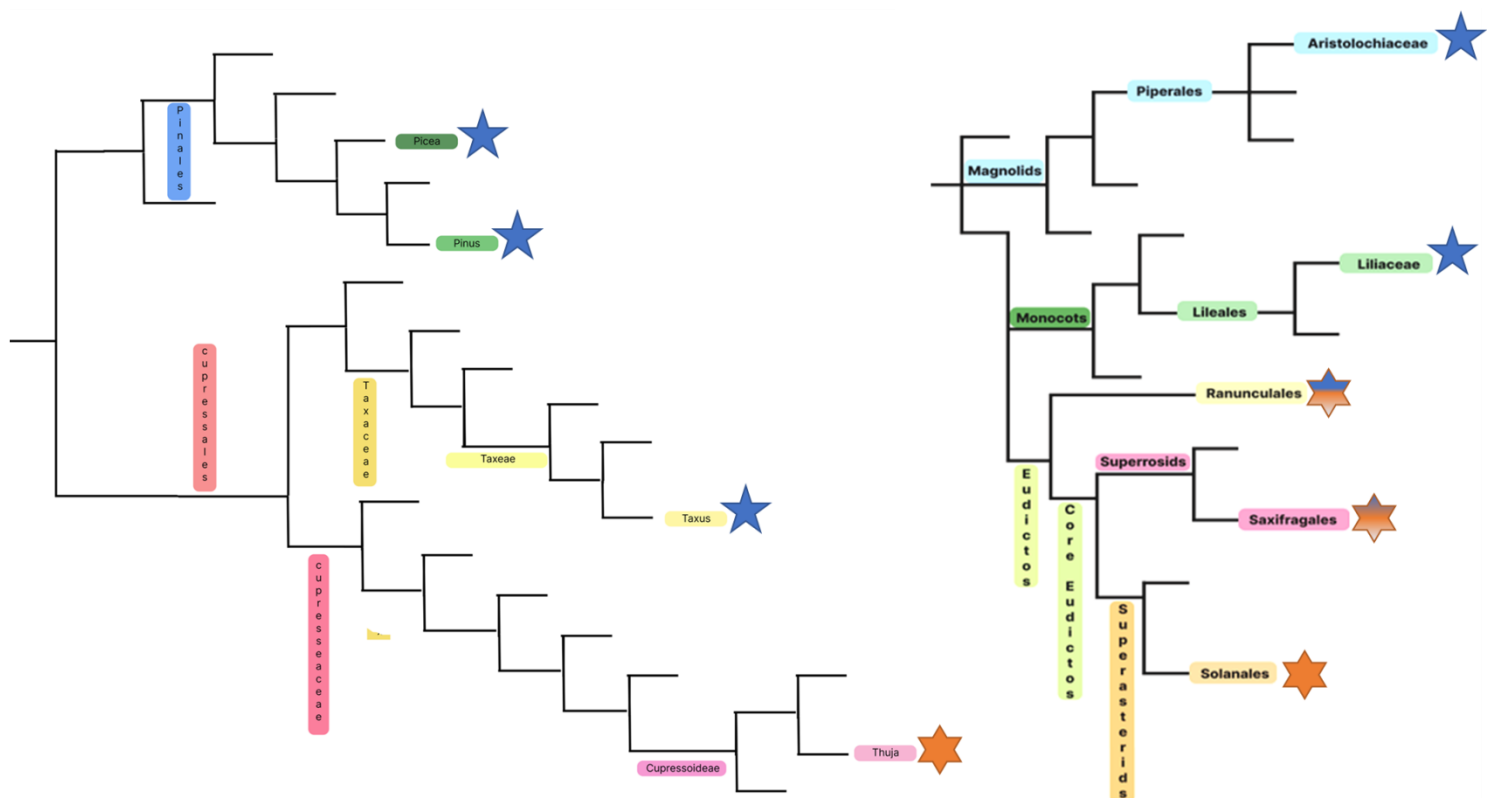


Рисунок 23 Преобладание супероксид радикала (синяя звездочка) или пероксида водорода (оранжевая звездочка) в рецептивных жидкостях растений из разных систематических групп цветковых и хвойных растений.

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 24**.

