

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Максимов Никита Михайлович

**РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В
ПРОРАСТАНИИ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА СЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., с.н.с. Брейгина М. А.

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы.....	6
Цели и задачи исследования.....	8
Научная новизна работы.....	9
Научно-практическая ценность работы.....	10
Положения выносимые на защиту.....	10
Апробация работы.....	11
Публикации по теме диссертации.....	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
I. Основные цитофизиологические особенности прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки.....	15
II. Ионная регуляция роста пыльцевой трубки.....	18
II. 1. Гомеостаз и регуляторная роль Ca^{2+} в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки.....	20
II.2. Гомеостаз, транспорт и градиент H^+ в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки.....	44
II.3. Транспорт K^+ и значение в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки.....	46
II.4. Транспорт анионов Cl^-/NO_3^- , их градиент и роль в процессе роста пыльцевой трубки.....	50
III. Мембранный потенциал вегетативной клетки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки.....	55
IV. Активные формы кислорода и азота в жизни мужского гаметофита.....	57
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	73

I. Объекты исследования.....	73
II. Выделение протопластов из пыльцевых зёрен и субпротопластов из пыльцевых трубок.....	73
III. Фиксация субпротопластов.....	76
IV. Флуоресцентная микроскопия, фотографирование и компьютерный анализ изображений.....	76
V. Картирование внутриклеточных АФК с применением конфокальной микроскопии.....	83
VI. Флуориметрическая детекция внеклеточных АФК.....	84
VII. Пэтч-кламп.....	84
VIII. Статистическая обработка данных.....	93
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	94
I. Цитологическая характеристика пыльцевых протопластов.....	94
II. Функционирование регуляторного модуля \uparrow АФК \leftrightarrow \uparrow [Ca ²⁺] _{цит} в мужском гаметофите.....	99
II.1. H ₂ O ₂ -индуцированный входящий Ca ²⁺ ток в протопластах лилии.....	99
II.2. H ₂ O ₂ -индуцированное увеличение [Ca ²⁺] _{цит} и долговременные эффекты, связанные с регенерацией клеточной оболочки субпротопластов.....	104
III. Регуляторная роль H ₂ O ₂ в контроле K ⁺ тока.....	109
IV. АФК-индуцированные изменения мембранного потенциала как интегрального показателя работы ион-транспортных систем плазмалеммы...	114
IV.1. Гиперполяризация субпротопластов пыльцевых трубок табака, индуцированная H ₂ O ₂	114

IV.2. Латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели и его модуляция при сдвиге редокс-баланса.....	117
V. Cu^{2+} и Ni^{2+} как регуляторы ионных токов на плазмалемме пыльцевого зерна.....	122
V.1. Cu^{2+} -индуцированная продукция АФК в протопластах.....	122
V.2. Действие Ni^{2+} на выходящий ток K^+	124
V.3. Активация протонного тока под действием Cu^{2+}	126
VI. Особенности АФК-регуляции прорастания пыльцы хвойных растений.....	130
VI.1. Выделение АФК во внеклеточную среду пыльцой ели.....	130
VI.2. Картирование внутриклеточных АФК в пыльце ели.....	132
VI.3. Значение АФК для прорастания пыльцевых зёрен ели.....	135
Заключение.....	140
ВЫВОДЫ.....	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота;
АФК – активные формы кислорода;
СОД – супероксид дисмутаза;
цАМФ – 3'-5'-циклоаденозинмонофосфат;
BiFC – bimolecular fluorescence complementation (метод бимолекулярной комплементации флуорисценции);
 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ – равновесная цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} (также используются следующие индексы для обозначения равновесной концентрации Ca^{2+} в соответствующих компартментах: ER – люмен ЭПР, nuc – нуклеоплазма, ex – среда культивирования);
CaM – Calmodulin, (CALcium-MODULated proteIN);
CDPK – Ca^{2+} -dependent protein kinases (Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы);
CHX – cation/ H^+ exchanger;
CNGC – cyclic nucleotide gated channels;
CNQX – 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione;
DIDS – 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid;
DPI – diphenylene iodonium;
FRET – Förster resonance energy transfer;
GUS –
GLR – glutamate receptor;
IP₄ – inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate;
MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid;
Mn-TMPP – Mn-5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)21H,23H-porphin;
NBT – nitroblue tetrazolium;
NPPB – 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid;
PME – pectin methylesterase ;
POBN – α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron;
qRT-PCR – quantitative real-time polymerase chain reaction;
TEA – tetraethylammonium chloride;
TMB – 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine;
TPK – tandem pore K^+ channel;
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane;
YC – Yellow Cameleon (семейство Ca^{2+} -чувствительных белковых сенсоров).

Флуоресцентные красители

BCECF – 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein;
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole;
DCFH₂-DA – 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate;
di-4-ANEPPS – 3-(4-(2-(6-(dibutylamino)naphthalen-2-yl)ethenyl)pyridinium-1-yl)propane-1-sulfonate;
DiBAC₄(3) – Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethineoxonol;
FDA – fluorescein diacetate;
Fluo-3 – 2-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2,7-dichloro-3-hydroxy-6-oxoxanthen-9-yl)phenoxy)ethoxy)-N-(carboxymethyl)-4-methylanilino)acetic acid;
Tinopal (Calcofluor White M2R) – disodium 2,2'-ethene-1,2-diylbis(5-((6-anilino-4-(bis(2-hydroxyethyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzene-1-sulfonate).

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Мужской гаметофит современных хвойных, гнетовых и покрытосеменных растений является ключевой фазой жизненного цикла, поскольку именно он обеспечивает доставку неподвижных спермиев к яйцеклетке. Транспорт спермиев обеспечивает вырост вегетативной клетки – пыльцевая трубка, в цитоплазме которой, благодаря различным механизмам внутриклеточной подвижности, происходит продвижение спермиев в направлении апекса. Такой способ доставки неподвижных гамет получил название – сифоногамия. Возникновение сифоногамии и её совершенствование в ходе эволюции рассматривается как важнейшая адаптация семенных растений, позволившая им в полной мере освоить наземные местообитания (Friedman, 1993).

С другой стороны, вегетативная клетка пыльцевого зерна покрытосеменных растений является традиционной для экспериментальной биологии моделью, с помощью которой изучают целый ряд клеточных процессов и явлений, в основном, связанных с полярным ростом: цитофизиологические основы клеточной полярности, динамику сборки цитоскелета и транспорта мембранного материала, ионную и редокс-регуляцию роста и др. (Michard et al., 2017). Следует отметить, что значение контролируемого клеточного роста чрезвычайно велико у многоклеточных растений с характерным для них плотным композитным, главным образом, полисахаридным межклеточным матриксом, ограничивающим подвижность клеток в ходе морфогенеза. В связи с этим у растений в ходе развития строго регулируется и координируется положение плоскости клеточных делений, а также скорость, направление роста клеток и их конечный размер. Установление механизмов клеточного роста и его регуляции является важной задачей, стоящей на пути понимания и контроля морфогенеза растений.

Кроме того, в последние годы мужской гаметофит рассматривают как перспективный объект для массивного роботизированного скрининга клеточных

регуляторов роста в биотехнологии (Chuprov-Netochin et al., 2016). Также следует отметить, что интерес к пыльце как к потенциально удобному индикатору загрязнения окружающей среды проявляют специалисты по экотоксикологии (Kalbande et al., 2008).

Хотя пыльцевая трубка – очень удобная экспериментальная модель, не стоит забывать о характерных ограничениях. Особенность мужского гаметофита заключается в том, что он представляет собой гаплоидное поколение; формирование данной консервативной стадии жизненного цикла происходило синхронно со становлением сифоногамии в течение мелового периода (Rudall and Bateman, 2007). Многочисленные сходства транскриптомной, протеомной подписей и целого ряда цитофизиологических закономерностей мужского гаметофита с такими полярно растущими диплоидными клетками спорофитного поколения, как трихобласты, возникали независимо друг от друга в ходе эволюции (Becker et al., 2003; Pina and Pinto, 2005).

Механизмы прорастания и роста мужского гаметофита у современных хвойных, гинкговых, беннетитовых и саговниковых изучены несравненно хуже, чем у цветковых растений, хотя сравнительно-физиологические исследования, наряду с традиционными палеоботаническими, ботаническими и молекулярно-биологическими данными, могли бы иметь важное значение для построения филогенетической системы семенных растений и понимания их эволюции.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой агенты с повышенной относительно триплетного кислорода энергией ($^3\text{O}_2$). Наиболее распространенными АФК в растении являются: супероксид анион радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) (преимущественно в фотосинтезирующих тканях), гидроксил радикал ($^{\bullet}\text{OH}$). Достаточно давно известно, что АФК в высоких концентрациях вызывают разнообразные повреждения биомолекул. В связи с этим в клетке существует целый ряд механизмов защиты и поддержания низкого уровня АФК. Вместе с этим показано, что АФК могут выполнять сигнальные и регуляторные функции, при этом их концентрация в клетках и тканях локально возрастает. По современным

данным литературы, такие всплески продукции АФК происходят на нескольких этапах половой репродукции цветковых растений. Однако, до сих пор было неизвестно, каким образом осуществляется редокс-регуляция прогамной фазы оплодотворения у покрытосеменных растений, а об аналогичных процессах у хвойных не было никаких данных вообще. Наша работа посвящена данной актуальной теме и демонстрирует участие как эндогенных, так и экзогенных АФК в прорастании пыльцевого зерна и поддержании роста пыльцевой трубки, а также вскрывает ряд ключевых механизмов редокс-регуляции.

Цели и задачи исследования

Выявить и сопоставить регуляторную роль активных форм кислорода в процессе прорастания мужского гаметофита у модельных растений, представителей покрытосеменных и хвойных.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

- Проверить гипотезу о наличии на плазмалемме вегетативной клетки мишеней для пероксида водорода. Изучить действие H_2O_2 на ключевой регуляторный модуль в прорастании пыльцы – цитозольный уровень и трансмембранный ток Ca^{2+} .
- Выявить другие мишени на плазматической мембране, которые могут участвовать в ответе клетки на экзогенные АФК.
- Выявить роль H_2O_2 в контроле интегрального показателя ионного гомеостаза – мембранного потенциала – у покрытосеменных и хвойных растений.
- Провести эксперименты по изучению ионных токов на плазмалемме в присутствии тяжелых металлов, которые вызывают или не вызывают гиперпродукцию АФК.
- Изучить особенности редокс-регуляции прорастания пыльцы хвойных: выявить АФК, имеющие ключевое значение для запуска полярного роста, и их источник.

Научная новизна работы

С использованием метода пэтч-кламп впервые показана H_2O_2 -индуцированная активация входящего Ca^{2+} тока на протопластах из пыльцевого зерна лилии, также продемонстрировано H_2O_2 -индуцированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ в субпротопластах из пыльцевых трубок табака. Данные результаты подтверждают гипотезу о функционировании регуляторного модуля АФК $\rightarrow \text{Ca}^{2+}$ в мужском гаметофите семенных растений. Также показано, что H_2O_2 вызывает активацию выходящего K^+ тока в протопластах из пыльцевого зерна лилии.

С применением современного потенциал-чувствительного красителя впервые картирован градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке ели, с помощью ингибиторного анализа изучен вклад отдельных ион-транспортных систем в формирование данного градиента. Двумя независимыми методами показана H_2O_2 -индуцированная гиперполяризация субпротопластов из пыльцевых трубок табака. Также показано влияние H_2O_2 на градиент в апексе пыльцевой трубки ели: происходит гиперполяризация, аналогично субпротопластам из пыльцевых трубок табака.

Показано, что медь (Cu^{2+}) как металл, инициирующий образование АФК, способствует активации H^+ -АТФазы в отличие от никеля (Ni^{2+}). При этом установлено, что Ni^{2+} выступает в качестве сильного ингибитора K^+ тока. Тем самым впервые описаны конкретные мишени для тяжелых металлов на плазмалемме мужского гаметофита.

С применением метода флуориметрии впервые продемонстрирован выход АФК из пыльцевыми зёрнами ели, а также с помощью конфокальной микроскопии показано распределение H_2O_2 в прорастающих пыльцевых зёрнах. Эта группа данных открывает совершенно не изученную область – редокс-регуляцию прогамной фазы у хвойных растений.

Положения выносимые на защиту

1. H_2O_2 в протопластах вегетативных клеток пыльцевого зерна у исследованных покрытосеменных растений активирует Ca^{2+} токи и увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Ингибирование входа Ca^{2+} блокирует регенерацию клеточной оболочки.
2. H_2O_2 активирует выходящий K^+ ток из протопластов пыльцевых зёрен.
3. В пыльцевых трубках ели существует латеральный градиент мембранного потенциала, в регуляции которого участвуют различные ион-транспортные системы. H_2O_2 воздействует на мембранный потенциал в субпротопластах из пыльцевых трубок табака, а также в интактных пыльцевых трубках ели.
4. Cu^{2+} , способствуя образованию АФК в протопластах, активирует H^+ -АТФазу плазмалеммы, а Ni^{2+} , не влияя на редокс-статус пыльцевых зёрен, блокирует ток K^+ .
5. Пыльцевые зёрна ели генерируют экстраклеточные АФК на раннем этапе прорастания.
6. Эндогенные АФК необходимы для эффективного прорастания пыльцевых зёрен ели.

Научно-практическая ценность работы

Представленная работа расширяет существующие представления о редокс-контроле трансмембранного ионного транспорта и регуляции мембранного потенциала в вегетативной клетке мужского гаметофита покрытосеменных растений (на моделях *Nicotiana tabacum* L. и *Lillium longiflorum* Thumb.). Кроме того, данная работа вносит существенный вклад в изучение цитофизиологических особенностей роста мужского гаметофита у хвойных (на модели *Picea pungens* Engelm.). Полученные в работе результаты могут быть использованы при дальнейшем исследовании фундаментальных 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. В дальнейшем знания о редокс-

регуляции размножения можно использовать для направленного изменения свойств растений и их продуктивности. Это же касается и выявления мишеней для тяжелых металлов, знания о которых могут помочь в получении устойчивых сортов и понимании механизмов защиты при выращивании растений и получении урожая в условиях антропогенной нагрузки.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены в стендовых и устных докладах на следующих международных конференциях: XXI и XXII научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014, 2015), научная конференция и школа молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction (Порту, 2014), VIII съезд Общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), V Международная Школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», посвященная памяти члена-корреспондента РАН профессора Татьяны Борисовны Батыгиной (Санкт-Петербург, 2016), II Международный симпозиум молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений (Уфа, 2017), XI Международная конференция "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология" (Минск, 2018), IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ из них 5 – статьи, 5 из которых опубликованы в отечественных и международных журналах и сборниках, соответствующих Перечню ВАК, индексируемых в базах данных Web

of Science и/или Scopus; 9 - тезисы докладов всероссийских и международных конференций.

Публикации по теме диссертации:

Статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus

1. Breygina M. A., Abramochkin D. V., **Maksimov N. M.**, Yermakov I. P. 2016 Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts, *Plant Biology*, 18(5): 761 – 767. <https://doi.org/10.1111/plb.12470> (IF = 2.156)
2. Breygina M., Abramochkin D. V., **Maksimov N.**, Yermakov I. 2017 Effects of Ni²⁺ and Cu²⁺ on K⁺ and H⁺ currents in lily pollen protoplasts, *Functional Plant Biology*, 44: 171-177. <https://doi.org/10.1071/FP17033> (IF = 2.327)
3. **Maksimov N.**, Evmenyeva A., Breygina M., Yermakov I. 2018 The role of ROS in pollen germination in *Picea pungens* (blue spruce), *Plant Reproduction*, 31(4):357–365. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0335-4> (IF = 2.976)
4. Breygina M. A., **Maksimov N. M.**, Polevova S. V., Evmenyeva A. A. 2019 Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*), *Protoplasma*. 256 (4): 941 – 949. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01333-3> (IF = 2.633)

Статья в журнале, индексируемом в базе данных Scopus

5. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. 2015 Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода, *Цитология*, 57(10), 720-726. **Maksimov N. M.**, Breygina M. A., Yermakov I. P. 2016 Regulation of ion transport across the pollen tube plasmalemma by hydrogen peroxide, *Cell and Tissue Biology*, 10: 69-75. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16010077>

Тезисы конференций:

6. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А. Действие экзогенного перексида водорода на субпротопласты из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L. // Тезисы докладов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014». Секция «Биология». Подсекция «Физиология растений», стр. 305.

7. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. Мембранные эффекты пероксида водорода в субпротопластах из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L. // Международная научная конференция и школа молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»: материалы в 2-х ч. / под ред. Е.С. Роньжиной. – Калининград: Аксиос, 2014. – ч. I, стр. 81-83.
8. Breygina M. A., **Maksimov N. M.**, Yermakov I. P. The effects of hydrogen peroxide on *Nicotiana tabacum* L. pollen tube protoplasts XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction, Porto, Portugal.
9. **Максимов Н. М.** Регуляция ионных токов в протопластах из пыльцевых зерен *Lilium longiflorum* Thumb. пероксидом водорода // Тезисы докладов XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015». Секция «Биология». Подсекция «Физиология растений», 2015 г., стр. 344.
10. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. Редокс-регуляция трансмембранного ионного транспорта в мужском гаметофите // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых. Россия, Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015 г., стр. 327.
11. **Максимов Н. М.** Редокс-регуляция прогамной фазы оплодотворения // V Международная Школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», посвященная памяти члена-корреспондента РАН, профессора Татьяны Борисовны Батыгиной. Россия, Санкт-Петербург, 9-14 октября 2016 г., стр. 205.
12. **Максимов Н. М.**, Абрамочкин Д. В., Брейгина М. А. Участие АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна голосеменных и покрытосеменных растений // II Международный симпозиум молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Россия, Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.

13. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А. Редокс-регуляция ионного транспорта в растущей пыльцевой трубке // Тезисы докладов XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Беларусь, Минск, 23 - 27 сентября 2018 г.

14. **Максимов Н. М.**, Евменьева А. А., Брейгина М. А., Ермаков И. П. Роль активных форм кислорода в прорастании пыльцевых зёрен ели (*Picea pungens*) // X Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Россия, Казань, 19 – 24 сентября 2019 г.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I. Основные цитофизиологические особенности прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки

Пыльцевое зерно (мужской гаметофит) является важной стадией онтогенеза покрытосеменных растений и образуется в результате митотических делений микроспоры. В двухклеточном пыльцевом зерне внутри вегетативной клетки находится генеративная клетка, в трёхклеточном – два спермия, образовавшихся в результате митотического деления генеративной клетки (Алимов и др., 1994). У голосеменных растений количество клеток в зрелом мужском гаметофите варьирует, но обычно их больше, чем у цветковых (Friedman, 1993). Вегетативная клетка покрыта оболочкой, состоящей из экзины и интины. Экзина имеет сложную структуру и состоит из нескольких слоев, основным её компонентом является спорополленин, вспомогательными – фенольные соединения. В экзине имеются апертуры – отверстия, достигающие интины, через которые в дальнейшем может выходить пыльцевая трубка. Интина в основном состоит из полисахаридов (целлюлоза, каллоза, сшивочные гликаны, пектины) (Алимов и др., 1994). Зрелое пыльцевое зерно высвобождается из пыльника дегидратированным и находится в состоянии физиологического покоя, что обеспечивает устойчивость пыльцы к действию факторов окружающей среды. Также пыльцевое зерно содержит запасы питательных веществ, белков и мРНК, необходимых для прорастания.

У цветковых растений при попадании пыльцевого зерна на рыльце пестика происходит регидратация, активация метаболизма и поляризация цитоплазмы вегетативной клетки. Регидратация происходит благодаря поступлению воды из тканей рыльца, при этом движение воды регулируется оболочками пыльцевого зерна (Heslop-Harrison, 1987; Матвеева и др., 2012). В гидратированном пыльцевом зерне активизируется дыхание, синтез белка, ионные токи (С.М. Rounds et al., 2011). Поляризация включает в себя реорганизацию цитоскелета, миграцию генеративной клетки (в трехклеточных зёрнах – спермиев),

вегетативного ядра, везикул аппарата Гольджи и митохондрий к функциональной апертуре пыльцевого зерна. Затем в апертуре образуется цитоплазматический вырост вегетативной клетки – пыльцевая трубка. Пыльцевая трубка растёт в направлении зародышевого мешка и выполняет функцию доставки спермиев для осуществления двойного оплодотворения.

Пыльцевые зерна большинства растений способны сами активировать и поддерживать регуляторную сеть, контролирующую полярный рост, в отсутствие сигналов, продуцируемых женским гаметофитом и спорофитом (Qin and Yang, 2011). Поэтому пыльцевые зерна зачастую успешно прорастают и реализуют программу полярного клеточного роста в питательной среде *in vitro*. Для этого в большинстве изученных случаев среда должна содержать соли кальция, борную кислоту, осмотики и источник гетеротрофного питания, обычно сахарозу. Для достижения большего процента прорастания и более высокой скорости роста состав среды дополнительно оптимизируют. Естественно, рост пыльцевой трубки в условиях *in vitro* не полностью соответствуют процессам, протекающим *in vivo* (Taylor and Hepler, 1997). Однако, данная экспериментальная модель активно и с успехом используется при изучении закономерностей полярного, направленного клеточного роста. Кроме того, в последние годы ряд работ по изучению закономерностей прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок выполнен с использованием микрофлюидных чипов и с применением *semi-in-vivo* систем (Agudelo et al., 2014; Horade et al., 2014).

Полярный тип роста характеризуется тем, что секреция материала клеточной стенки и материала плазматической мембраны происходит в апексе трубки. Помимо пыльцевых трубок, к объектам с полярным типом роста относятся: нейриты (аксоны, дендриты) нейронов, гифы грибов, протонемы мхов, ризоиды мхов и папоротников, а также корневые волоски (Rounds and Bezanilla, 2013). Поляризация выражается в зонировании цитоплазмы, полярных ионных токах и ионных градиентах, направленном циклозе, особой архитектуре цитоскелета и клеточной стенки.

В растущей пыльцевой трубке выделяют следующие домены: апикальный, субапикальный, ядерный и вакуолярный (*Схема I*).

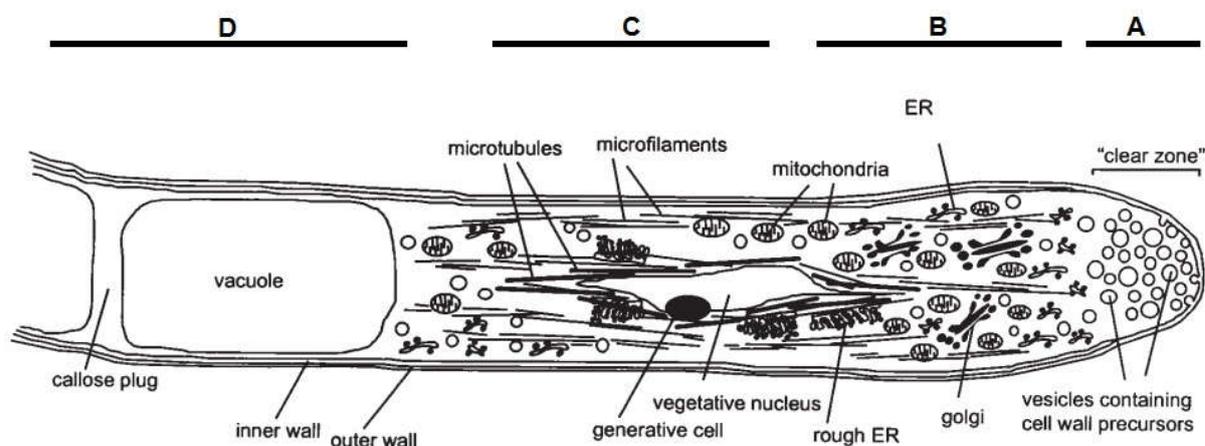


Схема I. Ультраструктура пыльцевой трубки (Franklin-Tong, 1999).

А – апикальный домен заполнен секреторными везикулами с материалом клеточной стенки (*vesicles containing cell wall precursors*), при микроскопировании выглядит прозрачным и поэтому часто обозначается как «прозрачная зона» («*clear zone*»);

В – субапикальный домен содержит митохондрии (*mitochondria*), стопки аппарата Гольджи (*golgi*), гранулярный эндоплазматический ретикулум (*rough ER*);

С – ядерный домен включает ядро вегетативной клетки (*vegetative nucleus*) и генеративную клетку (*generative cell*);

Д – вакуолярный домен, выделяется в длинных трубках, содержит большие вакуоли (*vacuole*) и каллозную пробку (*callose plug*), которая изолирует метаболически активную апикальную часть пыльцевой трубки от не активной базальной части, приближенной к пыльцевому зерну.

Для пыльцевой трубки характерна продольная ориентация элементов цитоскелета: актиновых микрофиламентов (*microfilaments*) и тубулиновых микротрубочек (*microtubules*).

Важной особенностью растущей трубки цветковых растений является движение цитоплазмы с органеллами по траектории обращённого фонтана: органеллы движутся по направлению к апексу по кортикальной части трубки, затем в субапикальной зоне разворачиваются и движутся по направлению к базальной части по центру трубки (Cheung and Wu, 2008). Интересно, что для изученных хвойных растений характерно прямо противоположное движение

цитоплазмы: по траектории прямого фонтана (Fernando et al., 2005). Для некоторых видов растений характерны осцилляции секреции мембранного материала и, как следствие, скорости роста пыльцевой трубки, а также ряда других показателей, включая ионные токи. Однако, следует отметить, что осцилляции при росте пыльцевой трубки пока что не описаны в условиях *in vivo*, их направленный поиск не всегда дает результаты даже в системе *in vitro* (Feijó et al., 2001). Тем не менее, говорить о том, что данный феномен является артефактом, пока рано; по-видимому он все же отражает стационарно-колебательный характер полярного роста пыльцевой трубки.

Закономерности роста пыльцевой трубки рассмотрены в большом числе обзоров (Cheung and Wu, 2008; Hepler et al., 2001; Rounds and Bezanilla, 2013), в некоторых более подробно рассматриваются такие аспекты, как ионная регуляция роста (Hepler et al., 2006; Michard et al., 2017, 2009). Значительный прогресс в последние годы сделан в расшифровке внутриклеточных сигнальных систем мужского гаметофита, при этом установлено, что важную роль играют Рор ГТФазы (Franklin-Tong, 1999; Ge et al., 2007; Yang, 2008), внутриклеточная Ca^{2+} -сигнальная сеть (Wudick and Feijo, 2014) и анионный транспорт (Gutermuth et al., 2013). Также в литературе активно обсуждается участие АФК в процессах полярного роста (Bell et al., 2009). В последующих разделах вопросы связанные с ионной- и АФК-регуляцией рассмотрены подробно.

II. Ионная регуляция роста пыльцевой трубки

При обсуждении проблемы ионного гомеостаза клетки следует различать ряд показателей и структур, которые могут быть идентифицированы соответствующими методами. Разные группы исследователей в своих работах описывают те или иные показатели, возможно, относящиеся к одной и той же системе транспорта ионов, однако установление соответствия между результатами, полученными разными методами, зачастую затягивается или

вообще не происходит. В данном разделе мы постарались избежать путаницы, при анализе, разделяя группы данных по методическому принципу.

Показатели/структуры	Методы исследования
Белки ион-транспортные системы плазмалеммы и мембран внутриклеточных компартментов (каналы, транспортеры, насосы)	Арсенал молекулярно-биологических и биохимических методов, позволяющих идентифицировать гены соответствующих ион-транспортных систем и генные продукты (мРНК, белки)
Трансмембранные ионные токи на плазмалемме и мембранах внутриклеточных компартментов, которые обеспечиваются соответствующими ион-транспортными системами	Электрофизиологические методы идентификации токов (пЭГЧ-кламп, метод вибрирующего электрода), измерение содержания ионов в среде прорастания (спектрофлуориметрия, пламенная фотометрия)
Цитозольные ионные градиенты, формирующиеся в результате совместной работы ион-транспортных систем, и содержание ионов в клетке	Различные низкомолекулярные ион-селективные флуоресцентные красители и белковые сенсоры на основе флуоресцентных белков, рентгено-спектральный микроанализ

Для клеток с полярным ростом, в том числе, для пыльцевых трубок характерно наличие цитозольных ионных градиентов и/или полярных трансмембранных токов Ca^{2+} , H^+ , K^+ , $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$. Установлено, что каждый из этих ионов играет важную роль в процессе роста пыльцевой трубки.

II. 1. Гомеостаз и регуляторная роль Ca^{2+} в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки

В ранних работах было установлено, что для всех изученных видов покрытосеменных растений наличие Ca^{2+} в среде является необходимым условием для эффективного прорастания пыльцевого зерна и нормального роста пыльцевой трубки *in vitro* (Brewbaker and Kwack, 1963). Дальнейшие работы были направлены на установление: **а)** динамики и распределения Ca^{2+} в прорастающем пыльцевом зерне, **б)** градиента в растущей пыльцевой трубке и **в)** его функций в процессе апикального, направленного роста. После секвенирования геномов модельных растений и в связи с развитием молекулярно-биологических методов были начаты работы по идентификации ион-транспортных систем, обеспечивающих транспорт Ca^{2+} . Выполняются работы по уточнению особенностей компартментации Ca^{2+} с применением белковых сенсоров. В настоящее время на молекулярном уровне интенсивно ведутся работы по расшифровке регуляторной сети белков, способных связывать Ca^{2+} и обеспечивать дальнейшую трансдукцию сигнала при регуляции развития мужского гаметофита.

II. 1. 1. Динамика содержания Ca^{2+} при прорастании пыльцевого зерна, градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в растущей пыльцевой трубке и его осцилляции

Выявлены основные закономерности динамики $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при прорастании пыльцевого зерна. М. Iwano с соавторами, используя белковый сенсор YC3.1, а М. Diao с коллегами, применяя сенсор G-CaMP, получили сходные результаты и показали увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в области цитоплазмы, прилегающей к функциональной апертуре при активации прорастающего зерна *Arabidopsis* ещё до появления видимых морфологических изменений (Diao et al., 2018; Iwano et al., 2004). Как было показано, уже на этих этапах можно наблюдать осцилляции концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Интересно, что начало прорастания маркируется увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ по всей цитоплазме (Diao et al., 2018). И при формировании

выроста трубки устанавливается устойчивый осциллирующий апикальный градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Diao et al., 2018).

Существование градиента $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ в растущей пыльцевой трубке – факт, известный с середины 70-х годов. Впервые измерения суммарного кальция в относительно крупных пыльцевых трубках лилии (*Lilium longiflorum*) были проведены с применением ^{45}Ca и последующей низкотемпературной автордиографии (Jaffe et al., 1975). Данные результаты многократно подтверждались и уточнялись различными методами на разных объектах: с применением тетрациклинового мембранно-связанного флуоресцентного красителя (Reiss and Herth, 1978; Reiss et al., 1985), с использованием свободных цитоплазматических флуоресцентных красителей: quin-2 (Nobiling and Reiss, 1987; Reiss and Nobiling, 1986), indo-1 (Rathore et al., 1991), fluo-3 (Qu et al., 2012), fluo-4 (Qu et al., 2016), а также при инъекции в пыльцевые трубки красителя fura-2, конъюгированного с декстраном (Cardenas et al., 2008; Lazzaro et al., 2005; Rounds et al., 2011). С появлением технологии белковых флуоресцентных Ca^{2+} сенсоров они также были использованы для выявления градиента $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$: YQ3.1 для арабидопсиса (Iwano et al., 2004), белковый сенсор следующего поколения YC3.6 – для томата (Barberini et al., 2018). Недавно для измерения динамики Ca^{2+} в пыльце *Arabidopsis* был использован одноволновый, не ратиометрический белковый сенсор G-CaMP (Diao et al., 2018). Как уже упоминалось выше, градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ характерен не только для лилии, но и для других покрытосеменных растений, а также для хвойных растений (Fernando et al., 2005).

Важно, отметить что были выявлены сопряженные осцилляции роста пыльцевой трубки и $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$; было продемонстрировано, что данные показатели колеблются с одинаковым периодом и совпадают по фазе (Pierson et al., 1996). В то же время, следует отметить, что колебания $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ не обнаружены при росте пыльцевой трубки *in vivo* (Iwano et al., 2009).

Использование методов элементного микроанализа и флуоресцентных Ca^{2+} -чувствительных зондов позволило обнаружить и количественно охарактеризовать

градиент $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в кончике трубки с максимумом в примембранной области (Miller et al., 1992; Reiss and Herth, 1978).

Важность тонкой цитозольной динамики Ca^{2+} подчеркивает то, что диссипация градиента и резкое увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$, по-видимому, являются ключевыми механизмами, ведущими к абортированию пыльцы при самонесовместимости (Franklin-Tong et al., 2002). Также градиент $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ играет ключевую роль в обеспечении направленности роста. Это подчеркивает тот факт, что регистрируемая с помощью внутриклеточных сенсоров реориентация градиента предшествует морфологическим изменениям (повороту) растущей трубки (Chae and Lord, 2011; Diao et al., 2018; Dumas and Gaude, 2006).

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* (Diao et al., 2018; Palanivelu and Preuss, 2006).

II. 1. 2. Компартиментация Ca^{2+} , системы его транспорта в мужском гаметофите и их регуляция

Как говорилось выше, большое число работ посвящено системам трансмембранного переноса Ca^{2+} и регуляции их работы (Nepler et al., 2012). Низкое базальное значение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в растительных клетках поддерживается благодаря активному экспорту Ca^{2+} в апопласт и во внутриклеточные компартменты. Этот перенос обеспечивают АТФазы и транспортеры, использующие в качестве источника энергии АТФ или энергию $\Delta\mu H^+$. У модельного растения *Arabidopsis* обнаружено по меньшей мере четыре класса таких ион-транспортных систем (Kudla et al., 2018):

- Автоингибируемые Ca^{2+} -АТФазы (autoinhibited Ca^{2+} -ATPases, ACAs; 10 генов в геноме *Arabidopsis*). Близки к АТФазам плазматической мембраны животных, однако могут локализоваться не только в плазмалемме, но также в

тонопласте имембранах ЭПР. Имеют N-концевой кальмодулин-регулируемый автоингибиторный домен;

- Ca^{2+} -АТФазы ER-типа (ER-type Ca^{2+} -ATPases, ECAs; 4 гена у *Arabidopsis*);
- P1-АТФазы;
- Ca^{2+} -обменники (Ca^{2+} exchangers, CAХ).

Полный набор систем экспорта Ca^{2+} в пыльцевой трубке не выявлен, ниже рассмотрены имеющиеся данные литературы по этому вопросу.

Экспорт. Плазмалемма. Участие Ca^{2+} /кальмодулин-активируемой Ca^{2+} -АТФазы плазмалеммы АСА9 в активном выкачивании Ca^{2+} из растущей пыльцевой трубки было показано в работе Schiøtt с соавторами на *Arabidopsis* (Schiøtt et al., 2004). С экспрессией *GUS* репортера под промотором АСА9 показана преимущественная экспрессия гена АСА9 в пыльцевом зерне. Т-инсерционные мутанты по гену АСА9 характеризуются частичной мужской стерильностью. При опылении растений дикого типа пыльцой мутанта *aca9* характерно снижение семенной продуктивности более чем на 80%. Конфокальная микроскопия демонстрирует, что конъюгат АСА9-YFP локализуется в плазматической мембране равномерно по длине пыльцевой трубки. Все эти факты подчеркивают важную роль АТФазы АСА9 в экспорте Ca^{2+} из цитоплазмы.

Экспорт. ЭПР. Данные ингибиторного анализа и высокие значения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ (100-500 μM), измеренные с использованием белкового ЭПР-локализованного сенсора YC4.6, указывают на важную роль ЭПР в депонировании Ca^{2+} за счёт его выкачивания из цитозоля (Iwano et al., 2009). Так, обработка циклопиазоновой кислотой (ингибитор РПА-типа Ca^{2+} -АТФаз) растущих пыльцевых трубок *Arabidopsis* приводит к увеличению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ и одновременному падению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$; в результате происходит ингибирование роста пыльцевой трубки (Iwano et al., 2009).

Ядро. М. К. Watahiki с коллегами, изучая динамику Ca^{2+} в пыльце табака, использовали цитоплазматический сенсор YC2.1 и модифицированный сенсор NupYC2.1, содержащий последовательность, обеспечивающую его локализацию в нуклеоплазме ядра вегетативной клетки (Watahiki et al., 2004). В результате

удалось показать, что в цитоплазме растущей трубки наблюдается типичный осциллирующий градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, однако, в нуклеоплазме ядра вегетативной клетки осцилляции полностью отсутствуют. При этом добавление Ca^{2+} ионофора Br-A23187 приводило к увеличению как $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, так и $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$, что подтверждает возможность эффективного измерения $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ с использованием NupYC2.1 сенсора. В целом, подобный результат не удивителен, поскольку градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ характерен исключительно для апикальной зоны пыльцевой трубки, в то время как вегетативное ядро с генеративной клеткой/спермиями располагаются в более базальных частях. Таким образом, нуклеоплазма ядра вегетативной клетки, по-видимому, представляет собой частично изолированный компартмент в отношении Ca^{2+} . При этом $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ регулируется автономно от апикального градиента $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, обеспечивающего полярный рост пыльцевой трубки. С другой стороны, интересно отметить, что при внешних стимулах (например при самонесовместимости у мака *Papaver rhoeas*), происходит: ингибирование входа Ca^{2+} в апексе, активация входа Ca^{2+} в базальных частях, суммарное увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ и диссипация апикального градиента, при этом также предполагается увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$, которое, наряду с другими цитоплазматическими факторами, инициирует деградацию хроматина в вегетативном ядре (Franklin-Tong et al., 2002; Jordan et al., 2000; Thomas and Franklin-Tong, 2004). Эти данные показывают, что важно различать стационарный осциллирующий градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, устанавливающийся при прорастании в точке роста, и изменения $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ под действием внешних стимулов (например при АФК-индуцированном разрыве трубки во время входа в зародышевый мешок или в случае абортирования роста пыльцевой трубки при получении сигнала о самонесовместимости из спорофитных тканей рыльца/столбика) (Duan et al., 2014).

Митохондрии. Установлено, что определенную роль в поддержание низкого уровня $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ в цитоплазме пыльцевой трубки *Arabidopsis* играют паралогичные импортеры MCU1 и MCU2 локализованные в митохондриях, многочисленных в субапикальном и ядерном доменах пыльцевой трубки (Selles et al., 2018). Гетерологическая экспрессия *MCU1* и *MCU2* в дрожжах подтверждает,

что соответствующие белки функционируют как импортеры Ca^{2+} в митохондриях. Показано также, что MCU1 и MCU2 могут образовывать гетеротипичные и гомотипичные комплексы, что в свою очередь может обеспечивать тонкую настройку поглощения Ca^{2+} митохондриями. У мутанта *mcu2* наблюдалось снижение эффективности прорастания пыльцевых трубок *in vitro*, однако зафиксировать снижения прорастания *in vivo* не удалось. Данный факт может говорить о функциональной избыточности и возможности компенсации нефункционального белка MCU2 его паралогом MCU1. Также имеются данные о Ca^{2+} -связывающей белке с EF-руками MICU1, который является негативным регулятором Ca^{2+} импортера MCU1 (Teardo et al., 2017). MICU1 экспрессируется в мужском гаметофите *Arabidopsis* и локализован в митохондриях (Wagner et al., 2015). Для нокаутных мутантных растений *micu1* характерно увеличение свободного Ca^{2+} в матрице митохондрий, хотя падения уровня Ca^{2+} в цитоплазме при этом не зарегистрировано (Wagner et al., 2015).

Апопласт. Важную роль в компартиментации Ca^{2+} в растущей пыльцевой трубке играет апопласт (Hepler et al., 2012). Состав клеточной оболочки пыльцевой трубки неоднороден по длине: в апикальной части происходит секреция, главным образом, метоксилированных пектинов, которые и образуют стенку в этой области (Rounds and Bezanilla, 2013). В дальнейшем пектины подвергаются деэтерификации под действием фермента пектинметилэстеразы (PME); при этом высвобождаются отрицательно заряженные карбоксильные группы галактуроновой кислоты в составе пектинов, способные образовывать сшивки, связывая двухвалентные катионы, основным из которых является Ca^{2+} (Bosch and Hepler, 2005) (*Схема II*). Поскольку клеточная стенка содержит карбоксильные группы и накапливает большие количества Ca^{2+} , она является буфером, влияющим на токи этого иона через плазмалемму. Как отмечено в обзоре Hepler с соавторами, токи Ca^{2+} , измеряемые в интактных пыльцевых трубках с помощью микроэлектродов, отражают всю сумму процессов с участием этого иона, протекающих как на плазмалемме, так и в полимерном матрикс клеточной стенки (Hepler et al., 2012), причем вклад клеточной стенки

преобладает. Поэтому основным объектом для непосредственного изучения систем трансмембранного транспорта Ca^{2+} следует считать протопласты, лишенные клеточной стенки.

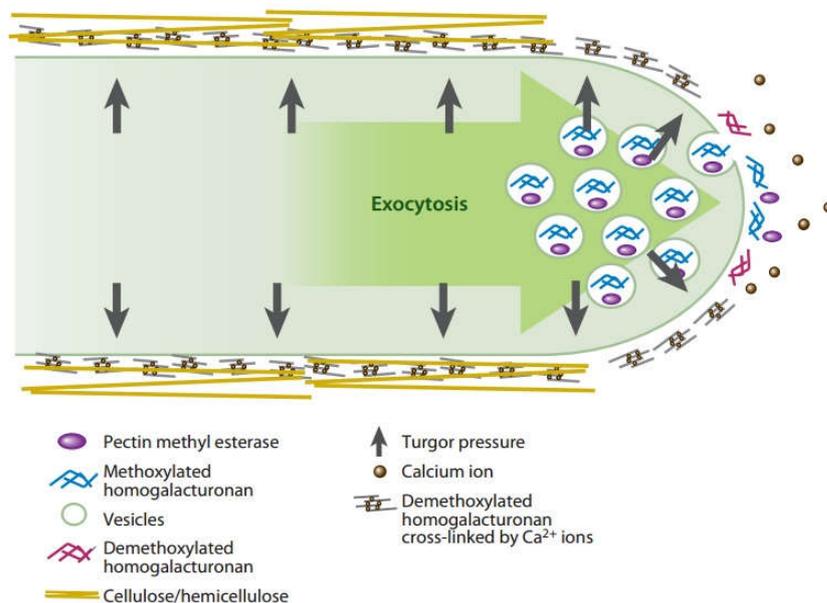


Схема II. Организация клеточной оболочки пыльцевой трубки (Rounds and Bezanilla, 2013). Тургорное давление (turgor pressure) является неполяризованной величиной и равномерно действует на клеточную стенку изнутри по всей поверхности. Ключевую роль в обеспечении апикального роста играет слияние с плазмалеммой везикул (vesicles), содержащих материал клеточной стенки. Везикулы содержат преимущественно метоксилированные пектины ((метоксилированные гомогалактуронаны, methoxylated homogalacturonan)), а также фермент пектинметилэстеразу (pectin methyl esterase). Апикальный домен клеточной стенки имеет меньшую вязкость благодаря высокому содержанию метоксилированных пектинов, поэтому именно в нем происходит растяжение под действием тургорного давления. По мере удаления от апекса происходит деэтерификация пектинов (demethoxylated homogalacturonan) и их поперечное сшивание с участием кальция (demethoxylated homogalacturonan cross-linked by Ca^{2+} ions), что ведет к возрастанию вязкости и снижает способность к растяжению. В базальных областях пыльцевой трубки осуществляется синтез целлюлозы и сшивочных гликанов (cellulose/hemicellulose), что дополнительно увеличивает регидность стенки и её сопротивление тургорному давлению.