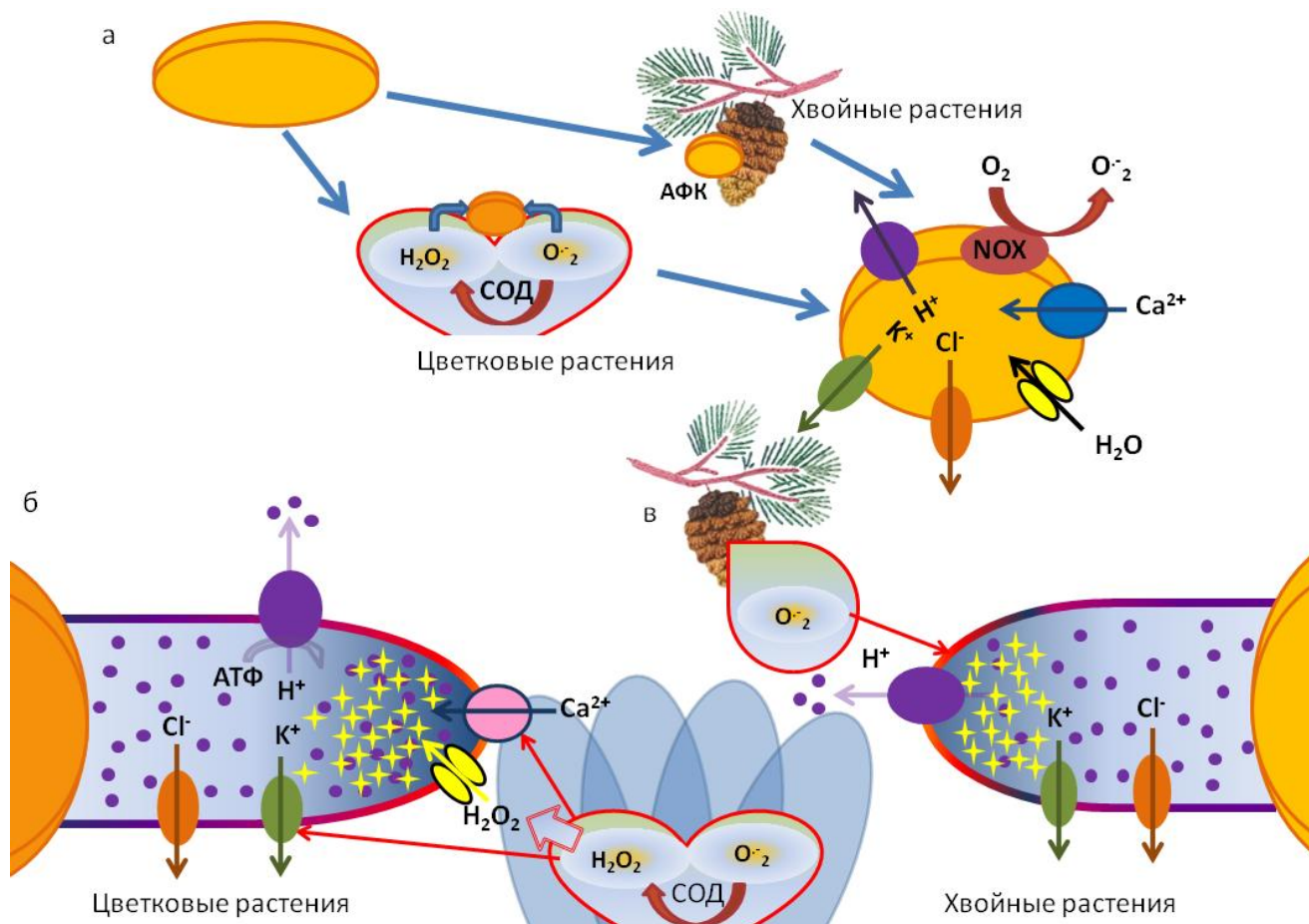


Рисунок 24 АФК и ионный транспорт в контроле прорастания пыльцевых зёрен (а) и роста пыльцевых трубок (б, в) *in vivo*. АФК продуцируются рыльцем цветковых растений и женской шишкой хвойных растений, а также генерируются прорастающим пыльцевым зерном. а – на ранней стадии прорастания происходит гидратация 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 . Оботзначены 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.

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 24а*). 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 24а,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.

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 $\text{O}_2^{\bullet-}$.
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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 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 $\text{O}_2^{\bullet-}$), 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 работ, опубликованных по теме диссертации
Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI (в скобках приведён импакт-фактор журнала, 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 – т. 40 №3 с. 199-207. // Breygina M.A., Matveeva N.P., Ermakov I.P. The role of Cl^- in pollen germination and tube growth. // Russian Journal of Developmental Biology – 2009 – Vol. 39 №3. p. 157-164. DOI: 10.1134/S1062360409030047 (RSCI=0,658; 0,5/0,4)
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 – т. 51 №10 с. 815-823. // Breygina M.A., Smirnova A.V., Matveeva N.P., Yermakov I.P. Membrane potential changes during pollen germination and tube growth. // Cell and Tissue Biology – 2009 – Vol. 3 № 6 p. 573-582. DOI: 10.1134/S1990519X0906011X (RSCI=0,660; 0,5/0,4)
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 – т. 52 №4 с. 334-341. // Breygina M.A., Maslennikov M.V., Matveeva N.P., Yermakov I.P. Effects of anion channel blockers NPPB and DIDS on tobacco pollen tube growth and its mitochondria state. // Cell and Tissue Biology – 2010 – Vol. 4 № 3 p. 289-296. DOI: 10.1134/S1990519X10030119 (RSCI=0,660; 0,5/0,4)
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 – т. 43 №2 с. 103-112. // Breygina M.A., Matveyeva N.P., Andreyuk D.S., Yermakov I.P. Transmembrane transport of K^+ and Cl^- during pollen grain activation *in vivo* and *in vitro*. // Russian Journal of Developmental Biology – 2012 – Vol. 43 № 2 p. 85-93. DOI: 10.1134/S1062360412020038 (RSCI=0,658; 0,6/0,5)
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 – т. 54 № 1 с. 85-88 (RSCI=0,660; 0,3/0,2)
6. Смирнова А.В., Тимофеев К.Н., **Брейгина М.А.**, Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Антиоксидантные свойства полимерного матрикса экзины пыльцевых зерен. // Биофизика – 2012 – т. 57 № 2 с. 258-263. // Smirnova A.V., Timofeyev K.N., Breygina M.A., Matveyeva N.P., Yermakov I.P. Antioxidant properties of the pollen exine polymer matrix. // Biophysics – 2012 – Vol. 57 № 2 p. 174-178. DOI: 10.1134/S0006350912020224 (RSCI=1,179; 0,4/0,15)
7. **Breygina M.A.**, Matveyeva N.P., Polevova S.V., Meychik N.R, Nikolaeva Y. I., Mamaeva A.S, Yermakov I.P. Ni^{2+} effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. // BioMetals. – 2012. – Vol. 25. – № 6.– P. 1221 – 1233. DOI: 10.1007/s10534-012-9584-0. (WoS IF =3.5; 0,8/0,6).