Импорт. Поступление Ca^{2+} в цитозоль происходит пассивно, без затрат энергии, из апопласта или из внутриклеточных компартментов через белки-

каналы. У большинства эмбриофитов выявлено пять семейств Ca^{2+} -проводящих каналов (Edel and Kudla, 2015; Kudla et al., 2018):

- Каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (**cyclic nucleotide gated channels**, CNGCs);
- Рецепторы глутамата (**glutamate receptors**, GLRs);
- Двухпоровые каналы (**two pore channels**, TPCs);
- Механочувствительные каналы, подобные бактериальному механочувствительному каналу малой проводимости MscS (**small conductance mechanosensitive channel like**, MSLs);
- Каналы, обеспечивающие увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при гиперосмоляльности (**hyperosmolality-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ increase**, OSCAs).

Следует отметить, что у Embryophyta на молекулярно-генетическом уровне выявлены семейства Ca^{2+} -проводящих каналов, характерные для заднежгутиковых (Opisthokonta, к данной группе, согласно современной системе эукариот, относятся многоклеточные животные, ионные каналы которых наиболее полно изучены): VDCC (**Voltage Dependent Ca^{2+} Channels**), IP3R (**Inositol Trisphosphate Receptor**), P2XR (**P2X Receptor**), Cys-loop, TRP (Edel and Kudla, 2015; Kudla et al., 2018).

Поскольку частично соответствующие гены выявлены у родственных эмбриофитам представителей Chlorophyta (например, у *Chlamydomonas reinhardtii* имеются VDCC, IP3R, Cys-loop и TRP, а у *Ostreococcus tauri* – VDCC и P2XR) и Charophyta (у *Klebsormidium flaccidum* обнаружены VDCC), считается, что гены некоторых из этих каналов были утрачены в ходе эволюции эмбриофитов после выхода на сушу (Edel and Kudla, 2015). Данные о функционировании части имеющихся у эмбриофитов Ca^{2+} -проводящих каналов в пыльцевом зерне рассмотрены ниже.

Ещё в пионерских работах с помощью ионоселективных электродов в апикальной части растущей пыльцевой трубки был обнаружен входной ток Ca^{2+} (Weisenseel et al., 1975). Позднее было подтверждено, что вход внеклеточного

Ca^{2+} и градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ тесно связаны с ростом пыльцевой трубки (Pierson et al., 1996). Различные ингибиторы Ca^{2+} -проводящих каналов плазмалеммы (нифедипин, Gd^{3+} , La^{3+}) приводили к диссипации градиента $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ и подавлению роста. Таким образом, в поддержании градиента $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ важная роль принадлежит Ca^{2+} -проводящим каналам плазмалеммы, и функционирование этих систем является необходимым условием для роста трубки. Вопрос о дополнительном поступлении Ca^{2+} в цитозоль из внутриклеточных компартментов (ЭПР, вакуоль, митохондрий и др.) остается дискуссионным. Далее будут более подробно рассмотрены ключевые данные о транспортных системах, ответственных за вход кальция в цитоплазму пыльцевой трубки.

Каналы семейства CNGC. Ряд данных указывает на то, что во входе Ca^{2+} , участвуют каналы семейства CNGC. Эти низкоселективные катионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами, и, возможно, также активируемые при гиперполяризации. В связи с этим не случайным представляется, что циклические нуклеотиды, в частности, цАМФ вызывают реориентацию пыльцевых трубок *Agaranthus umbellatus* в экспериментах *in vitro* (Moutinho et al., 2001). В пыльце *Arabidopsis thaliana* экспрессируются 6 (CNGC7/8/9/10/16/18) из 20 обнаруженных у данного вида генов семейства CNGC (Hepler et al., 2012). Wu с сотрудниками на субпротопластах, выделенных из пыльцевых трубок *Pyrus pyrifolia*, используя Ca^{2+} -чувствительный флуоресцентный краситель, показали увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при экзогенном воздействии аналога цАМФ, способного проникать через плазмалемму – дибутирил-цАМФ; было показано, что вход Ca^{2+} осуществляется через неселективные каналы, обладающие как Ca^{2+} -, так и K^+ -проводимостью и активируемые при гиперполяризации (Wu et al., 2011). На *Arabidopsis thaliana* показано, что продукт гена *CNGC18* имеет большое значение для роста пыльцевых трубок и мужской фертильности: в частности, путём скрещиваний невозможно получить гомозиготные мутанты по гену *CNGC18* из-за полной мужской стерильности гетерозигот (Frietsch et al., 2007; Gao et al., 2016, 2014; Hepler et al., 2012). С использованием молекулярно-генетических подходов была показана экспрессия гена *CNGC18* в пыльцевой трубке и полярное

распределение его продукта в плазмалемме с максимумом в апикальной области (Frietsch et al., 2007). Гетерологическая экспрессия *CNGC18* в *Escherichia coli* приводила к Gd^{3+} -чувствительному накоплению Ca^{2+} (Frietsch et al., 2007). По имеющимся в литературе данным, в транспорте Ca^{2+} через плазмалемму растущей пыльцевой трубки принимают участие также каналы CNGC7/8 (Tunc-Ozdemir et al., 2013a), CNGC9/10 (Gao et al., 2016) и CNGC16 (Tunc-Ozdemir et al., 2013).

Каналы семейства GLR. Другим семейством каналов, принимающих участие во входе Ca^{2+} в цитозоль пыльцевой трубки, является семейство GLR, включающее каналы, активируемые аминокислотами. Следует отметить, что каналы активируются при связывании не только глутаминовой кислоты, но и других аминокислот (глицина, аланина, цистеина, аспарагина и серина). Транскриптомный анализ показывает, что в мужском гаметофите *Arabidopsis* экспрессируются 6 из 20 генов семейства GLR. В работе Michard с соавторами было продемонстрировано, что специфические антагонисты данных ионотропных рецепторов (AP-5 > CNQX > DNQX) эффективно подавляют рост пыльцевых трубок табака (Michard et al., 2011). Показано, что рост пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* активируется при добавлении D-серина (оптический изомер традиционной протеиногенной аминокислоты L-серина) в умеренной концентрации, при возрастании её концентрации в среде происходит подавление роста (Michard et al., 2011). С помощью белкового Ca^{2+} -чувствительного сенсора YC3.6 было также зарегистрировано увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в пыльцевых трубках *Arabidopsis thaliana* при добавлении D-серина. Далее было установлено, что у T-инсерционных мутантов *Arabidopsis glr1.2-1* и *glr3.7-1* наблюдается частичная мужская стерильность. При этом фенотип пыльцевых трубок *glr1.2-1* сходен с таковым пыльцевых трубок дикого типа, обработанных антагонистом GLR – CNQX. Хотя авторам цитируемой работы с помощью прямых электрофизиологических измерений (вибрирующий электрод) не удалось установить разницу в интенсивности трансмембранных токов у дикого типа и нокаутного мутанта *glr1.2-1*, оказалось, что среди мутантных пыльцевых трубок меньший процент демонстрирует осциляции входящего Ca^{2+} тока. Вероятно, для

каналов семейства GLR характерна функциональная избыточность и для регистрации снижения средней интенсивности трансмембранного Ca^{2+} тока недостаточно получить одинарный мутант. Вероятно, в будущем мутанты по нескольким генам будут получены и удастся установить роль каждого из экспрессирующихся в мужском гаметофите ионных каналов семейства GLR.

Ca^{2+} токи, идентифицированные электрофизиологическими методами. Среди каналов, принимающих участие в трансмембранном транспорте Ca^{2+} в пыльцевой трубке, наиболее изучены электрофизиологическими методами потенциал-зависимые каналы. Каналы, активируемые при гиперполяризации (порог активации от -80 до -100 мВ), обнаружены методом пэтч-кламп (принцип метода подробно рассмотрен в разделе «Материалы и методы») как в протопластах из пыльцевых зёрен, так и в субпротопластах из пыльцевых трубок ряда видов: *Arabidopsis thaliana* (Qu et al., 2007; Wang et al., 2004; Wu et al., 2007), *Lilium longiflorum* (Shang et al., 2005a) и *Pyrus pyrifolia* (Qu et al., 2007; Wu et al., 2010). Активность этой группы кальциевых каналов в пыльцевых трубках, помимо мембранного потенциала, также регулируется рядом лигандов: цАМФ (Wu et al., 2011), кальмодулином (Shang et al., 2005b), G-белками (Wu et al., 2007) и спермидином (Wu et al., 2010), однако в последнем случае активацию, по-видимому, вызывают АФК, генерируемые в результате работы полиамин-оксидазы (Wu et al., 2010). Также есть данные об участии актиновых микрофиломентов в регуляции потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в протопластах из пыльцевых зёрен *Arabidopsis* (Wang et al., 2004). На основании анализа трубок, обработанных деполимеризующими агентами, авторы предположили, что данные каналы являются механочувствительными, а кортикальные актиновые микрофиламенты участвуют в регуляции натяжения плазмалеммы, модулируя тем самым активность каналов.

Механочувствительные каналы. Dutta и Robertson методом пэтч-кламп обнаружили входные токи Ca^{2+} в субпротопластах, выделенных из пыльцевых трубок *Lilium longiflorum*, на участках плазмалеммы, противоположащих апертуре (Dutta and Robinson, 2004). Данные токи активировались при приложении

отрицательного давления (-10 кПа) к плазмалемме с внешней стороны и подавлялись при добавлении ингибитора Ca^{2+} -каналов Gd^{3+} . В связи с этим авторы говорят о наличии механочувствительных каналов, ответственных за транспорт Ca^{2+} в цитоплазму. Следует отметить, что генетические и молекулярно-биологические доказательства существования таких каналов в пыльцевых трубках пока отсутствуют.

Таким образом, в пыльце идентифицирован ряд систем экспорта Ca^{2+} в апопласт и внутриклеточные компартменты, также с помощью различных подходов выявлен ряд каналов, обеспечивающих поступление Ca^{2+} в цитоплазму. Данные системы трансмембранного транспорта ионов характеризуются комплексной системой регуляции внутренними и внешними факторами. Такая регуляторная сеть позволяет эффективно модулировать вход и выход Ca^{2+} в цитоплазму, создавая сложную динамичную картину компартментации Ca^{2+} . Что, в свою очередь, необходимо для использования данного иона в качестве вторичного мессенджера, обеспечивающего передачу широкого спектра экзогенных сигналов и координирующего работу различных компонентов клетки (ион-транспортных систем, элементов цитоскелета, ферментов и пр.).

II. 1. 3. Регуляторная роль Ca^{2+} в процессе роста пыльцевой трубки

Ca^{2+} как универсальный вторичный мессенджер. Поскольку в высоких концентрациях Ca^{2+} проявляет цитотоксическое действие, обусловленное способностью преципитировать PO_4^{3-} , предполагается, что система внутриклеточного Ca^{2+} сигналинга возникла в ходе эволюции на основе системы поддержания низкой концентрации этого иона в цитозоле. Как и во всех живых клетках эукариот, в цитозоле пыльцевых трубок поддерживается крайне низкая концентрация Ca^{2+} ($\sim 10^{-9}$ М, 100 – 200 нМ) (Clapham, 2007; Edel and Kudla, 2015). Этот факт, а также сравнительно высокая концентрация этого иона во внеклеточной среде и во внутриклеточных компартментах ($\sim 10^{-6}$ – 10^{-3} М), создают предпосылки для функционирования Ca^{2+} в качестве универсального вторичного

мессенджера (Berridge et al., 2000). В современных клетках сложный пространственно-временной паттерн Ca^{2+} в цитозоле формируется в результате взаимодействия всех Ca^{2+} -транспортирующих систем клетки, которые вкратце были описаны выше.

Диффузионная аномалия Ca^{2+} . Кроме того, важной особенностью динамики данного иона в цитоплазме является его низкая мобильность внутри клетки (так называемая «диффузионная аномалия») (Bowler and Fluhr, 2000; Edel and Kudla, 2015). По имеющимся оценкам, опирающимся на эксперименты с диффузией меченного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в цитозоле ооцитов *Xenopus*, диффузия этого иона в цитозоле ограничена ближайшими 100 – 500 нм. При этом оценочное время нахождения Ca^{2+} в несвязанном с каким-либо буферным или регуляторным белком состоянии составляет около 50 μs (Allbritton et al., 1992; Clapham, 2007, 1995). Измерения показывают, что константа диффузии для Ca^{2+} зависит от степени насыщения кальций-буферных белков цитоплазмы и меняется в диапазоне от 15 до 65 $\mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ (Clapham, 1995). Предполагается, что по мере удаления от источника Ca^{2+} в цитоплазме могут существовать домены с высокой и пониженной концентрацией свободного иона; при этом в домене с пониженной концентрацией будут активированы только высокоафинные белки (Allbritton et al., 1992).

Специфичность Ca^{2+} -сигналинга. Считают, что специфичность $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ сигналов в отношении стимулов обеспечивается различиями между сигналами, инициированными разными стимулами, по амплитуде, частоте и локализации (Ge et al., 2007; Kudla et al., 2018). Таким образом, согласно современной парадигме, сформулированной ещё в 1990-х годах, в ответ на различные стимулы на разных этапах онтогенеза, при участии Ca^{2+} -транспортирующих систем плазмалеммы и мембран внутренних компартментов, формируются различные по своим пространственно-временным параметрам $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ -сигнатуры или $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ -подписи (Kudla et al., 2018; Webb et al., 1996; Медведев, 2005). Вероятно также, что уникальная $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ -сигнатура, складывающаяся под влиянием нескольких стимулов, действующих на клетку, обеспечивает интеграцию разных стимулов

(Edel and Kudla, 2016). Так например, выход Ca^{2+} из внутренних депо или его вход из апопласта в цитозоль приводит к быстрому увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, что служит важным элементом трансдукции внешних стимулов, таких, как абсцизова кислота (АБК), механическое давление и др. (Hepler et al., 2012).

Как обсуждалось выше, для пыльцевых трубок, как и для других полярно растущих клеток, характерно наличие осциллирующего градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в апикальной области, который, по-видимому, и следует считать типичной $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ -сигнатурой полярно растущей клетки.

Поддержание организации цитоскелета и везикулярного транспорта. Градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ играет ключевую роль в поддержании специфической организации цитоскелета и везикулярного транспорта в пыльцевой трубке. Высокие значения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ блокируют работу моторных белков и способствуют переходу актина, локализованного в апикальном домене, в глобулярную форму (Gu et al., 2005; Huang et al., 2004; Yokota et al., 2000). Хорошо известно, что Ca^{2+} играет ключевую роль в экзоцитозе в клетках животных (например при экзоцитозе нейромедиаторов в синапсах), в частности, за счёт деполяризации взаимодействующих мембран и взаимодействия с Ca^{2+} -связывающими белками. Предполагают, что высокие значения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в апексе пыльцевой трубки обеспечивают локальный (направленный) экзоцитоз, т.е. слияние везикул, содержащих материал клеточной оболочки, с плазмалеммой в точке роста (Campanoni and Blatt, 2007). Таким образом, Ca^{2+} является одним из центральных регуляторных элементов в полярно растущей клетке.

Восприятие и передача сигнала. На молекулярном уровне увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ при стимуляции приводит к активации целого ряда Ca^{2+} -зависимых регуляторных белков, которые образуют в клетке сложную сигнальную сеть, обеспечивающую декодирование Ca^{2+} сигнала (Dodd et al., 2010; Hashimoto and Kudla, 2011; Kudla et al., 2018). Области цитоплазмы, характеризующиеся стационарно повышенной концентрацией Ca^{2+} , как, например, апекс пыльцевой трубки, также содержит активированные Ca^{2+} -зависимые регуляторные белки. В

растительных клетках к таким регуляторным Ca^{2+} -сенсорам относят (Kudla et al., 2018):

1. Трансммиттеры в Ca^{2+} -регуляторной сети – Ca^{2+} -связывающие белки, не обладающие собственной ферментативной активностью, однако, изменяющие после связывания Ca^{2+} свою конформацию и способность к связыванию с другими клеточными компонентами.
 - кальмодулин (**CaM**; 7 генов и 4 изоформы у *Arabidopsis*);
 - кальмодулин-подобные белки (**calmoduline-like**, **CML**; 50 генов у *Arabidopsis*);
 - кальцинейрин B-подобные белки (**calcineurin B-like**, **CBL**; 10 генов у *Arabidopsis*);
2. Эффекторы Ca^{2+} -регуляторной сети – белки, обладающие собственной Ca^{2+} -зависимой энзиматической активностью, как правило, киназной:
 - CBL-взаимодействующие протеинкиназы (**CBL-interacting protein kinase**, **CIPK**; 26 членов этого семейства выявлено у *Arabidopsis*). Иногда из-за тесной функциональной связи CBL-CIPK комплекс рассматривают как бимолекулярный эффектор;
 - Ca^{2+} -кальмодулин регулируемые киназы (**Ca^{2+} -CaM regulated kinase**, **ССаМК**; у *Arabidopsis* не обнаружены, наиболее хорошо изучены у бобовых (например, выявлены у *Lotus japonicus*); принимают участие в функционировании арбускулярной микоризы и в процессе формирования корневых клубеньков);
 - наиболее хорошо изученная группа Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ (**Ca^{2+} -dependent protein kinases**, **CDPK** или **СРК**).

Следует отметить, что в эволюционной линии наземных растений наблюдается тенденция к уменьшению набора белков, генерирующих кальциевую подпись, при одновременном возрастания количества кальциевых сенсоров (Nashimoto and Kudla, 2011).

Для всех вышеперечисленных белков, за исключением CIPK, характерно наличие особого аминокислотного мотива, включающего две α -спирали (E и F),

фланкирующих петлю, которая и координирует в центре пентагональной бипирамиды ион Ca^{2+} . Такой мотив принято называть EF-руками. О важности белков с EF-руками в системе внутриклеточного сигналинга растений говорит то, что в геноме *Arabidopsis*, по разным данным, закодировано не менее 200 таких Ca^{2+} сенсоров (Day et al., 2002; Hashimoto and Kudla, 2011; McCormack et al., 2005).

Кальмодулины (CaMs) и кальмодулин-подобные белки (CMLs).

Кальмодулины представляют собой универсальное для всех эукариот семейство небольших белков с двумя парами EF-рук, изолированных друг от друга линкерным доменом (McCormack et al., 2005). Кальмодулины не обладают собственной ферментативной активностью, однако, после связывания Ca^{2+} в EF-мотивах белок претерпевает значительные конформационные перестройки. Кальмодулин-подобные белки в качестве единственных функциональных доменов имеют от одной до шести EF-рук и представляют собой филогенетически родственное кальмодулинам семейство (сходство аминокислотных последовательностей составляет не менее 16%) (McCormack et al., 2005). Ca^{2+} -зависимые конформационные перестройки кальмодулинов и кальмодулин-подобных белков обеспечивают их последующее связывание с белками-мишенями. Среди мишеней CaMs и CMLs выявлены: регуляторные киназы (в том числе некоторые MAPK, SIPK и CPK), фосфатазы, различные ион-транспортные белки (например, ряд каналов семейства CNGC), ферменты метаболических путей, белки цитоскелета и транскрипционные факторы (McCormack et al., 2005). Интересно, что некоторые кальмодулины могут играть роль Ca^{2+} -зависимых транскрипционных факторов, функционируя при этом в Ca^{2+} -регуляторной сети скорее не как трансмиттеры, а как эффекторы. Так, например, показано, что AtCaM7 в качестве транскрипционного фактора принимает участие в контроле фотоморфогенеза (Kushwaha et al., 2008).

Анализ гаметофитного транскриптома показывает, что в пыльце *Arabidopsis* экспрессируются специфичные гены ряда кальмодулин-подобных белков (CML2/6/21/25) (McCormack et al., 2005). Внутриклеточная локализация кальмодулина и кальмодулин-подобных белков была проанализирована при

временной экспрессии конструкций *LAT52::AtCaM3-GFP* и *LAT52::AtCML2/6/13/21/25/26/28/29/32* в пыльце табака (Zhou et al., 2009). Было показано, что все эти белки локализуются в цитоплазме, а при этом сверхэкспрессия *AtCML21* в табаке приводит к нарушению роста пыльцевой трубки.

Как упоминалось ранее в разделе, посвященном экспорту Ca^{2+} из цитозоля, CaM активирует работу Ca^{2+} -АТФаз из группы АСА (в частности, специфической для пыльцы изоформы АСА9) (Schjøtt et al., 2004). Ряд данных указывает на то, что активированный CaM контролирует динамику цитоскелета. Так, *in vitro* у *Lilium longiflorum* показано ингибирование кальмодулином актин связывающего белка (P-135-ABP), отвечающего за образование тяжелой актина в базальных частях трубки, при высоких значениях $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ (Yokota et al., 2000). Кроме того, активированный кальмодулин обеспечивает ингибирование каналов семейства CNGC, которые, как говорилось выше, играют важную роль в динамике $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ (Talke et al., 2003). Детальные особенности функционирования CaM и CML в мужском гаметофите изучены не достаточно.

Комплексы CBL-CIPK. CBL белки растений также, как кальцетейрины животных и грибов, имеют по 4 EF-руки, при этом сходство аминокислотных последовательностей растительных CBL и кальцетейринов В животных/грибов весьма ограниченное (20-30%) (Luan, 2008). Как было показано с применением двугибридного дрожжевого метода, CIPK формируют функциональные комплексы со специфическими CBL (Shi et al., 1999). Интересно, что у животных и грибов кальцетейрины В регулируют работу фосфатаз (кальцетейрины А), а не киназ, как у растений (Luan, 2008). Показано, что у растений в результате избирательной комбинаторики взаимодействий между белками из этих двух групп создается фундамент для трансдукции специфического сигнала в CBL/CIPK сети. Например, комплекс CBL1-CIPK1 участвует у *Arabidopsis* в обеспечении устойчивости к засухе и осмотическому стрессу, в то время как комплексы CBL4-CIPK24, CBL1-CIPK24 принимают участие в сигналинге при солевом стрессе (Batic and Kudla, 2004; Hashimoto and Kudla, 2011). Как видно из данного

примера, для CBL/CIPK регуляторной сети характерна не только функциональная специфичность, но и избыточность.

Для CIPK характерна модульная структура; каждая киназа из этого семейства включает: N-концевой серин/треонин-протеинкиназный домен, связывающий домен и специфический для CIPK C-концевой регуляторный домен, который, в свою очередь, состоит из авторегуляторного NAF домена и домена, взаимодействующего с фосфатазой (PPI домен). После взаимодействия CIPK и соответствующего CBL автоингибиторный NAF домен освобождает N-концевой киназный домен, что ведёт к фосфорилированию мишеней CIPK.

Вариабельный N-концевой фрагмент CBL определяет локализацию белка в клетке (Hashimoto and Kudla, 2011). Показано, что CBL могут быть локализованы в цитоплазме или нуклеоплазме. Кроме того, CBL может быть модифицирован липидами, что обеспечивает его заякоревание в определенном типе мембран (плазмалемма, тонопласт и др.). Так, гетерологическая транзientная экспрессия конструкции *LAT52::AtCBL1/4/8/9-GFP* в пыльце табака показывает локализацию *AtCBL1/4/9-GFP* в цитоплазме, а *AtCBL8-GFP* – исключительно в эндомембранах пыльцевой трубки (Zhou et al., 2009). Важно отметить, что взаимодействующая с CBL активная киназа CIPK также будет локализована вблизи мембраны, в которой заякорен CBL, несмотря на то, что конъюгат CIPK-GFP может демонстрировать нуклео- или цитоплазматическую локализацию (Angelo et al., 2006; Batistic et al., 2010). Таким образом, CBL на субклеточном уровне таргетирует CIPK и обеспечивает локальный характер сигналинга. При этом одна и та же киназа (CIPK) может таргетироваться разными CBL в разные компартменты (Hashimoto and Kudla, 2011).

Многие комплексы CBL-CIPK контролируют работу ионных каналов. Так, например, ведётся активное изучение киназы CIPK23, которая является мастер-регулятором в контроле восприятия и поглощения минеральных элементов корнями. Показано, что CIPK23 путем фосфорилирования может, с одной стороны, ингибировать поглощение NH_4^+ (через транспортер AMT1;2), а, с другой стороны, активировать поглощение NO_3^- (через транспортер NRT1.1), Fe^{2+}

(предположительно, через транспортер IRT) и K^+ (через транспортеры НАК5 и АКТ1/AtKC1) (Kudla et al., 2018).

В мужском гаметофите *Arabidopsis* показана экспрессия 4 из 10 генов сенсоров семейства CBL (CBL1/2/3/9) и 5 из 26 киназ семейства СІРК (СІРК10/11/12/14/19) (Angelo et al., 2006; Konrad et al., 2011; Mähns et al., 2013; Michard et al., 2017; Wang et al., 2008; Zhou et al., 2015). При гетерологической сверхэкспрессии *AtCIPK10/12/14/19* в табаке происходит укорочение и увеличение диаметра пыльцевых трубок, хотя при экспрессии *AtCIPK11* трубки сохраняют нормальный фенотип (Steinhorst et al., 2015; Zhou et al., 2015). Приблизительные функции в мужском гаметофите выявлены для сенсоров CBL1/9, для комплекса CBL2/3-СІРК12 и для СІРК19.

Транзиентная экспрессия репортерных конструкций *LAT52::AtCBL1-mVenus*, *LAT52::AtCBL1/9-mCherry* в пыльце табака показывает, что коньгаты CBL1/9 с репортерами локализуются в плазмалемме и эндоцитозных везикулах апикального конуса (Mähns et al., 2013). При сверхэкспрессии CBL1/9 в табаке происходит нарушение полярности роста (увеличение диаметра, уменьшение длины и формирование апикального вздутия). В аналогичных экспериментах сверхэкспрессия *CBL7* (сходство аминокислотной последовательности продукта с CBL1 составляет 51%) не приводила к видимым изменениям фенотипа пыльцевых трубок, что говорит о специфичности действия CBL1/9. Установлено, что обязательным условием функционирования CBL1 является его миристоилирование/пальмитилирование, поскольку гетерологическая сверхэкспрессия конструкции *LAT52::CBL1G2A-mCherry*, с мутацией в гене *CBL1* по сайту, в котором происходит посттрансляционное присоединение липидов, не ведет к фенотипическим изменениям, а продукт локализуется в цитоплазме. Также было продемонстрировано, что линии арабидопсис со сверхэкспрессией *CBL1/9 (CBL1/9 oex)* и двойные Т-инсерционные мутанты (*cbll/cbl9*) характеризуются сниженным прорастанием на среде с высоким и низким содержанием K^+ , соответственно. В связи с этим, вероятно, что данные Ca^{2+} -сенсоры являются положительными регуляторами поступления K^+ в пыльцу.

Поскольку одинарные мутанты *cbll* и *cb19* не отличаются по эффективности прорастания от контроля, можно предположить, что функции CBL1 и CBL9 частично перекрываются. Известно, что в корневой системе CBL1/9 вместе с SIPK23 контролируют работу K⁺ канала Shaker типа AKT1 (Mouline et al., 2002). В связи с этим высказывается предположение, что в мужском гаметофите CBL1/9 могут контролировать работу гомологичного канала – SPIK (Mähns et al., 2013). Также возможно, что CBL1/9 опосредованно через киназу SIPK контролируют работу NADPH-оксидазы (Drerup et al., 2013). В настоящий момент данные гипотезы о функциях CBL1/9 остаются не подтвержденными.

CBL2/3-SIPK12. С использованием GUS репортера показано, что в группу специфичных для мужского гаметофита арабидопсиса кальценырин В-подобных белков входят CBL2 и CBL3 (сходство аминокислотных последовательностей составляет 92%) (Steinhorst et al., 2015). Установлено, что экспрессия *CBL3* превышает экспрессию *CBL2*. С применением генетического подхода показано, что снижение прорастания *in vitro* происходит у одинарного мутанта *cb13*, а также у двойного мутанта с потерей функции *cb12/3lf*; при этом у одинарного мутанта *cb12* и частичного двойного мутанта *cb12/3rf* (сохраняется до 15% транскриптов *CBL2*) статистически значимого снижения прорастания не зафиксировано. При опылении *in vivo* растений дикого типа пыльцой двойного мутанта *cb12/3lf* прорастание также было снижено, а семенная продуктивность резко падала. Данные результаты указывают на частичное перекрывание функций CBL2/3, при этом, вероятно, CBL3 играет ключевую роль. Транзиентная сверхэкспрессия *AtCBL2/3-mCherry* в пыльцевых трубках табака показывает, что оба белка локализируются в тонопласте, при этом происходит избыточная вакуолизация пыльцевых трубок. При экспрессии конструкции *AtCBL3mut-mCherry* с мутацией в сайте пальмитилирования CBL3 пыльцевые трубки табака сохраняют нормальный фенотип (Steinhorst et al., 2015). Следует отметить, что в вышедшей почти в то же время работе Zhou с соавторами, с применением в качестве репортера GFP (экспрессия конструкции *LAT52::AtCBL2/3-GFP* в табаке), показали локализацию *AtCBL2/3-GFP* не только в эндомембранах, но и в

апикальной части плазмалеммы (Zhou et al., 2009). Возможно, различия в субклеточной локализации CBL2/3 связаны с применением разных репортеров (данный вопрос, к сожалению, не обсуждался авторами более поздней публикации). Для двойного мутанта с потерей функции *cbl2/3lf*, а также для пыльцевых трубок со сверхэкспрессией данных сенсоров (*CBL2oex* и *CBL3oex*) характерно сходное нарушение морфологии вакуолярного домена и роста пыльцевой трубки (Steinhorst et al., 2015). Такой результат указывает на тонкость и чувствительность системы контроля состояния вакуолярного компартмента с участием данных регуляторных белков. Как показывают данные двугибридного дрожжевого метода и BiFC (бимолекулярной комплементации флуоресценции), партнером CBL2/3 в мужском гаметофите служит киназа CIPK12 (Steinhorst et al., 2015). Активная экспрессия CIPK12 в пыльце показана с применением репортера GUS. У мутанта *cipk12* происходит нарушение прорастания пыльцы как *in vitro* так и *in vivo*. Гетерологическая транзientная сверхэкспрессия функциональной киназы (*AtCIPK12*) в табаке приводит к укорочению пыльцевой трубки и её расширению; при этом конъюгат *AtCIPK12-mCherry* или GFP локализуется в цитоплазме (Steinhorst et al., 2015; Zhou et al., 2015). Поскольку, как говорилось выше, CBL таргетируют CIPK то, логично, что коэкспрессия *AtCBL3-mCherry* и *AtCIPK12-mVenus* в пыльцевых трубках табака приводит к локализации обоих белков в тонопласте; при этом наблюдается избыточная вакуолизация и нарушение роста пыльцевых трубок. При дальнейшем функциональном анализе было показано, что изменения работы комплекса CBL2/3-CIPK12 не приводят к изменениям: ядерного аппарата, динамики актинового цитоскелета, паттерна содержания $PI(4,5)P_2$ в мембране и к изменениям динамики апикального градиента $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Steinhorst et al., 2015). Таким образом, единственной выявленной функцией комплекса CBL2/3-CIPK12 на настоящий момент является контроль состояния вакуолярного компартмента пыльцевой трубки (Steinhorst et al., 2015). При этом данный регуляторный комплекс работает, по-видимому, отчасти автономно от апикального осциллирующего градиента $[Ca^{2+}]_{cyt}$. До выяснения мишеней CIPK12 нет ясности в вопросе, осуществляется ли такая

регуляция через модуляцию работы ион-транспортных систем тонопласта или комплекс CBL2/3-CIPK12 непосредственно контролирует формирование вакуолярного компартмента (Схема III).

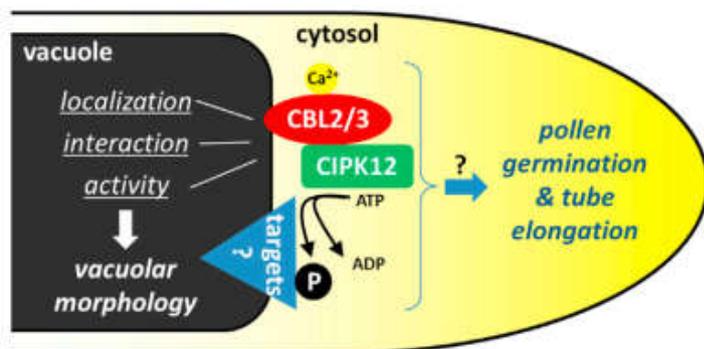


Схема III. Ca^{2+} -зависимое функционирование комплекса CBL2/3 и CIPK12 в тонопласте, вероятно, ведет к фосфорилированию мишеней, и тем самым контролирует состояние вакуолярного компартмента (Steinhorst et al., 2015).

CIPK19. Среди вышеперечисленных CIPK, характерных для мужского гаметофита, исключительно в пыльце экспрессируется *CIPK19* (Zhou et al., 2015). Как говорилось выше, гетерологическая временная сверхэкспрессия *AtCIPK19* в табаке ведет к нарушению паттерна роста, однако, экспрессия конститутивно активной киназы, с удаленным регуляторным доменом (CA-CIPK19), приводит к ещё более выраженному нарушению полярного роста: происходит набухание апекса (Zhou et al., 2015). Т-инсерционный нокаутный мутант *cipk19* характеризуется сильным нарушением морфологии пыльцевых трубок и замедлением полярного роста как в условиях *in vitro*, так и при опылении *in vivo*. Реципрокные скрещивания показывают, что при опылении растений дикого типа (*CIPK19/CIPK19*) пылью гетерозигот *cipk19/CIPK19* происходит отклонение от менделевских закономерностей наследования (1:1), поскольку пыльцевые трубки с нокаутным аллелем *cipk19* менее конкурентноспособны (передают свой вариант гена только в 29% случаев) (Zhou et al., 2015). При этом семена, несущие нокаутный аллель *cipk19*, располагаются преимущественно в дистальной части стручка, т.к. вероятность трубок с геном *cipk19* дорасти и оплодотворить зародышевые мешки в основании завязи снижена. Ряд экспериментов демонстрирует, что CIPK19 участвует в контроле входящего Ca^{2+} -тока в апексе пыльцевой трубки и формировании градиента. Так, у пыльцевых трубок табака с

транзистентной сверхэкспрессией *CIPK19* обнаруживается увеличение апикального домена с высоким значением $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$, а восстановление параметров роста происходит при понижении содержания $[Ca^{2+}]_{\text{ex}}$ или при добавлении ингибитора Ca^{2+} -проводящих каналов $LaCl_3$. С другой стороны, пыльцевые трубки нокаутного мутанта арабидопсис *cipk19* восстанавливают рост при высоких значениях $[Ca^{2+}]_{\text{ex}}$ (Zhou et al., 2015). Таким образом, опираясь на установленные факты, можно заключить, что мишенью для CIPK19 является один или несколько Ca^{2+} -проводящих каналов, которые ещё предстоит выявить, наряду спартнером CIPK19 из семейства кальценейрин В-подобных белков.

Кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK или CPK). Все белки семейства CDPK имеют сходную доменную организацию: N-концевой вариабельный домен, серин/треонин протеинкиназный домен, псевдосубстратный сегмент и Ca^{2+} -связывающий домен (4 EF-руки, содержащие кальмодулин-подобный домен CDL). Пока киназа CDPK находится в неактивном состоянии, её псевдосубстратный сегмент связан с киназным доменом. Связывание Ca^{2+} с CDL доменом ведёт к конформационным перестройкам, в результате которых псевдосубстратный сегмент выталкивается из киназного домена, и последний активируется. Кроме того, дальнейшее автофосфорилирование CDPK приводит к полной её активации (Edel and Kudla, 2015b; Hashimoto and Kudla, 2011). Показано, что для CDPK характерно миристинилирование или S-ацилирование N-конца. Известно, что такие посттрансляционные модификации приводят к заякореванию белков в плазматической мембране или в мембранах клеточных компартментов. Однако, показано, что ряд CDPK локализованы в цитоплазме или нуклеоплазме (Hashimoto and Kudla, 2011).

Субклеточная локализация специфичных для пыльцы CDPK изучалась путём транзистентной гетерологической экспрессии конструкции *LAT52::AtCDPK14/17/32/34-GFP* в табаке (Zhou et al., 2009). Было показано, что CDPK14/17/32/34-GFP равномерно распределены в цитоплазме, а CDPK24-GFP локализуется в генеративной клетке (на более поздних стадиях – в спермиях) и вегетативном ядре. При этом при сверхэкспрессии CDPK14/32/34 происходило

нарушение фенотипа пыльцевой трубки (замедление, как правило, сопряженное с увеличением ширины трубки). Данные результаты свидетельствуют о важной роли вышеперечисленных Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ в контроле полярного роста пыльцевой трубки.

CDPK32. При гетерологической сверхэкспрессии CDPK32 в пыльцевых трубках табака происходит увеличение апикального домена с высоким значением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Zhou et al., 2014). Применение двугибридного дрожжевого метода позволило установить, что мишенью для CDPK32 является канал CNGC18, который, как упоминалось выше, экспрессируется в пыльце и играет важную роль в нормальном развитии мужского гаметофита. Гетерологическая сверхэкспрессия *AtCNGC18-YFP* позволила показать локализацию конъюгата в апексе плазматической мембраны пыльцевой трубки табака, при этом, также как при сверхэкспрессии CDPK32, наблюдалось укорочение и увеличение диаметра трубок с увеличением апикального домена с высоким $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. FRET-анализ показывает, что при гетерологической коэкспрессии *AtCNGC18-YFP* и *AtCDPK32-CFP* в пыльце табака происходит перенос энергии и отмечается флуоресценция в апикальной части плазматической мембраны, что говорит о прямом взаимодействии между CDPK32 и CNGC18 в данном регионе. Коэкспрессия *AtCNGC18* и *AtCDPK32* в ооцитах *Xenopus* позволяет зарегистрировать интенсивный Ca^{2+} ток, статистически достоверно превышающий ток, который регистрируется при экспрессии только *AtCNGC18*. Все эти факты в сумме убедительно показывают, что CDPK32 служит положительным Ca^{2+} -зависимым регулятором работы канала CNGC18. Таким образом, вырисовывается один из регуляторных контуров с положительной обратной связью, в котором высокие значения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в апикальном домене приводят к активации CDPK32, которая, в свою очередь (по-видимому, путём фосфорилирования), активирует канал CNGC18, обеспечивающий входящий ток Ca^{2+} и увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Очевидно, должны существовать и регуляторные контуры с отрицательной обратной связью, обеспечивающие снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в апикальном домене, однако пока они экспериментально не выявлены.

В целом можно заключить, что Ca^{2+} , по-видимому, принадлежит лидирующая и организующая роль в ионной регуляции развития мужского гаметофита. В разделах обзора ниже, посвященных K^+ и $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ приводятся дополнительные примеры выявленных регуляторных контуров, включающих модуль: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}} \rightarrow \text{СРК}$.

II.2. Гомеостаз, транспорт и градиент H^+ в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки

II.2.1. Градиент внутриклеточного рН и механизмы его поддержания

Важную роль в росте пыльцевой трубки играет величина рН цитозоля и трансмембранные токи H^+ . В работе Feijó с соавторами с использованием рН-чувствительного красителя BCECF, связанного с декстраном, в растущей пыльцевой трубке был выявлен градиент рН сложной формы (Feijó et al., 1999). В апикальной части трубки рН оказался кислый (6.8), в основании прозрачной области находился «щелочной пояс» со значением рН = 7.5. В «более базальной» части пыльцевой трубки рН был нейтральный. Формирование «щелочного пояса» оказалось связано с активностью H^+ -АТФазы, тогда как кислые значения рН в апикальной части могут быть обусловлены входом протонов через низкоселективные катионные каналы (Hepler et al., 2006). На это указывает совпадение фаз колебаний рН и $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$: по-видимому, вход H^+ и Ca^{2+} осуществляется через одну и ту же транспортную систему. Также вход протонов может быть опосредован транспортерами семейства СНХ. На эту возможность указывают данные транскриптомного анализа: гены семейства СНХ активно экспрессируются в пыльце (Michard et al., 2009). Также показано, что в полярном росте корневых волосков принимает участие K^+ - H^+ котранспортер TRH1 (Carol and Dolan, 2002; Pina and Pinto, 2005).

Таким образом, можно говорить о циркуляции H^+ в растущей пыльцевой трубке: пассивный вход происходит в апикальной части, активный выход – в области «щелочного пояса». С помощью ингибиторного анализа показано, что

поддержание кислых значений рН в апикальной области пыльцевой трубки необходимо для её роста (Hepler et al., 2006).

II.2.2. Система транспорта H^+

H^+ -АТФаза плазмалеммы растительной клетки является главной электрогенной силой, обеспечивая поддержание на мембране $\Delta\mu H^+$. Протонная помпа выполняет две основные функции: регуляция мембранного потенциала и контроль рН цитоплазмы. В ряде работ была выявлена прямая зависимость между активностью протонной помпы и скоростью роста пыльцевой трубки: подавление активности H^+ -АТФазы специфичным ингибитором ортованадатом приводило к подавлению роста, в то время как ее активация фузикокином стимулировала рост (Feijó et al., 1992; Matveeva et al., 2002).

Pertl с соавторами показали участие H^+ -АТФазы в регуляции тургорного давления в растущей пыльцевой трубке лилии (Pertl et al., 2010). При снижении тургорного давления в результате гиперосмотического шока увеличивалось содержания 14-3-3 белка, активирующего протонную помпу, и возрастала её активность (регистрировалось закисление внешней среды). По предположению авторов, активация H^+ -АТФазы приводит к гиперполяризации плазматической мембраны и входу ионов, что увеличивает осмотическое давление цитоплазмы. Увеличение осмотического давления цитоплазмы приводит к входу воды в клетку, и, следовательно, к восстановлению тургорного давления.

Регуляция активности протонной помпы осуществляется с участием 14-3-3 белка. Он был обнаружен с помощью моноклональных антител в микросомальной фракции, выделенной из пыльцевых зёрен и пыльцевых трубок *Lilium longiflorum* (Pertl et al., 2001).

Локализация протонной помпы в мембране вегетативной клетки пыльцевой трубки изучалась несколькими методами. Obermeyer с соавторами с использованием моноклональных антител впервые продемонстрировали полярное распределение H^+ -АТФазы в пыльцевом зерне *Lilium longiflorum* (Obermeyer et al., 1992). Certal с соавторами изучали распределение конъюгата H^+ -АТФазы NtАНА

с флуоресцентной меткой GFP в пыльцевой трубке табака (Cortal et al., 2008): было показано, что NtАНА отсутствует в апикальной части трубки. Оба результата свидетельствуют в пользу предположения, что полярные токи H^+ , поддерживаются, главным образом, благодаря полярному распределению H^+ -АТФазы, а не регуляции её активности.