8. Polevova S.V, **Breygina M.A.**, Matveyeva N.P., Yermakov I.P. Periplasmic multilamellar membranous structures in *Nicotiana tabacum* L. pollen grains treated with Ni²⁺ or Cu²⁺. // *Protoplasma*. – 2014.– Vol. 251. – № 6. – P. 1521 – 1525. DOI: 10.1007/s00709-014-0651-y. (WoS IF =2.9; 0,5/0,3)
9. Максимов Н.М., **Брейгина М.А.**, Ермаков И.П. Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода. // *Цитология* – 2015 – т. 57 № 10 с.720-726. // Maksimov N.M., Breygina M.A., Yermakov I.P. Regulation of ion transport across the pollen tube plasmalemma by hydrogen peroxide. // *Cell and Tissue Biology* – 2016 – Vol. 10 № 1 p. 69-75. DOI: 10.1134/s1990519x16010077 (RSCI=0,660; 0,5/0,4)
10. **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. DOI: 10.1111/plb.12470. (WoS IF =3.9; 0,5/0,4)
11. **Breygina M.A.**, Abramochkin D.V., Maksimov N.M., Yermakov I.P.. Effects of Ni²⁺ and Cu²⁺ on K⁺ and H⁺ currents in lily pollen protoplasts. // *Functional Plant Biology*.– 2017. – Vol. 44. – № 12. – P. 1171 – 1177. DOI: 10.1071/FP17033. (WoS IF =3.0; 0,5/0,4)
12. 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. DOI: 10.1007/s00497-018-0335-4. (WoS IF =3.4; 0,6/0,4)
13. 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. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.153050. (WoS IF =4.3; 0,8/0,6)
14. **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. DOI: 10.1007/s00709-018-01333-3. (WoS IF =2.9; 0,5/0,4)
15. **Breygina M.A.**, Klimenko E.S. ROS and ions in cell signaling during sexual plant reproduction. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 24. DOI: 10.3390/ijms21249476. (WoS IF =5.6; 0,8/0,7)
16. **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. DOI: 10.3390/plants9121760. (WoS IF =4.5; 0,8/0,6)
17. **Breygina M.A.**, Klimenko E.S., Schekaleva O.I. Pollen germination and pollen tube growth in gymnosperms. // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – № 7. DOI: 10.3390/plants10071301. (WoS IF =4.5; 1/0,9)
18. 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. DOI: 10.1007/s00497-021-00403-6. (WoS IF =3.4; 0,85/0,6)
19. **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. DOI: 10.1111/plb.13255. (WoS IF =3.9; 0,7/0,5)
20. **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. DOI: 10.3390/plants11070993. (WoS IF =4.5; 0,8/0,6)
21. **Breygina M.A.**, Voronkov A.S., Galin I., Akhiyarova G.R., Polevova S.V., Klimenko E.S., Ivanov I.A., Kudoyarova G.R. Dynamics of endogenous levels and subcellular localization of ABA and cytokinins during pollen germination in spruce and tobacco. // *Protoplasma*. – 2022. DOI: 10.1007/s00709-022-01766-x. (WoS IF =2.9; 0,7/0,5)
22. **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. DOI: 10.1007/s10725-023-01033-w. (WoS IF =4.2; 0,7/0,5)
23. **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. DOI: 10.3390/ijms24119717. (WoS IF =5.6; 0,8/0,6)
24. **Breygina M.A.**, Kochkin D.V., Voronkov A.S., Ivanova T., Babushkina K.O. Plant hormone and fatty acid screening of *Nicotiana tabacum* and *Lilium longiflorum* stigma exudates. // *Biomolecules*. – 2023. - Vol. 13. – № 9. DOI: 10.3390/biom13091313. (WoS IF =5.5; 0,7/0,5)