II.3. Транспорт K^+ и его значение в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки

K^+ играет важную роль в процессах прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. В нашей лаборатории было показано, что при активации пыльцевого зерна как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, происходит выход K^+ (Брейгина и др., 2012). При этом ингибитор калиевых каналов ТЕА подавлял выход K^+ и снижал процент активированных клеток. Данные результаты хорошо согласуются с представлениями об участии K^+ в регуляции синтеза белка, которые мы коротко рассмотрим ниже.

Связь концентрации K^+ в цитоплазме и интенсивности синтеза белка на рибосомах была изучена более 30 лет назад в работе Bashe и Mascarenhas на *Tradescantia paludosa* (Bashe and Mascarenhas, 1984). В бесклеточной трансляционной системе было показано, что оптимальная для синтеза белка концентрация K^+ составляет 100-130 мМ. При концентрации K^+ более 220 мМ трансляция блокируется, поскольку K^+ препятствует связыванию мРНК с рибосомами. Таким образом, высокие концентрации K^+ в дегидратированном пыльцевом зерне (> 280 мМ) препятствуют инициации трансляции, а выход K^+ в процессе прорастания является необходимым условием для сборки полисом и активации синтеза белка. Кроме того, в данной работе была показана различная чувствительность мРНК к высоким концентрациям K^+ . Это позволяет предполагать, что постепенное снижение концентрации K^+ может избирательно запускать трансляцию различных мРНК.

В ранней работе Weisenseel и Jaffe с помощью микроэлектродов был показан вход K^+ в апикальную часть пыльцевой трубки *Lilium longiflorum* и выход

из базальной её части (Weisenseel and Jaffe, 1976). В дальнейшем системы транспорта K^+ активно изучались методом пэтч-кламп на протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен и трубок.

Так, Fan с соавторами охарактеризовали выходные K^+ каналы в протопластах из пыльцы *Brassica chinensis* и исследовали зависимость их активности от величины наружного и внутриклеточного pH (Fan et al., 2003). В работе было показано, что активность выходных K^+ каналов уменьшается при закислении наружной среды (до pH = 4.5), однако при pH > 5.8 активность каналов не чувствительна к этому показателю.

В протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен *Lilium longiflorum*, были обнаружены три типа K^+ каналов с разной проводимостью (Obermeyer and Blatt, 1993). Наиболее часто встречались каналы с проводимостью 19 pS, для которых была характерна активация при увеличении цитозольной концентрации Ca^{2+} . Dutta и Robinson в протопластах, выделенных из того же объекта, обнаружили механочувствительные K^+ каналы, которые активировались при растяжении мембраны (Dutta and Robinson, 2004). Также были выявлены каналы, нечувствительные к растяжению. Каналы, нечувствительные к растяжению, были равномерно распределены в мембране протопласта, а механочувствительные каналы обнаруживались на участке мембраны, предположительно, расположенном под апертурой пыльцевого зерна (при прорастании данный участок формирует апекс пыльцевой трубки).

SPIK и его гомологи, вероятно, основные каналы для входа K^+ в пыльцевое зерно. Fan с соавторами охарактеризовали входные K^+ каналы плазмалеммы в протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен *Brassica chinensis* (Fan et al., 1999). Было показано, что каналы активируются при гиперполяризации и обладают высокой селективностью к K^+ , по сравнению с такими моновалентными катионами, как Cs^+ и Na^+ . Добавление Ba^{2+} приводило к ингибированию каналов. Также были проведены опыты по изучению Ca^{2+} -регуляции каналов, однако, влияния внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на активность данных каналов обнаружено не было. В другой работе те же авторы

изучали влияние K^+ на рост пыльцевых трубок *Arabidopsis* и входные K^+ каналы в протопластах из пыльцевых зёрен (Fan et al., 2001). Входные токи K^+ , обнаруженные методом пэтч-кламп в конфигурации «whole cell», были, как и в случае *Brassica chinensis*, нечувствительны к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , однако ингибировались при высоких концентрация Ca^{2+} во внешней среде (10-50 мМ).

В работе Mouline с соавторами в пыльцевом зерне *Arabidopsis* был идентифицирован входной K^+ -канал Shaker-типа, SPIK, специфически экспрессирующийся в пыльце (Mouline et al., 2002). Было показано, что ряд характеристик SPIK (кинетика активации, чувствительность к внутриклеточному рН и внеклеточному Ca^{2+}) близки характеристикам входного K^+ -тока, записанного в работе Fan с сотрудниками. Таким образом, SPIK, по-видимому, является основным каналом, обеспечивающим вход K^+ в пыльцевой трубке *Arabidopsis*. SPIK является потенциал-зависимым каналом и активен при величине потенциала ниже чем -100 мВ (Becker et al., 2004).

Zhao с соавторами изучали регуляцию входных K^+ каналов Shaker-типа в пыльцевых трубках *Arabidopsis* (Zhao et al., 2013). С использованием пэтч-кламп метода в конфигурации «whole cell» на субпротопластах, выделенных из пыльцевых трубок, было обнаружено, что увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ингибировало вход K^+ . Следует отметить, что в данной работе также проводились исследования влияния $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ на вход K^+ в протопластах из пыльцевых зёрен, и результаты были аналогичны работам Fan с сотрудниками (1999, 2001): влияния $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ зарегистрировано не было. Таким образом, чувствительность к $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ появлялась после прорастания. При поиске возможных посредников между $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ и калиевыми каналами было обнаружено, что мутации с потерей функции в генах Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ, *CPK11* и *CPK24*, приводили к отсутствию ингибирования входа K^+ высокими $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ в субпротопластах из пыльцевых трубок. С использованием методов бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC) и ко-иммунопреципитации было продемонстрировано, что между *CPK11* и *CPK24* происходит прямое взаимодействие *in vivo*. Также было

обнаружено, что СРК11 может фосфорилировать N-концевой домен СРК24 *in vitro*. Таким образом, авторы предлагают модель следующего сигнального каскада, функционирующего в растущей пыльцевой трубке: $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{СРК11} \rightarrow \text{СРК24} \rightarrow \text{K}^+$ канал Shaker-типа (SPIK) (*Схема IV*).

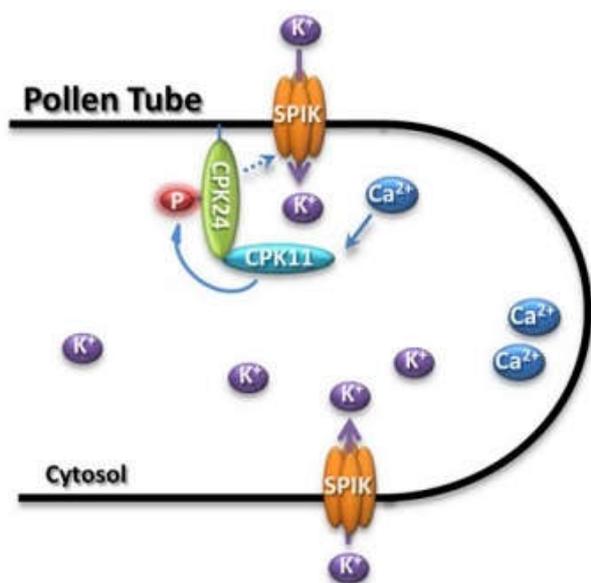


Схема IV. Вероятная модель регуляции канала K^+ канала SPIK в пыльцевой трубке (Zhao et al., 2013). СРК11 и СРК24 - Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, образующие сигнальный каскад, активируют K^+ канал SPIK. Фосфорилирование SPIK под действием СРК24 не доказано (пунктирная стрелка).

Поскольку у мутантов *spik-1* прорастание пыльцевых зёрен было заблокировано лишь частично, можно было предположить, что, помимо SPIK-1, в входе K^+ принимают участие и другие каналы (Mouline et al., 2002). В качестве претендентов на эту роль рассматривают каналы семейства ТРК. Веcker с соавторами показали высокий уровень экспрессии гена *AtTRK4* в пыльце и изучили свойства данного канала (Becker et al., 2004). Было показано, что он является потенциал-независимым, а также регулируется внеклеточным Ca^{2+} и величиной рН цитоплазмы. Предполагается, что ингибирование канала при кислых значениях рН цитоплазмы, в частности, в апексе пыльцевой трубки, предотвращает выход K^+ и, предположительно, контролирует величину мембранного потенциала в этой области (Becker et al., 2004).

II.4. Транспорт анионо в Cl⁻/NO₃⁻, их градиент и роль в процессе роста пыльцевой трубки

Известно, что трансмембранный анионный транспорт играет важную роль в ряде физиологических процессов, таких, как закрывание устьиц, поглощение элементов минерального питания корнями и их транспорт по растению. Ключевыми неорганическими анионами в растениях являются NO₃⁻, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, а к важнейшим органическим ионам относятся малат и цитрат (Barbier-Brygoo et al., 2000; Roberts, 2006).

Матвеева с соавторами с помощью ингибиторного анализа показали значение трансмембранного транспорта Cl⁻ в процессе прорастания пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* (Matveeva et al., 2003; Матвеева и др., 2003): блокаторы анионных каналов (NPPВ и нуфлимовая кислота) в низких концентрациях полностью подавляли прорастание.

Токи Cl⁻ в растущей пыльцевой трубке были впервые исследованы с использованием метода ионоселективных электродов (Zonia and Cordeiro, 2002). Было показано, что в апикальной части трубки происходит осциллирующий выход Cl⁻, а базальнее «прозрачной зоны» происходит вход Cl⁻. Таким образом, Cl⁻ циркулирует в пыльцевой трубке от базальной части к апикальной. Совпадение по частоте осцилляций выходных токов Cl⁻ в апексе и скорости роста пыльцевой трубки подчеркивает участие Cl⁻ в процессе роста. Было показано, что NPPВ (20 μM), нуфлимовая кислота (40 μM) и другой ингибитор анионных каналов – DIDS (80 μM) эффективно блокируют рост пыльцевых трубок и вызывают их набухание. При воздействии DIDS плазмалемма пыльцевых трубок лопалась в течение 5-10 минут, что говорит об участии анионных каналов в осморегуляции. В работах Брейгиной с соавторами были обнаружены и другие эффекты ингибиторов анионных каналов: нарушение компартментации органелл и везикулярного транспорта при действии NPPВ (Брейгина и др., 2009), гиперполяризация внутренней мембраны митохондрий и изменение содержания в них АФК под влиянием DIDS (Брейгина и др., 2010). Изучение мембранного потенциала пыльцевой трубки при воздействии ингибиторов показало, что

чувствительные к NPPВ анионные каналы принимают участие в регуляции данного показателя (Брейгина и др., 2010). Чтобы исключить возможность побочного действия ингибиторов, проводили блокировку выхода Cl^- путем выравнивания его концентрации по обе стороны мембраны (без применения ингибиторов). Было показано полное подавление прорастания пыльцевых зерен при концентрации Cl^- в среде 200 мМ и остановка роста пыльцевых трубок при 100 мМ Cl^- (Брейгина и др., 2009). Таким образом, показано участие анионных каналов в осморегуляции, регуляции мембранного потенциала и контроле других жизненно важных показателей в растущей пыльцевой трубке.

Tavares с сотрудниками охарактеризовали анионные токи в протопластах, выделенных из пыльцевых зёрен лилии, методом пэтч-кламп в конфигурации «whole cell» (Tavares et al., 2011). Выходной ток анионов включал три компонента, различающихся по степени динамической инактивации («run down») и чувствительности к NPPВ. Все обнаруженные токи модулировались изменением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

Для исследования возможных путей регуляции анионных каналов Zonia с соавторами использовали инозитол-3,4,5,6-тетрафосфат (IP_4) – негативный регулятор анионных каналов в клетках человека (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.

В работе Gutermuth с соавторами исследовали участие анионных каналов в росте пыльцевой трубки и регуляцию их работы (Gutermuth et al., 2013). В работе использовали Cl^- -чувствительный белковый сенсор, в основе функционирования которого лежит возможность переноса энергии возбуждения по механизму Фёрстера (FRET) в конструкции из цианового и желтого флуоресцентных белков (CFP-YFP). Транзиентная экспрессия сенсора в пыльцевых трубках табака позволила выявить специфический градиент анионов. Максимальной концентрация анионов была на среднем участке пыльцевой трубки (отрезок 20 – 50 μM от кончика), в то время как в апексе, субапикальном регионе ($< 10 \mu\text{M}$ от

кончика) и в базальной части ($> 50 \mu\text{M}$ от кончика) концентрация анионов была невысока. Следует отметить, что при росте трубок на среде с высокой концентрацией Cl^- содержание анионов в цитозоле увеличивалось, однако выше описанный градиент сохранялся. При добавлении в среду выращивания NPPV градиент концентрации анионов нарушался и рост пыльцевых трубок ингибировался. Важным аспектом наличия градиента анионов является теоретически предсказанное существование градиента водного потенциала, который обеспечивает осмофоретическое продвижение везикул в апексе растущей пыльцевой трубки (Lipchinsky, 2018, 2015).

Методом количественной ОТ-ПЦР были идентифицированы два гена анионных каналов, экспрессирующиеся в пыльцевых трубках *Arabidopsis*: *SLAH3* и *ALMT12* (Gutermuth et al., 2013). Они принадлежат к двум разным семействам анионных каналов, отличающихся своей кинетикой: *SLAH3* является каналом S-типа (с медленной деактивацией), а *ALMT12* - каналом R-типа (с быстрой деактивацией). С помощью флуоресцентной метки была показана равномерная мембранная локализация *SLAH3*. Это указывало на то, что полярные анионные токи поддерживаются в результате регуляции активности *SLAH3*, а не за счет его полярного распределения. В качестве кандидатов на роль регуляторов рассматривались протеинкиназы CDPK2/20. С помощью комплекса методов было показано специфическое белок-белковое взаимодействие между протеинкиназами CDPK2/20, заякоренными в плазмалемме, и каналом *SLAH3*, приводящее к его активации. В недавней работе Gutermuth с коллегами с применением метода двухэлектродной фиксации потенциала был уточнен характер функциональной связи между градиентами $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ и $[\text{anion}]_{\text{cyt}}$ (Gutermuth et al., 2018). Впервые путём одновременной электрофизиологической стимуляции пыльцевой трубки табака (на расстоянии примерно $120 \mu\text{M}$ от апекса) и съёмки флуоресценции Ca^{2+} -сensors YC3.6 удалось контролировать апикальный градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ при воздействии на потенциал. В результате было установлено, что импульсная гиперполяризация мембраны до -200 mV в течение 1 с вызывает активацию Ca^{2+} -проводящих каналов, вход Ca^{2+} и рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Индуцированное

гиперполяризацией увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ успешно блокировалось при перфузии в цитоплазму трубки ингибитора катионных каналов $LaCl_3$. Деполяризующие импульсы (+80 мВ) не приводили к росту $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$. Одновременная с электростимуляцией регистрация флуоресценции белкового анионного сенсора позволила показать сопряженную с увеличением $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ утечку анионов в субапикальном регионе. С помощью арсенала молекулярно-биологических методов в комбинации с электрофизиологическими измерениями было показано, что в активации SLAH3, помимо уже установленных кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK2/20), также принимает участие киназа CDPK6. Было показано, что в пыльце *Arabidopsis* экспрессируется не только *ALMT12*, но также и другие представители клады 3 данного семейства (*ALMT11/13/14*) – продукты этих генов локализуются в плазмалемме. Интересно, что в мужском гаметофите также были обнаружены транскрипты генов *ALMT3/4/5* (клада 2 в семействе ALMT), данные каналы располагаются в тонопласте, и их функции пока не выяснены. Использование методов обратной генетики в комбинации с электрофизиологическими измерениями позволило показать, что CDPK2/20/6 контролируют работу не только SLAH3, но и вышеперечисленных каналов R-типа (*ALMT12* и гомологи) (Gutermuth et al., 2018). В результате авторы приходят к модели, которая обобщает полученные результаты и связывает градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ и характер распределения анионов в пыльцевой трубке (*Схема V*).

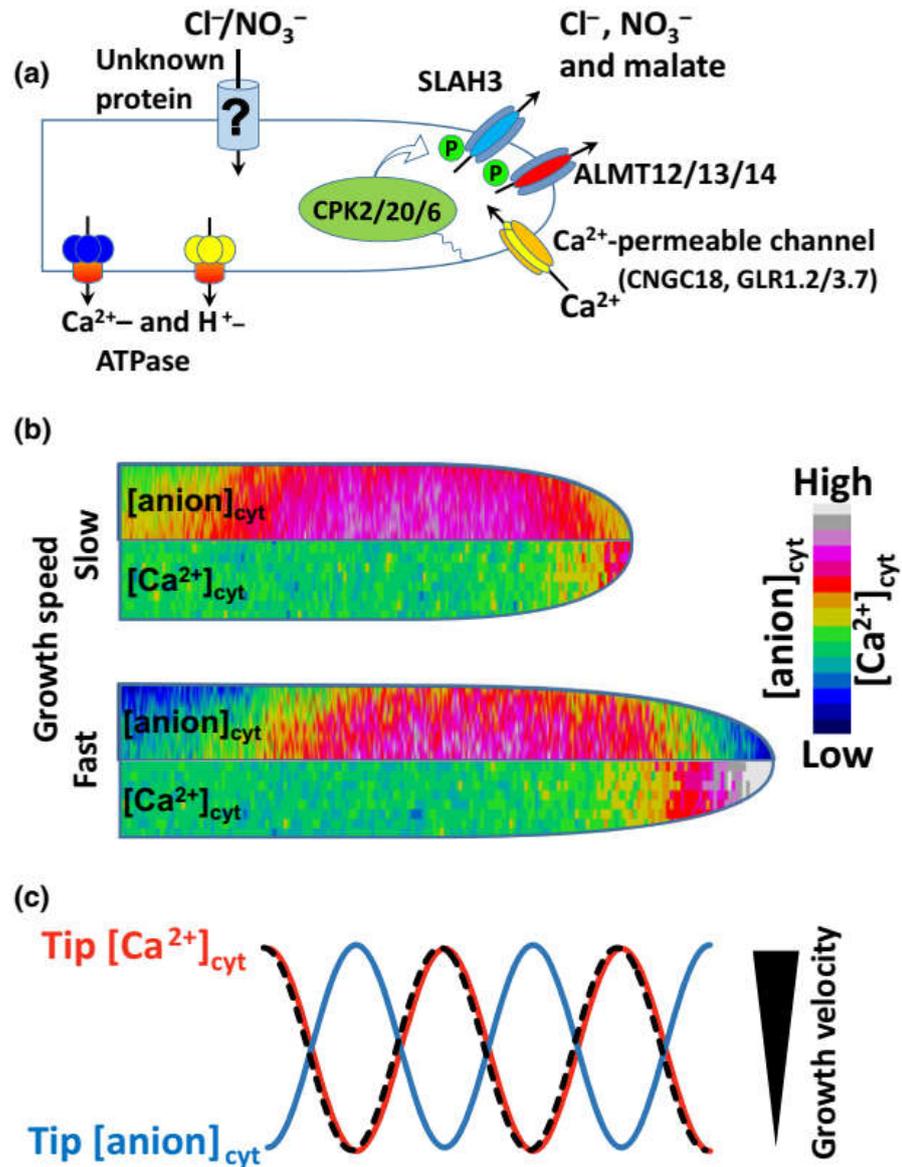


Схема V. (a) Модель регуляции анионных каналов плазмалеммы S-типа (SLAH3) и R-типа (ALMT12/13/14), связывающая градиент концентрации анионов $[\text{anion}]_{\text{cyt}}$ и $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Gutermuth et al., 2018). Заякоренные в апикальной части мембраны пыльцевой трубки Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CPK2/20/6), в условиях высокой $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, активируют путём фосфорилирования анионные каналы, что приводит к утечке анионов и снижению концентрации анионов в апикальной части. Вход анионов происходит в более базальной части с участием неизвестного транспортера (обозначен вопросительным знаком). Апикальный градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ поддерживается благодаря входу Ca^{2+} через Ca^{2+} -проводящие каналы (CNGC18, GLR1.2/3.7) в апексе и активному экспорту при участии Ca^{2+} -АТФазы в более базальных частях трубки. (b) Сопоставление градиентов $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ и $[\text{anion}]_{\text{cyt}}$ во время быстрой и медленной фазы роста. (c) Осцилляции скорости роста совпадают по фазе с колебаниями $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ и противоположны по фазе колебаниям $[\text{anion}]_{\text{cyt}}$.

III. Мембранный потенциал вегетативной клетки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки

Важнейшей характеристикой растительной клетки является мембранный потенциал плазмалеммы, который представляет собой разность электрических потенциалов внутреннего содержимого клетки и окружающей среды (Медведев, 2012). В каждый момент времени значение мембранного потенциала определяется проводимостью плазмалеммы по отношению к основным ионам (K^+ , Cl^- , H^+), поэтому мембранный потенциал является интегральным показателем ионного гомеостаза любой клетки (Molleman, 2003). Ряд авторов определяли величину потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна и растущей трубки различных видов. Высокие значения мембранного потенциала пыльцевых зёрен лилии приводятся в работах Weisenseel, Wenisch (от -90 до -130 мВ) и Obermeyer, Blatt (от -110 до -150 мВ) (Obermeyer and Blatt, 1995; Weisenseel and Wenisch, 1980). В более поздних работах были получены значительно более низкие значения для пыльцевых зёрен ряда видов: *Nicotiana tabacum* (-16 мВ), *Petunia hybrida* (-30 мВ), *Lilium longiflorum* (-23 мВ) и *Narcissus* (-37 мВ) (Feijó et al., 1995; Matveeva et al., 2004; Брейгина и др., 2009). Мембранный потенциал пыльцевых трубок имел более высокие значения: -55 мВ (*Agapanthus umbellatus*), -100 мВ (*Arabidopsis*) (Malho et al., 1995; Mouline et al., 2002). Для протопластов из пыльцевых зёрен были получены значения: -79 мВ (*Brassica chinensis*) (Fan et al., 2003) и -108 мВ (*Lilium longiflorum*) (Брейгина и др., 2009, 2010). В работе, выполненной в нашей лаборатории с применением метода количественной флуоресцентной микроскопии, было показано, что прорастание пыльцевого зерна табака сопровождается гиперполяризацией мембраны, а также был выявлен градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке (в апикальной области мембрана деполяризована по сравнению с более базальными областями), который обусловлен дифференциальной активностью ион-транспортных систем плазмалеммы (Брейгина и др., 2009, 2010). Этот факт объясняет противоречивость значений, полученных разными авторами для пыльцевых зёрен и трубок, поскольку здесь решающим фактором может быть не столько видовая

специфичность, сколько стадия прорастания/роста и участок плазмалеммы, на котором происходило измерение.

Было обнаружено, что при действии на пыльцевые зёрна ингибиторов ЭТЦ митохондрий (NaCN, салицилгидроксамовая кислота), нарушающих синтез АТФ, происходила деполяризация мембраны (Weisenseel and Wenisch, 1980). Ингибитор (ортованадат натрия) и активатор (фузикоцин) протонной помпы при добавлении к растущим пыльцевым трубкам изменяли форму градиента мембранного потенциала (Брейгина и др., 2009). Оба факта указывают на роль H^+ -АТФазы плазмалеммы в регуляции мембранного потенциала как в пыльцевом зерне, так и в трубке.

Важная роль в поддержании величины мембранного потенциала принадлежит анионным каналам: на это указывает гиперполяризация апикальной части пыльцевой трубки при действии ингибитора анионных каналов NPPB; по-видимому, выход анионов в апексе поддерживает его низкие значения (Брейгина и др., 2009). Несомненно, K^+ -каналы также принимают участие в регуляции мембранного потенциала: на это, в частности, указывает тот факт, что в ряде случаев мембранный потенциал близок к величине равновесного потенциала K^+ , а также рассмотренные выше данные о роли канала $TMР4$ в процессе прорастания (Becker et al., 2004). Таким образом, мембранный потенциал является интегральным показателем ионного гомеостаза в растущей пыльцевой трубке и отражает суммарную активность трансмембранных ионных токов в каждой конкретной зоне.

IV. Активные формы кислорода и азота в жизни мужского гаметофита

В работе Schafer с соавторами предлагается различать понятия редокс-состояние (redox state) и редокс-окружение (redox environment) (Schafer and Buettner, 2001; Билан et al., 2015). Любая редокс-пара характеризуется в каждый момент времени редокс-состоянием, т.е. соотношением окисленной и восстановленной форм. В биологических системах имеется множество различных редокс-пар, как водорастворимых (в цитоплазме и других компартментах) так и липофильных, локализованных в гидрофобной фазе биологических мембран. Редокс-статус является интегральной величиной, характеризующей какой-либо компартмент, биологическую жидкость, клетку или ткань, которая складывается из восстановительного потенциала присутствующих там редокс-пар. Важнейшими компонентами биологических систем, оказывающими значительное влияние на их редокс-статус, являются активные формы кислорода.

Активные формы кислорода (АФК) – это высокореакционные кислородосодержащие молекулы ($^1\text{O}_2$, H_2O_2), ионы (O_2^{2-} и др.) или радикалы ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ и др.), т.е. частицы, содержащие неспаренные электроны. Все АФК, кроме синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), являются продуктами частичного восстановления невозбужденного триплетного кислорода ($^3\text{O}_2$) (Скулачѐв и др., 2010). В низких концентрациях АФК играют сигнальную роль как при биотических и абиотических стрессах, так и в нормальных процессах роста и развития растений (Полесская, 2007). Однако из-за своей высокой реакционной способности АФК, присутствуя в избыточных концентрациях, реагируют с белками, липидами мембран и ДНК, что может приводить к нарушению их функции.

В живой клетке существует несколько эшелонов защиты от токсического действия АФК: 1) механизмы, снижающие интенсивность образования АФК в клетке (виолоксантиновый цикл, альтернативные пути транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов и митохондрий), 2) ферментативные низкомолекулярные антиоксиданты (глутатион, аскорбиновая кислота, филлохинон), 2) ферменты антиоксидантной защиты (каталаза, супероксид дисмутаза, пероксидаза и др.) (Скулачѐв и др., 2010). Дисбаланс продукции и удаления АФК, который часто

наблюдается при действии различных неблагоприятных факторов, приводит к так называемому «окислительному стрессу».

АФК образуются в растительной клетке, главным образом, в митохондриях, пластидах и пероксисомах, как побочные продукты аэробного метаболизма. Кроме того, важную роль в образовании АФК играет фермент плазмалеммы НАДФН-оксидаза (НАДФН:кислород оксидоредуктаза) – мембранный комплекс, обеспечивающий перенос электрона с НАДФН_{in} на внеклеточный молекулярный кислород (O_{2out}). В результате работы НАДФН-оксидазы происходит одноэлектронное восстановление кислорода, сопровождающееся образованием супероксид анион радикала (O₂^{•-}):



Образующийся в реакции O₂^{•-} преобразуется в H₂O₂ в результате спонтанной дисмутации или при участии внеклеточной супероксиддисмутазы (CuZn-SOD).

Первоначально НАДФН-оксидаза была обнаружена в 1978 году при исследовании нейтрофильных гранулоцитов крови млекопитающих, и её функции связывались исключительно с выделением АФК в люмен фагоцитарной вакуоли, содержащей захваченные микроорганизмы. Однако, позднее было показано, что НАДФН-оксидаза распространена гораздо шире, а её функции не исчерпываются продукцией цитотоксичных АФК с целью защиты у млекопитающих. В настоящее время известно, что работа НАДФН-оксидазы регулируется целым рядом факторов, что указывает на важную роль НАДФН-оксидазы и продуцируемого ею O₂^{•-} в жизненных процессах клетки. В частности, этот фермент играет ключевую роль во многих физиологических процессах у растений (Segal et al., 2016).

Активные формы азота. Монооксид азота (NO) является газом и легко проникает через биологические мембраны. При этом в молекуле NO имеется неспаренный электрон, т.е. он относится к свободным радикалам, что, в частности, позволяет использовать метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) для его идентификации и количественного определения. У растений NO принимает участие во множестве физиологических процессов: в прорастании

семян, закрывании устьиц, гравитропическом ответе корней, развитие цветка, реакции на биотические и абиотические стрессоры, половом размножении, а также контролирует активность ряда транскрипционных факторов и экспрессию соответствующих генов (Domingos et al., 2014; Wilson et al., 2009). В этих процессах NO выступает как первичным, так и вторичным мессенджером, то есть вовлечен в передачу межклеточного и внутриклеточного сигнала, соответственно.

Относительно основного источника NO в растительной клетке нет полной ясности, показано существование как энзиматических, так и неэнзиматических механизмов продукции NO. Среди неэнзиматических механизмов была показана конверсия NO_2^- в NO при действии каротиноидов на свету. Также было продемонстрировано превращение NO_2^- в NO в апопласте при кислых значениях pH в ответ на добавление АБК и гиббереллинов. Среди ферментативных систем генерации NO у растений наиболее полно изучена НАДФН-зависимая нитратредуктаза (НР), осуществляющая восстановление NO_3^- до NO_2^- , который в последствии восстанавливается до NO. В клетках животных за продукцию NO отвечает фермент NO-синтаза (NOS), осуществляющий реакцию:



Несмотря на предпринимавшиеся поиски каноническая NO-синтаза в клетках высших растений обнаружена не была. Однако, NOS была обнаружена у одноклеточной зеленой водоросли *Ostreococcus tauri*. Кроме того, был идентифицирован мутант *Arabidopsis noal* со сниженной продукцией NO (Bright et al., 2009). Тем не менее, белок AtNOA1 оказался митохондриальной ГТФазой, обеспечивающей сборку/стабилизацию рибосом и принимающий участие в биогенезе пластид; механизм благодаря которому у *noal* происходит снижение уровня NO, пока не изучен.

На ряде видов было показано участие NO в прогамной фазе оплодотворения у покрытосеменных растений в качестве регулятора роста пыльцевой трубки и межклеточной сигнальной молекулы. Использование NO-чувствительного флуоресцентного сенсора DAF-2DA позволило продемонстрировать продукцию NO в пыльцевом зерне после гидратации и на начальных этапах прорастания в

системе *in vivo* у *Senecio squalidus* и *Arabidopsis thaliana* (Hiscock et al., 2007). При этом интенсивность флуоресценции возрастала по мере прорастания пыльцевых зерен. Позднее с использованием флуорометрии DAF-2DA и ЭПР была показана продукция NO в культуре пыльцевых зерен *in vitro* и у других видов (более 20 видов из 11 различных семейств) (Bright et al., 2009). Окрашивание аналогичным флуоресцентным красителем, а также результаты ЭПР указывают на интенсивную продукцию NO в растущей пыльцевой трубке *Camellia sinensis* в условиях *in vitro* (Wang et al., 2012). При окрашивании пыльцевых трубок покрытосеменных флуоресценция наблюдается по всей длине трубки. Образование NO в растущих трубках было продемонстрировано и для голосеменных растений (*Pinus bungeana*), при этом флуоресценция DAF-2DA наблюдалась в базальной части трубки и отсутствовала в апексе (Wang et al., 2009). Таким образом, продукция NO активированными пыльцевыми зёрнами и растущими пыльцевыми трубками, по-видимому, является универсальной чертой семенных растений, однако механизм генерации NO у растений в целом, и в мужском гаметофите в частности, изучен не достаточно.

При изучении влияния экзогенного монооксида азота на растущие пыльцевые трубки *Lilium longiflorum* было продемонстрировано, что при локальном воздействии NO вызывает отрицательной хемотропизм (Prado et al., 2008). Чувствительность пыльцевых трубок лилии к NO крайне высока: для отклонения пыльцевой трубки от источника NO достаточная плотность потока газа составляет $\sim 0,5$ пмоль/(см²×с) (Feijó et al., 2004). С этими результатами согласуются данные, согласно которым при добавлении доноров NO происходит ингибирование прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок (Prado, 2004). Интересно, что прорастание пыльцевых зерен и рост трубок хвойных (сосна) активируется под действием доноров NO и ингибируется при добавлении агентов, снижающих его концентрацию (Wang et al., 2009).

Глутатион. Трипептид глутатион (γ -глутамилцистеинглицин) является важнейшим антиоксидантом растений и, наряду с другими водорастворимыми антиоксидантами, обеспечивает редокс-буферную ёмкость цитоплазмы.

Глутатион синтезируется в два этапа в результате работы γ -глутамилцистеин синтетазы и глутатион синтетазы. У *Arabidopsis* каждый фермент кодируется единственным геном: *GSH1/PAD2/RML1* и *GSH2* соответственно. Несмотря на крайне низкий уровень транскриптов обоих генов в зрелом пыльцевом зерне глутатион играет существенную роль в процессе развития мужского гаметофита. Предполагается, что зрелые пыльцевые зерна уже содержат значительный запас глутатиона и/или ферменты его биосинтеза.

При изучении роли глутатиона в физиологии мужского гаметофита было показано, что при добавлении ингибитора γ -глутамилцистеин синтетазы (*GSH1*) бутатионинсульфоксимины (*buthioninesulfoximine* BSO, 100 μ M) прорастание пыльцевых зерен *A. thaliana* Col-0 значительно снижается (до 2-5% по сравнению с 71% в контроле) (Zechmann et al., 2011). Одновременное с ингибитором добавление восстановленного глутатиона (*GSH*, 1 mM) частично снимает эффект ингибитора (60%) и восстанавливает прорастание пыльцевых зерен до уровня, близкого к прорастанию в среде, содержащей 1 mM глутатиона (64%). С другой стороны, добавление восстановленного глутатиона в высоких концентрациях (3 и 5 mM) приводило к статистически значимому снижению прорастания пыльцевых зерен (12%), вероятно, в результате нарушения редокс-статуса. С данными, полученными с использованием фармакологического подхода, согласуются результаты анализа фенотипа мутанта *pad2-1*, у которого нарушен первый этап биосинтеза глутатиона. Для пыльцевых зерен растений *pad2-1* характерно сниженное содержание глутатиона (-80% по отношению к контролю) и низкое прорастание (16%). При этом добавление восстановленного глутатиона (3 mM) к пыльцевым зернам *pad2-1* достоверно увеличивает прорастание (25%).

Тем не менее, точные функции глутатиона в контроле прорастания и роста мужского гаметофита остаются не ясны.

Примеры регуляторного действия АФК. Известно, что в регуляции ряда физиологических процессов у растений мишенями для действия АФК являются ион-транспортные системы. Прежде, чем перейти к функциям АФК в

репродуктивной системе растений, мы хотели бы остановиться на некоторых хорошо изученных примерах таких регуляторных взаимодействий.

Закрывание устьиц. Закрывание устьиц под действием фитогормона абсцизовой кислоты является одной из важнейших адаптивных реакций в ответ на водный дефицит; регуляция данного процесса достаточно подробно изучена. Процесс закрывания устьиц начинается с выхода Cl^- , K^+ и, как следствие, воды в апопласт, что, в свою очередь, ведет к снижению тургора и закрыванию устьичной щели. H_2O_2 является вторичным мессенджером в ходе АБК-зависимого закрывания устьиц (Desikan et al., 2004). Это подтверждает ряд фактов: (1) микроинъекция АБК в устьичную клетку вызывает резкое увеличение содержания H_2O_2 ; (2) обработка ингибитором НАДФН оксидазы DPI и антиоксидантными ферментами каталазой и аскорбатпероксидазой (в комбинации с аскорбиновой кислотой) предотвращает действие АБК (Zhang et al., 2001); (3) уровень экспрессии генов *AtrbohD* и *AtrbohF*, кодирующих субъединицы НАДФН-оксидазы, значительно выше в замыкающих клетках устьиц, чем в остальных клетках эпидермиса (Kwak et al., 2003); (4) у двойного мутанта *atrbohD/F* значительно снижена чувствительность к АБК; (5) обработка низкими концентрациями H_2O_2 ($\leq 10 \mu\text{M}$) вызывает закрывание устьиц без добавления АБК (McAinsh et al., 1996); аналогичный эффект вызывает обработка метилвиологеном, индуцирующим образование $\text{O}_2^{\cdot-}$, и различными элиситорами, активирующими генерацию H_2O_2 (Lee et al., 1999). Таким образом, одной из первых реакций замыкающих клеток на действие АБК является активация НАДФН-оксидазы и генерация $\text{O}_2^{\cdot-}$, который дисмутирует в H_2O_2 , выполняющую роль вторичного мессенджера.

Показано, что основными мишенями для H_2O_2 в замыкающих клетках устьиц являются ионные каналы. В большом числе работ было показано, что АБК вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Gilroy et al., 1991; Grabov and Blatt, 1998). Реис соавторами, используя пэтч-кламп методику и флуоресцентное окрашивание Ca^{2+} -чувствительным красителем fura-2, продемонстрировали, что H_2O_2 (5 мМ) активирует катионные каналы, проводящие Ca^{2+} и активируемые при

гиперполяризации, что приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Pei et al., 2000). Кроме того, АФК-регуляции подвергаются и другие каналы: показано, например, что H_2O_2 подавляет работу K^+_{out} каналов в замыкающих клетках устьиц *Vicia faba* (Kohler et al., 2003). Таким образом, основная роль H_2O_2 в замыкающих клетках заключается в активации каналов, отвечающих за поступление в цитоплазму Ca^{2+} , однако, по-видимому, H_2O_2 также регулирует и другие ионные каналы.

Рост корневых волосков. Обнаружено, что АФК принимают участие в контроле роста клеток в зоне элонгации корня и корневых волосков. Такое заключение было сделано на основании следующих фактов: (1) с помощью флуоресцентного АФК-чувствительного красителя CM- H_2DCF было показано накопление АФК на поверхности трихобласта в месте образования будущего волоска, а также в апексе растущего корневого волоска (Foreman et al., 2003); (2) для мутантов *rhd2* (*root hair defective 2*) с нарушением функции НАДФН-оксидазы характерно недоразвитие корневых волосков и слабое развитие корней; при этом фенотип данного мутанта можно получить при воздействии на растение DPI, а частичное восстановление фенотипа дикого типа можно получить, обработав *rhd2* растения экзогенным пероксидом водорода.

Основными мишенями для АФК в процессе роста корневого волоска, как и в случае замыкающих клеток устьиц, являются ионные каналы. Оказалось, что у мутантов *rhd2* в корневых волосках нарушен типичный для клеток с апикальным типом роста градиент $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, хотя, как показывают пэтч-кламп исследования, Ca^{2+} -каналы у этих растений вполне функциональны (Carol and Dolan, 2002). Данный факт говорит о том, что у *rhd2* растений нарушена регуляция работы кальциевых каналов. Также при изучении динамики $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ в корневом волоске с использованием флуоресцентного зонда было продемонстрировано увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ после добавления системы генерации $\cdot OH$ ($H_2O_2 + Cu^{2+} +$ аскорбат) (Foreman et al., 2003). Действие $\cdot OH$ ($Cu^{2+} +$ аскорбат) дополнительно изучалось с использованием пэтч-кламп метода на сферопластах, выделенных из корневых волосков. Были обнаружены АФК-индуцированные токи Ca^{2+} через катионные

каналы, которые активируются при гиперполяризации мембраны и эффективно блокируются Gd^{3+} . Авторы заключили, что АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой в апикальной части растущего корневого волоска, активируют Ca^{2+} -каналы и принимают участие в установлении градиента $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$.

Рост ризоидной клетки *Fucus*. Зигота бурой водоросли *Fucus* является классическим объектом в работах по изучению клеточной полярности. Для ризоидальной клетки зиготы *Fucus* характерен полярный тип роста с типичным градиентом $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ (Coelho et al., 2002, 2008). С использованием АФК-чувствительных красителей CM-H₂DCFDA и NBT было показано наличие в ризоидальной клетке градиента АФК с максимумом в апексе. Показано, что добавление DPI и тушителя АФК Mn-TMPP вызывает подавление роста и диссипацию градиента $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ – это свидетельствует о значении градиента АФК для регуляции этих показателей. Авторы предполагают, что поддержание данных градиентов осуществляется по принципу положительной обратной связи: АФК, генерируемые в результате работы НАДФН-оксидазы, активируют катионные каналы, транспортирующие Ca^{2+} в цитоплазму, который, в свою очередь, активирует НАДФН-оксидазу (Coelho et al., 2008).

Как видно из этих примеров, регуляторный модуль «АФК-ионный транспорт» играет ключевую роль в целом ряде физиологических процессов и вполне может успешно функционировать в мужском гаметофите. Особенности ионной регуляции прорастания пыльцевого зерна и полярного роста трубки мы рассмотрели выше, а теперь перейдем к тому, что известно о роли АФК в регуляции прогамной фазы оплодотворения. Целью нашей работы было изучить взаимосвязь этих систем, т.е. функционирование регуляторного модуля как целого «АФК-ионный транспорт».

Продукция АФК перед опылением в рецептивном рыльце. В работе S. M. McInnis с соавторами впервые с помощью оптических методов было показано

накопление АФК в готовых к опылению рыльцах 20 видов покрытосеменных растений из разных систематических групп (Hiscock et al., 2007, McInnis et al., 2006). Значительную сложность представляла дифференциация H_2O_2 от других АФК, поскольку существующие флуоресцентные красители зачастую не обладают высокой избирательностью. Так, использованный в работе S. M. McInnis флуорофор DCFH₂-DA детектирует суммарный уровень АФК, а также NO. Для более точной характеристики АФК-статуса авторы использовали: 1) тушитель H_2O_2 пируват натрия (NaPyru), 2) гистохимический краситель ТМВ, более избирательный в отношении H_2O_2 и 3) селективный к NO краситель DAF-2DA. Все проведенные в данной работе эксперименты указывают на то, что основной формой АФК, образующейся в папиллах рыльца и накапливающейся в эксудате, является H_2O_2 . К аналогичному выводу, при исследовании накопления АФК в репродуктивных тканях оливы европейской, приходят A. Zafra с коллегами, отмечая, что папиллы рыльца также генерируют, $O_2^{\cdot-}$ и одну из активных форм азота – монооксид азота (NO) (Zafra et al., 2010).

A. Zafra с соавторами также проводили сравнительное изучение динамики содержания АФК в тканях рыльца у видов с различными типами рыльца (сухое, влажное) и разными механизмами самонесовместимости (спорофитный, гаметофитный, самосовместимые) (Zafra et al., 2016, 2010). Было установлено, что у таких видов как *Arabidopsis thaliana*, *Papaver rhoeas*, *Pisum sativum*, *Olea europaea* и *Magnolia grandiflora* максимальный флуоресцентный сигнал АФК-чувствительного красителя DCFH₂-DA на рыльце наблюдается во время ранних стадиях развития цветка – до раскрытия бутона. У *Brassica oleraceae*, *Citrus × limon*, *Helianthus annuus* высокий сигнал DCFH₂-DA на рыльце регистрируется на поздних стадиях развития цветка, после оплодотворения при деградации или опадении лепестков (Sharma and Bhatla, 2013). У *Citrus reticulata* содержание АФК характерно для ранних и поздних стадий развития рыльца и цветка в целом. Таким образом, единственной общей закономерностью в паттерне накопления АФК на рыльце у исследованных видов является относительно сниженная, но не нулевая, концентрация АФК на стадии после опыления, когда рыльце содержит

многочисленные пыльцевые зёрна. Подобный результат согласуется с данными об антиоксидантной активности пыльцевых зёрен и их способности генерировать при прорастании NO, который инициирует снижение уровня АФК на рыльце (Hiscock et al., 2007). Содержание АФК на рыльце оливы европейской, регистрируемое по интенсивности сигнала DCFH₂-DA, снижалось как при предобработке рыльца NaPyr (тушитель АФК) так и при обработке SNP (агент, генерирующий NO) (Zafra et al., 2010). Также следует отметить, что какой-либо корреляции паттерна накопления АФК с таксономическим положением, типом рыльца или механизмом самонесовместимости, характерным для данного растения, не было установлено (Zafra et al., 2016, 2010). Единственной таксономической особенностью, которую удалось выявить в данной работе, было повышенное относительно других растений содержание АФК в рыльце примитивного покрытосеменного – *Magnolia grandiflora* (Zafra et al., 2016). Сложный характер динамики АФК в рыльце покрытосеменных подчеркивает экспрессия нескольких изоформ основных антиоксидантных ферментов – супероксид-дисмутазы и пероксидазы, а также сложная картина изменения супероксид-дисмутазной и пероксидазной активностей у подсолнечника (Sharma and Bhatla, 2013).

С момента обнаружения АФК в рецептивном рыльце в литературе выдвигаются гипотезы о их функциях. Высказывалось предположение, что АФК участвуют в первичном распознавании пыльцы своего вида, активации и контроле прорастания пыльцевых зёрен на рыльце (Hiscock et al., 2007). Однако для первой из упомянутых гипотез до сих пор не получено экспериментальных подтверждений. Гораздо более вероятным кажется, что в распознавании пыльцы собственного вида задействованы более сложные молекулы. Вторая гипотеза об участии продуцируемых рыльцем АФК в активации и регуляции начальных этапов прорастания выглядит более правдоподобно. Более того, такое предположение подтверждается экспериментальными данными об активирующем действии H₂O₂ на прорастание пыльцы *in vitro*, которые будут рассмотрены далее (Potocky et al., 2007; Смирнова и др., 2009).

С другой стороны, Hiscock предполагает, что образующиеся на воспринимающей поверхности рыльца АФК могут служить для защиты от инвазии патогенов (Hiscock et al., 2007). В этом отношении особый интерес представляют патогены, переносимые с пылью: подобный механизм трансмиссии известен для некоторых грибов, многих вирусов и виридов (Agrios, 2005; Card et al., 2007; Kawamura et al., 2014; Mink, 1993). S. J. Hiscock предполагает, что оводненная, богатая питательными веществами, способная к секреции эксудата поверхность влажных рылец служит «воротами» бактериальной инфекции (Hiscock et al., 2007). Соответственно, следовало бы ожидать, что содержание АФК во влажных рыльцах будет выше, но корреляции между типом рыльца и содержанием АФК на немногочисленных изученных растениях проследить не удалось (McInnis et al., 2006; Zafra et al., 2016). Растения с сухим рыльце также подвержены трансмиссии фитопатогенов через пыльцу, в качестве примера можно указать на трансмиссию патогенных грибов *Sclerotinia sclerotiorum* и *Verticillium albo-atrum* через пыльцу у рапса (*Brassica sp.*) и люцерны (*Medicago sativa*), соответственно (для растений семейства *Brassicaceae* характерно сухое рыльце) (Card et al., 2007; Hiscock and Allen, 2008). Косвенные свидетельства, приводимые в пользу защитной роли АФК в рыльцах состоят в том, что накопление АФК характерно также для нектара и тканей, его секретирующих (Carter and Thornburg, 2004). При этом известно, что нектарники могут служить «воротами инфекции» для различных фитопатогенов (Agrios, 2005). Существенно повышенное содержание АФК у *Magnolia grandiflora* также можно трактовать как механизм, служащий для защиты от фитопатогенов (Zafra et al., 2016). Таким образом, гипотеза о защитной функции АФК в рыльце не имеет пока надежных подтверждений, хотя, безусловно, нет причин её полностью отклонить. Наиболее вероятно, что накопление АФК на рецептивной поверхности рыльца полифункционально: одновременно АФК обеспечивают активацию метаболизма регидратированного пыльцевого зерна и защищают растение от трансмиссии фитопатогенов. При этом, защитная функция, вероятно, является эволюционно первичной (Zafra et al., 2016). Несомненно, необходимы дальнейшие

исследования содержания АФК на рыльце у разных видов покрытосеменных и экспериментальные работы в этом направлении, которые приведут к уточнению функции АФК на рецептивной поверхности рыльца.

Функциональное значение АФК в контроле прогамной фазы оплодотворения. Регуляция процессов активации и прорастания пыльцевого зерна АФК изучалась в нескольких лабораториях, включая нашу группу под руководством И. П. Ермакова. С использованием двух красителей: H_2FDA и NBT – было показано накопление АФК в пыльцевых зёрнах киви и табака вскоре после регидратации в жидкой среде *in vitro* (Speranza et al., 2011; Смирнова et al., 2009). Добавление высоких концентраций тушителя H_2O_2 и $O_2^{\cdot -}$ $Mn-TMPP$ и ингибитора НАДФН-оксидазы DPI приводило к подавлению прорастания пыльцевых зёрен (Смирнова et al., 2009).

Вероятный механизм действия АФК на начальной стадии прорастания был предложен Смирновой с соавторами (Smirnova et al., 2013). Авторы изучали изменения механических свойств интины пыльцевых зёрен табака при различном балансе $H_2O_2/\cdot OH$, анализируя устойчивости пыльцевого зерна к гипоосмотическому шоку. Баланс $H_2O_2/\cdot OH$ изменяли путем добавления супероксиддисмутазы, $Mn-TMPP$, тушителя $\cdot OH$ $POBN$, а также путем добавления экзогенной H_2O_2 и системы генерации $\cdot OH$ ($FeSO_4 + H_2O_2$). H_2O_2 в наиболее низкой из исследованных концентрации ($100 \mu M$) вызывала активацию прорастания пыльцевых зёрен, в то время как высокие концентрации 2 и 4 мМ ингибировали прорастание. Было показано, что добавление $\cdot OH$ ингибировало прорастание пыльцевых зёрен, при этом пыльцевые зёрна образовывали выпячивания клетки в местах апертур, что свидетельствовало о размягчении клеточной стенки. Предобработка $POBN$, как и экзогенной H_2O_2 , увеличивала устойчивость пыльцевых зёрен к гипоосмотическому шоку, что говорит об упрочении клеточной стенки. На основе проведенных экспериментов авторы предложили модель, в которой $\cdot OH$ вызывает размягчение интины в области появления пыльцевой трубки, а H_2O_2 , напротив, принимает участие в поперечном

сшивании полимеров клеточной стенки и её упрочении в остальных областях пыльцевого зерна. Таким образом, нарушение соотношения H_2O_2/ON на стадии гидратации и активации приводит к ингибированию прорастания пыльцевого зерна за счёт нарушения локальных механических свойств клеточной стенки. Данные результаты согласуются с предположением, что пероксид водорода *in vivo* в тканях рыльца может принимать участие в регуляции прорастания пыльцевого зерна.

Potocky с коллегами показал участие эндогенных АФК в процессе полярного роста пыльцевой трубки *in vitro* (Potocky et al., 2007, 2012). С помощью флуоресцентного красителя CM- H_2DCFDA был выявлен градиент АФК в растущей пыльцевой трубке с максимумом в апикальной части. Было продемонстрировано снижение скорости роста пыльцевых трубок при их выращивании в среде, содержащей Mn-TMPP и DPI. Также наблюдалось снижение скорости роста у трубок с геном НАДФН-оксидазы (*NOX*), инактивированным путём введения антисенс конструкции; при этом добавление экзогенной H_2O_2 (0.5 мМ) восстанавливало рост. Данные факты убедительно свидетельствуют о том, что АФК принимают важное участие в регуляции полярного роста, однако мишени для действия АФК и, в частности, для пероксида водорода в растущей пыльцевой трубке не были выявлены.

Как известно, завершающей стадией доставки спермиев к зародышевому мешку является разрыв пыльцевой трубки после её входа в микропиле и высвобождение спермиев. Как показывают пионерские исследования оплодотворения *in vivo*, разрыв пыльцевой трубки индуцируется женским гаметофитом (Amien et al., 2010; Kessler et al., 2010). В работе Duana с соавторами было обнаружено, что важная роль в данном процессе принадлежит АФК (Duan et al., 2014). Путём анализа мутантов *Arabidopsis* с потерей функции рецепторной киназы FERONIA (FER) было показано, что FER контролирует генерацию АФК в месте входа пыльцевой трубки в женский гаметофит. Ранее эта же группа авторов показала, что FER регулирует активность НАДФН-оксидазы в корневых волосках (Duan et al., 2010). Эксперименты с использованием DPI и тушителя АФК

бензоата натрия демонстрируют, что локальное скопление АФК в зародышевом мешке индуцирует разрыв пыльцевой трубки, а в его отсутствии трубка продолжает расти после входа в женский гаметофит. Ингибиторы Ca^{2+} -каналов (La^{3+} , Gd^{3+}) также блокировали АФК-индуцированный разрыв пыльцевой трубки. Таким образом, авторы предлагают модель, в которой АФК, генерируемые в тканях женского гаметофита, главным образом $\cdot\text{OH}$, вызывают активацию Ca^{2+} -каналов на плазмалемме пыльцевой трубки, что приводит к её разрыву и высвобождению спермиев.

Таким образом, в последние десятилетия накоплены экспериментальные данные, демонстрирующие важную роль АФК в прогамной фазе оплодотворения у покрытосеменных растений. Обнаружено, что АФК накапливаются в тканях рыльца, регулируют прорастание пыльцевого зерна, участвуют в полярном росте пыльцевой трубки и необходимы для индукции ее разрыва и высвобождения спермиев в зародышевом мешке. Однако, механизмы их действия практически не изучены. Об АФК-регуляции прорастания голосеменных растений данных в литературе практически нет.

АФК и кальций. В краткой дискуссионной обзорной работе М. М. Wudick и J. A. Feijó, опираясь на ряд известных к тому моменту фактов, было выдвинуто предположение о ключевой роли в росте пыльцевой трубки регуляторного модуля: $\text{АФК} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ с положительной обратной связью (Wudick and Feijó, 2014). Экспериментальные факты, которые послужили для выдвижения данной гипотезы были следующие (многие из них были упомянуты выше):

- Ca^{2+} -градиент в апексе пыльцевой трубки всех исследованных видов растений тесно связан с полярным ростом (Hepler et al., 2006; Michard et al., 2017; Pierson et al., 1994; Rathore et al., 1991);
- Продукция АФК на плазмалемме пыльцевой трубки обеспечивается НАДФН-оксидазой, а при её ингибировании с применением DPI (50 - 150 μM) или при нейтрализации АФК с использованием Mn-TMPP (100 – 300 μM) происходит замедление скорости роста (Potocky et al., 2007). С другой стороны,

добавление экзогенных АФК в умеренных концентрациях (для табака – 100 μM) активирует прорастание (Смирнова и др., 2009);

- при увеличении в среде культивирования пыльцевых трубок табака концентрации свободного Ca^{2+} до 100 μM происходит увеличение продукции АФК, регистрируемое с помощью низкоспецифичного красителя NTB (Potocky et al., 2007);

- с помощью молекулярно-биологических методов были установлены две основные НАДФН-оксидазы, экспрессирующиеся в пыльце *Arabidopsis*. Ими оказались белки: RbohH и RbohJ (Boisson-Dernier et al., 2013). Оказалось, что у этих белков на цитозольном N-конца присутствуют Ca^{2+} -связывающие домены (EF-руки). Наличие EF-рук дает возможность контроля продукции АФК НАДФН-оксидазами со стороны цитоплазматического Ca^{2+} (Boisson-Dernier et al., 2013; Kaya et al., 2014; Lassig et al., 2014);

- многочисленные косвенные свидетельства, подтверждающие, что АФК могут контролировать поступление Ca^{2+} через ионные каналы в пыльцевую трубку. В частности, было показано, что для двойных мутантов *Arabidopsis* с потерей функции НАДФН-оксидаз (*rbohH-1 rbohJ-1*) характерны резкие осцилляции роста, приводящие к разрыву мембраны у значительной части трубок, и коррелирующие с ними пики концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (Lassig et al., 2014; Duan et al., 2014).

- АФК-контролируемое поступление Ca^{2+} в цитоплазму характерно для спорофитных клеток растений. Как в замыкающих клетках устьиц, так и в корневых волосках быстрый ответ на H_2O_2 и $^\circ\text{OH}$ включает в себя активацию входящего Ca^{2+} тока и последующее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Demidchik et al., 2007; Foreman et al., 2003; Pei et al., 2000). Другим косвенным свидетельством АФК-контролируемого поступления Ca^{2+} через плазмалемму в полярно растущие клетки служит тот факт, что в корневых волосках мутантов с потерей функции НАДФН-оксидазы (*rhd-2*) значительно слабее выражен градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Foreman et al., 2003).

- По существу, единственным прямым свидетельством АФК-контролируемого трансмембранного ионного тока в мужском гаметофите были измерения, выполненные на достаточно редком объекте – груше (*Pyrus pyrifolia*) (Wu et al., 2010). В данной работе на протопластах был идентифицирован H_2O_2 -активируемый Ca^{2+} ток через потенциал чувствительные каналы, активирующиеся при гиперполяризации. Сомнительность данного результата, однако, связана с высокими стартовыми концентрациями пероксида, которые применялись в данной работе, а также с малой изученностью объекта.

Для проверки связи между АФК и динамикой Ca^{2+} в мужском гаметофите нами были выполнены прямые измерения АФК-индуцированного Ca^{2+} тока на общепринятом объекте – протопластах лилии – и измерения $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ на субпротопластах табака.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. Объекты исследования

В работе использовали пыльцу из срезанных растений лилии (*Lilium longiflorum* Thunb. cv. 'White Heaven'). Пыльники извлекали из распустившихся цветков и инкубировали в чашках Петри в термостате при 30 °С в течение 4 дней. Сухую пыльцу собирали и хранили при -20 °С. Во всех экспериментах использовали размороженную пыльцу, преинкубированную во влажной камере в течение 1 часа при 25 °С.

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). Бутоны собирали накануне раскрытия и извлекали из них пыльники, которые затем помещали в термостат (25°С) не менее чем на двое суток для созревания и высыхания. Сухую пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при -20°С. Во всех опытах использовали пыльцу, предварительно увлажненную 2 ч при 25°С.

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. Затем мужские стробилы выдерживали в термостате при температуре 25°С в течение 3 дней для полного высыхания; после чего сухую пыльцу хранили при -20 °С.

II. Выделение протопластов из пыльцевых зёрен и субпротопластов из пыльцевых трубок

Протопласты как модельная система. Изолированные протопласты растительных клеток широко используются в физиологических исследованиях как модельный объект при изучении транспортных систем плазматической мембраны и процесса регенерации клеточной стенки. Отсутствие клеточной стенки

позволяет воздействовать на мембрану химическими и физическими факторами (Бутенко, 1999). Доступность мембраны также позволяет применять электрофизиологические подходы, в том числе, различные варианты пэтч-кламп методики. При использовании флуоресцентных методов отсутствие клеточной стенки позволяет избежать автофлуоресценции оболочки и неспецифического связывания красителей.

В литературе есть данные о выделении протопластов из мужского гаметофита на разных стадиях развития: из домейотических микроспороцитов, тетрад микроспор, зрелых пыльцевых зёрен и растущих пыльцевых трубок (Tanaka, 1996). Наибольший интерес для исследования закономерностей полярного роста представляют протопласты, полученные из зрелых пыльцевых зёрен и субпротопласты, выделенные из пыльцевых трубок различной длины. Процесс выделения протопластов из этих клеток значительно отличается от получения протопластов из дифференцированных спорофитных тканей растения или культур клеток. Энзиматическое выделение протопластов из тетрад микроспор и зрелых пыльцевых зёрен затруднено наличием в клеточной стенке спорополленина, химически инертного высокомолекулярного соединения. В связи с этим Weaver с соавторами был предложен неэнзиматический метод выделения протопластов из зрелых пыльцевых зёрен (Weaver et al., 1990). Однако, при таком подходе выход жизнеспособных протопластов из многоапертурных пыльцевых зёрен невелик.

Более эффективно проходит выделение протопластов из растущих трубок. Основной способ получения таких протопластов – энзиматическое разрушение клеточной стенки в гипертонической среде. Из-за удлинённой формы и особенностей организации клеточной стенки пыльцевые трубки склонны к формированию не одного протопласта, а нескольких субпротопластов. Kroh и Knuiman исследовали субпротопласты, выделенные из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* (Kroh and Knuiman, 1988). Поскольку пыльцевые трубки, из которых происходило выделение, были достаточно длинные (длина в 4-5 раз превышала диаметр пыльцевого зерна), получившаяся популяция была

гетерогенна в отношении наличия ядер. Было показано, что даже безъядерные субпротопласты способны восстанавливать клеточную стенку и продолжать рост, формируя трубки или удлинённые четкообразные структуры. Эти результаты свидетельствуют о том, что субпротопласты, полученные из пыльцевых трубок, сохраняют жизнеспособность и все клеточные факторы, обеспечивающие полярный рост, и могут быть использованы в качестве удобной модели для изучения закономерностей полярного роста. Однако, необходимо оптимизировать методику выделения, чтобы популяция была достаточно гомогенна как по цитологическим характеристикам, так и по размеру. На данный момент такая оптимизация проведена не была, поэтому в литературе встречаются лишь единичные работы с использованием данной модели. Так, Rutten и Derksen в 90-х годах изучали организацию цитоскелета растущих субпротопластов, выделённых из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum*, иммунофлуоресцентными методами (Rutten and Derksen, 1992, 1990)

Процедура выделения. Для выделения протопластов из пыльцевых зёрен лилии предварительно проводили полную регидратацию пыльцевых зёрен, инкубируя их в стандартной среде прорастания, следующего состава (далее SM): следующего состава: 1,6 мМ H_3BO_3 , 3 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,8 мМ MgSO_4 и 1 мМ 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⁻¹. 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) Macerozyme (MP Biomedicals) и 2 мг мл⁻¹ 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.

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 прорастании составляла 2 мг·мл⁻¹. 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 флуоресцентно микроскопического исследования.

III. Фиксация субпротопластов

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.

IV. Флуоресцентная микроскопия, фотографирование и компьютерный анализ изображения

В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imagingMOT (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.5 (Zeiss), оснащенный цифровой камерой AxioCamHRc (Zeiss). Флуоресценцию возбуждали светом ртутной лампы, используя следующие блоки фильтров:

- Для определения внутриклеточного pH с использованием красителя BCECF съемку проводили в двух каналах: I₁ - возбуждение в диапазоне 475-495 нм,

регистрация флуоресценции в диапазоне длин волн 515-565 нм; I_2 - возбуждение при 426-446 нм, регистрация флуоресценции при 520-550 нм;

- Для определения величины мембранного потенциала при помощи красителя DiBAC₄(3), $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ с использованием красителя Fluo-3, при выявлении митохондрий с использованием NAO и в тесте на жизнеспособность с красителем FDA: возбуждение в диапазоне 475-495 нм, регистрируемая флуоресценция в диапазоне длин волн 515-565 нм;
- Для регистрации динамики мембранного потенциала при помощи красителя di-4-ANEPPS: возбуждение в синем канале (450-490 нм) и в зеленом (540-552 нм), при этом флуоресценцию регистрировали в красной области (более 515 нм и более 590 нм соответственно);
- Для окрашивания плазмалеммы с использованием красителя FM4-64: возбуждали флуоресценцию в диапазоне длин волн 540-552 нм, регистрировали при длинах волн > 590 нм;
- Для идентификации ядер (окрашивание DAPI) и материала клеточной стенки с использованием красителя Calcofluor White: возбуждение в диапазоне 359-371 нм, регистрация флуоресценции при длинах волн более 397 нм.

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). Для обсчета брали равномерно окрашенные субпротопласты с неповрежденной плазматической мембранной.

Определение рН цитоплазмы субпротопластов

Принцип метода. Для определения цитоплазматического рН субпротопластов 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. Краситель в форме ацетометилового эфира свободно проникает через плазматическую мембрану. После попадания в клетку эфирные группы гидролизуются под действием клеточных эстераз и молекула становится анионом, что мешает ей покинуть клетку через плазматическую мембрану.

Процедура окрашивания. Окрашивание субпротопластов BCECF AM (Molecular probes, Нидерланды) проводили при 29°C в течение 5 минут в гипертонической среде без ферментов, одновременно с воздействием H_2O_2 на опытные пробы. Конечная концентрация красителя составляла 10 μ M. После окрашивания субпротопласты отмывали от красителя однократным центрифугированием (30 с при 0,6 \times g) и заменой среды на гипертоническую среду без красителя. Для проверки влияния H_2O_2 на флуоресценцию красителя предварительно измерили интенсивность флуоресценции BCECF (в форме водорастворимой кислоты) в присутствии 100 μ M H_2O_2 и без H_2O_2 . При этом не получили статистически значимого изменения I_1/I_2 в присутствии H_2O_2 .

Калибровка для определения внутриклеточного рН. 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% сахараза в 25 мМ MES (рН 6,0) или 25 мМ HEPES буфере (рН 7,0 и 8,0). Калибровочные растворы окрашивали при 25°C в течение 5 минут.

Для построения калибровки использовали краситель в форме кислоты – BCECF Acid (Molecular probes); конечная концентрация красителя составляла 10 μ M. Полученная калибровочная кривая, регрессионное уравнение зависимости I_1/I_2 от величины рН и величина достоверности аппроксимации (коэффициент детерминации R^2) представлены на *Рисунке 1*.

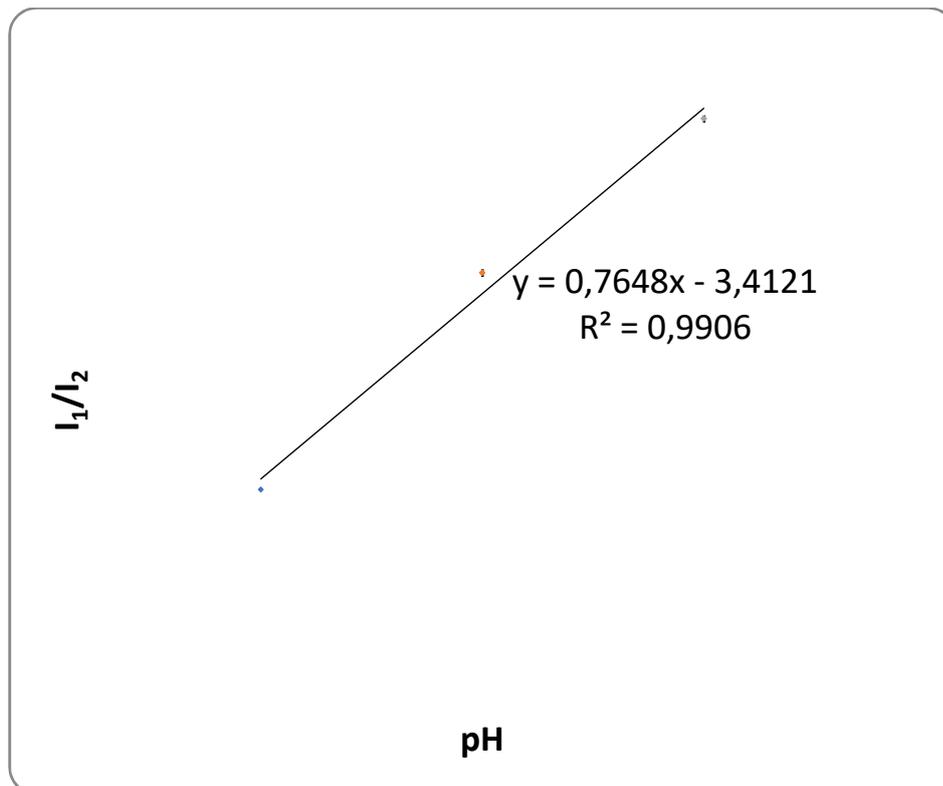


Рисунок 1. Калибровочная кривая для определения внутриклеточного pH с использованием флуоресцентного красителя BCECF. Зависимость I_1/I_2 от величины pH среды.

Определение мембранного потенциала

Для определения мембранного потенциала использовали два красителя с разным принципом действия: медленный DiBAC₄(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.

DiBAC₄(3). Принцип метода. Определение абсолютных значений мембранного потенциала проводили с помощью флуоресцентного красителя DiBAC₄(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 DiBAC₄(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⁻¹×моль⁻¹; T – абсолютная температура, К; F – постоянная Фарадея, 96.490 Дж×мВ⁻¹×моль⁻¹; I, I₀ – интенсивность флуоресценции тестируемой клетки и средняя интенсивность фиксированных клеток, соответственно.

Процедура окрашивания. Окрашивание клеток (как живых, так и фиксированных) DiBAC₄(3) (Molecular probes) проводили при 25°C в течение 10 минут, одновременно с воздействием H₂O₂. Конечная концентрация красителя составляла 5 μM.

Di-4-ANEPPS. Принцип метода. 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_b/F_g, где F_b – интенсивность флуоресценции при возбуждении синим светом, а F_g – интенсивность флуоресценции при возбуждении зеленым светом. При гиперполяризации мембраны величина F_b/F_g уменьшается.

Процедура окрашивания. Для окрашивания протопласты суспендировали в гипертонической среде с конечной концентрацией di-4-ANEPPS 2 μM. К капле суспензии, содержащей окрашенные клетки, на стекле добавляли H₂O₂ в гипертонической среде, до конечной концентрации 10 μM. Затем препараты

микроскопировали и проводили съемку через определенные промежутки времени (30 сек) 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 μM di-4-ANEPPS, после чего в течение 1-5 мин микроскопировали.

Динамика внутриклеточного $[\text{Ca}^{2+}]$

Принцип метода. Определение внутриклеточной концентрации катионов кальция $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ 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. Краситель в форме ацетоксиметильного эфира свободно проникает через плазматическую мембрану. После попадания в клетку краситель подвергается деэтерификации клеточными эстеразами, при этом образуется заряженная форма, которая не может покинуть цитозоль. 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 μM . По данным литературы, концентрация Ca^{2+} в цитозоле пыльцевой трубки составляет от 300 нМ до 3 μM (Hepler et al., 2006), что позволяет использовать Fluo-3 для измерений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в нашем объекте.

Процедура окрашивания. Загрузка красителя происходила при 37°C в гипертонической среде, содержащей 10 μM Fluo-3 и 0,1% PluronicF-127, в течение 30 минут (Wang et al., 2004). После загрузки красителя суспензию отмывали от красителя (два цикла центрифугирование 30 с, 600×g / ресуспендирование в

гипертонической среде). Затем суспензию инкубировали в течение 30 мин при 25°C для полной деэтерификации. По окончании инкубации к опытным пробам добавляли H₂O₂ до конечной концентрации 10 μM и в течение 5 минут проводили съемку динамики.

Ингибирование Ca²⁺-каналов. В качестве ингибитора Ca²⁺-каналов использовали нифедипин (Sigma-Aldrich), который ранее показал свою эффективность на данном объекте (Reiss and Herth, 1985). Для ингибирования Ca²⁺-поводящих каналов за 10 минут до воздействия H₂O₂ добавляли нифедипин до конечной концентрации 100 μM. Также для ингибирования Ca²⁺-проводящих каналов использовали хлорид лантана LaCl₃ (Sigma-Aldrich).

Окрашивание целлюлозы. Для окрашивания материала клеточной стенки использовали флуоресцентный краситель Tinopal (MP Biomedicals, Inc.), связывающийся, в первую очередь, с целлюлозой клеточной стенки и обладающий интенсивной флуоресценцией при возбуждении в ультрафиолетовой области. Для изучения регенерации клеточной стенки суспензию субпротопластов инкубировали в гипертонической среде в течение 20 часов, при температуре 25°C. По окончании инкубации субпротопласты окрашивали в течение 5 минут при концентрации Tinopal 10⁻² мг/мл. Затем проводили однократную отмывку от красителя (центрифугирование 30 с, 600×g / ресуспендирование в гипертонической среде) и микроскопировали.

Выявление ядер. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI (Sigma-Aldrich), связывающийся с АТ-богатыми участками малой борозды двунитевой ДНК (Kubista et al., 1987). При связывании с ДНК происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции в синей области спектра (~460 нм). 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.

Оценка суммарного уровня АФК. Для оценки уровня внутриклеточных АФК использовали общепринятый метод окрашивания 50 μM DCFH-DA

(dichlorofluorescein diacetate acetomethylester, Sigma). Протопласты окрашивали при 25 °С в течение 5 мин и фотографировали с помощью микроскопа AxioPlan.

Тест на жизнеспособность

Принцип метода. В работе использовали традиционный способ оценки жизнеспособности – окрашивание рН-чувствительным флуоресцентным красителем FDA (Sigma-Aldrich) (Yang, 1986). Краситель в форме ацетоксиметильного эфира проникает в клетку через плазмалемму, где подвергается энзиматическому гидролизу. Образовавшийся заряженный продукт при условии целостности плазмалеммы не может покинуть клетку и при нормальной величине цитоплазматического рН (~7.0) обладает яркой зеленой флуоресценцией, что является показателем жизнеспособности клетки.

Процедура окрашивания. Субпротопласты окрашивали в течение 5 минут при концентрации FDA 10 μМ. Затем проводили однократную отмывку (центрифугирование 30 с, 600×g / ресуспендирование в гипертонической среде) и микроскопировали.

V. Картирование внутриклеточных АФК с применением конфокальной микроскопии

Для картирования внутриклеточных АФК использовали два красителя: супероксид анион радикал, локализованный в митохондриях, выявляли с помощью MitoSOX red (Thermo Fisher Scientific) (5 μМ). Пероксид водорода выявляли путем окрашивания PFBS (pentafluorobenzene sulfonylfluorescein, Cayman Chemical) (10 μМ). Особенностью данного красителя, разработанного японскими учеными, является его высокая специфичность к H₂O₂, а также неокислительный механизм перехода во флуоресцентную форму (Maeda et al., 2004). Окрашивание производили при 25 °С в течение 10 мин. Картирование АФК для получения четкой картины проводили на конфокальном флуоресцентном микроскопе Nikon A1, установленном на ББС МГУ и оборудованном 488- и 514-нм лазерами.

VI. Флуориметрическая детекция внеклеточных АФК

Уровень внеклеточных АФК оценивали с помощью неспецифического красителя ОхуBURST Green H₂HFF, конъюгированного с БСА, что предотвращало его интернелизацию в клетки (Thermo Fisher Scientific). В ходе эксперимента клетки помещали в раствор красителя (10 μM), через заданное время удаляли путем фильтрации, а флуоресценцию внеклеточного раствора измеряли в микрокувете с помощью спектрофлуориметра RF5301 (Shimadzu). Флуоресценцию возбуждали при 488 нм, спектр записывали в диапазоне 500-600 нм.

VII. Пэтч-кламп

Принцип метода. Электрические свойства живой клетки могут быть описаны эквивалентной электрической схемой плазматической мембраны представленной на *рисунке II* (Delay et al., 2012; Molleman, 2003). В реальной клетке роль конденсатора, обеспечивающего ёмкость (C_m измеряется в фарадах, Ф), играет липидный бислой. Апопласт и цитоплазма представляют собой сложные водные коллоидные среды и служат хорошими проводниками второго рода, в которых носителями зарядов являются ионы. Роль переменного резистора, формирующего сопротивление (R_m измеряется в омах, Ом), выполняют ион-транспортные белки плазмалеммы. К таким белкам относят: а) ионные каналы, которые формируют пору; б) различные переносчики – первично-активные насосы и вторично-активные симпортеры и антипортеры. На мембране формируется разность электрических потенциалов (E_m измеряется в вольтах, В), в клетках растений мембранный потенциал достигает величин -150 – 200 мВ (Nobel, 2009).

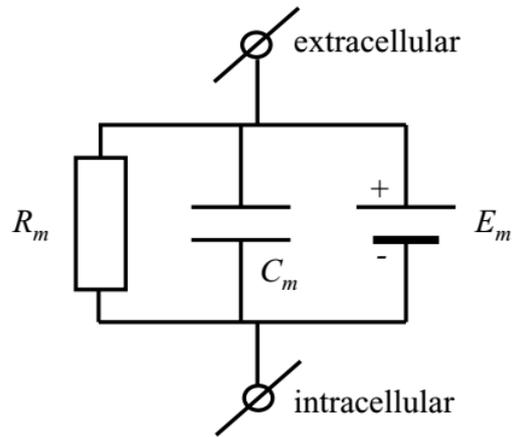


Рисунок II. Электрическая эквивалентная схема плазматической мембраны. Сопротивление мембраны (R_m), ёмкость (C_m) и потенциал (E_m) представлены соответствующими символами (Molleman, 2003).

Отдельно следует отметить, что основной объем цитоплазмы электронейтрален, а вышеприведенные значения мембранного потенциала достигаются незанчительным дисбалансом зарядов по обе стороны мембраны. Так, по ориентировочным расчетам, для сферической растительной клетки с диаметром 30 μM , типичным потенциалом в -100 мВ и характерной ёмкостью мембраны в 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ в цитоплазме клетки имеется 1 «лишний» отрицательный заряд на 10^5 скомпенсированных катионами отрицательных зарядов (Nobel, 2009). Также важно понимать, что нескомпенсированные заряды, отталкиваясь друг от друга, собираются вблизи внутренней поверхности мембраны.

Значение мембранного потенциала (E_m) зависит от набора ион-транспортных систем плазмалеммы и ионного состава цитоплазмы и внешней среды. Ток (I) определяется как направленный поток носителей зарядов, проходящих через данную точку за единицу времени (измеряется в амперах, А). Носителями зарядов в случае трансмембранных токов являются ионы,двигающиеся через белковые ион-транспортные системы. Поскольку ион-транспортные белки встроены в плазмалемму параллельно, то суммарная проводимость плазмалеммы на данном участке ($G = R^{-1}$, измеряется в сименсах, См) представляет собой сумму проводимостей отдельных ион-транспортирующих

белков имеющихся на данной площади мембраны (*рисунок III*) (Delay et al., 2012).

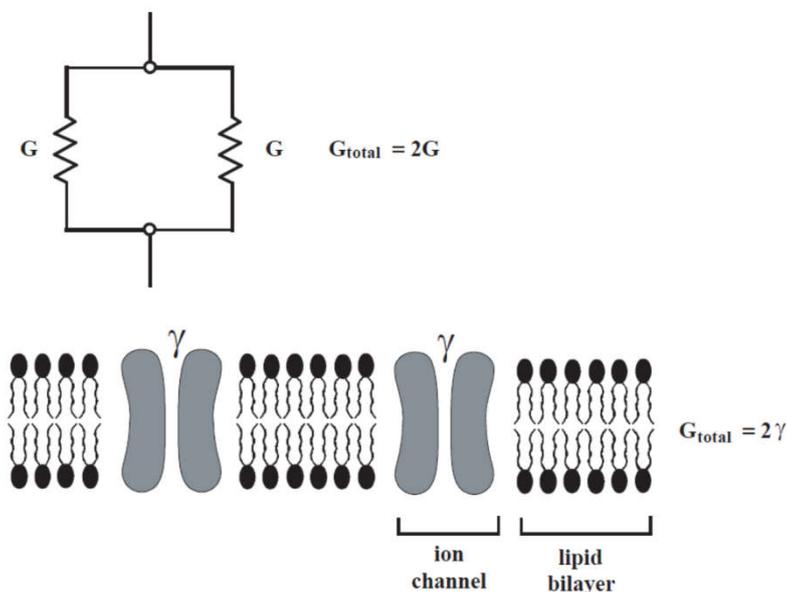


Рисунок III. Суммация проводимостей G резисторов при их параллельном подключении в цепи. Общая проводимость мембраны (G_{total}) представляет собой сумму отдельных проводимостей ион-транспортирующих систем (γ) (Delay et al., 2012).

Согласно закону Ома, потенциал между двумя точками (ΔV) представляет собой произведение тока (I) и сопротивления (R):

$$\Delta V = I \times R$$

Как известно, ёмкость мембраны (C) отражает её способность накапливать заряд (Q) при данной трансмембранной разности потенциалов (ΔV). Данное соотношение может быть выражено уравнением:

$$Q = C \times \Delta V$$

Типичный конденсатор представляет собой два проводника, изолированные друг от друга диэлектриком (*рисунок IV*). Такое устройство служит для накопления заряда и энергии электрического поля. Как упоминалось выше, в случае клетки проводниками служат внутри- и внеклеточная среда, а роль диэлектрика играет липидный бислой. Известно, что ёмкость конденсатора (C) прямо пропорциональна площади поверхности проводников и обратно пропорциональна толщине диэлектрика.

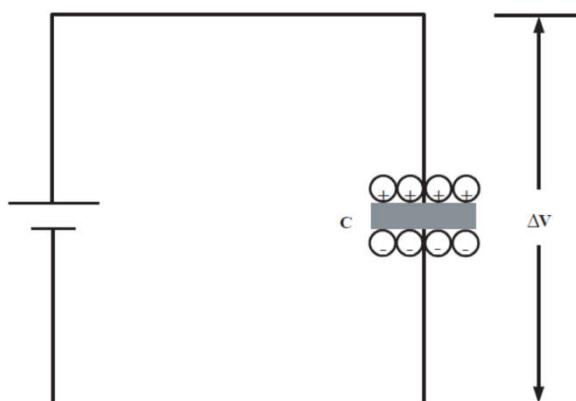


Рисунок IV. Заряд Q может быть накоплен на конденсаторе с ёмкостью C , к которому приложена разность потенциалов ΔV (Delay et al., 2012).

При соединении ряда конденсаторов параллельно (как это происходит в случае фосфолипидного бислоя) суммарная ёмкость представляет сумму ёмкостей (**рисунок V**). При приложении разности потенциалов (ΔV) к конденсатору результирующий ток будет пропорционален ёмкости конденсатора (C) и изменению разности потенциалов во времени (Δt). Данное соотношение для тока может быть записано следующим образом:

$$I = C \times \frac{\Delta V}{\Delta t}$$

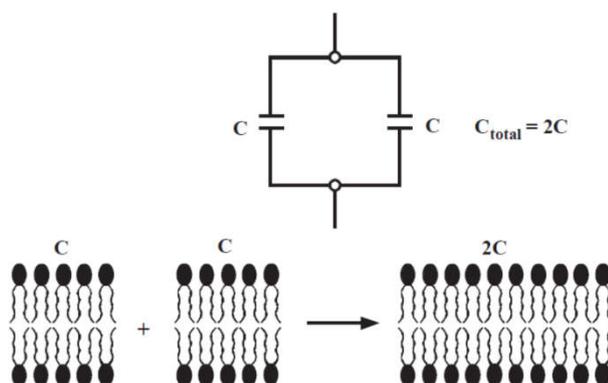


Рисунок V. Сложение ёмкостей (C) при параллельном подключении конденсаторов позволяет рассчитать суммарную ёмкость (C_{total}) (Delay et al., 2012).

Толщина типичной биологической мембраны составляет около 10 нм. Кроме того, липидный бислой является эффективным изолятором, обладая трансмембранной разностью потенциалов, поэтому мембрана служит не просто

конденсатором, но также находится в достаточно сильном электрическом поле. Суммарная ёмкость мембраны возрастает с увеличением её площади, однако, поскольку ёмкость практически не зависит от белкового состава, то для большинства мембран ёмкость, отнесенная к единице площади, составляет около $1 \mu\text{F} \times \text{см}^{-2}$ ($0,01 \text{ пФ} \times \text{см}^{-2}$) (Delay et al., 2012; Nobel, 2009). В связи с этим при пропускании импульса тока в цепи с параллельным подключением конденсатора и резистора сперва происходит накопление заряда на конденсаторе, и только потом – изменение напряжения в цепи (*рисунок VI*).

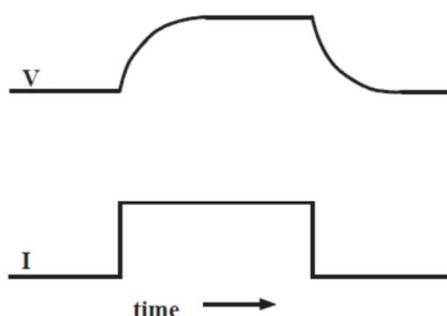


Рисунок VI. Плавный характер изменения напряжения (V) в цепи с параллельным подключением конденсатора и резистора при пропускании через цепь прямоугольного импульса тока (I) (Delay et al., 2012).

Пэтч-кламп представляет собой группу электрофизиологических методов, служащих для исследования биологических мембран (Penner et al., 1995; Медведев, 2012). Впервые измерения были проведены Эрвином Неэром и Бертом Сакманом в середине 70-х годов XX века для проверки гипотезы Бернарда Катца и Рикардо Миледи, предположивших существование отдельных белковых каналов в биомембранах (Katz and Miledi, 1972; Neher and Sakmann, 1976). Неер и Сакман впервые смогли измерить силу и продолжительность ионного тока через единственный никотиновый ацетилхолиновый рецептор при действии различных холиномиметиков в плазматической мембране скелетного волокна лягушки (Neher and Sakmann, 1976). За свои открытия в области работы единичных ионных каналов Неэр и Сакман в 1991 году были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. В дальнейшем метод получил бурное развитие. Между стеклянной пипеткой и мембраной удалось устанавливать контакт с

сопротивлением в диапазоне гигаОм («гигаомный контакт»), что значительно увеличило соотношение сигнал-шум (Penner et al., 1995). Были разработаны различные конфигурации соединения пипетки с клеткой (*рисунок VIII*), в результате стало возможным использовать данный метод для регистрации токов на различных биологических объектах: бактериях, дрожжах, различных животных клетках, протопластах растительных клеткок и даже на выделенных клеточных органеллах (Penner et al., 1995). 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). Другая сложность при работе с растительными клетками состоит в наличие у многих клеток крупной центральной вакуоли и небольшого слоя цитоплазмы, поэтому при неаккуратной работе измерения могут отражать сумму процессов, происходящих на плазмалемме и тонопласте (Penner et al., 1995).

Метод фиксации потенциала. Метод пэтч-кламп с фиксацией потенциала предполагает контроль над значением мембранного потенциала при помощи усилителя с обратной связью (Delay et al., 2012; Медведев, 2012). Впервые такой подход был разработан Колом и Ходжкиным для анализа токов в гигантском аксоне кальмара (Penner et al., 1995). Не смотря на то, что реализуемая в данном методе схема является исключительно экспериментальной, фиксация потенциала на заданном уровне позволяет практически избежать влияния ёмкостных токов, за исключением момента перехода к новому значению потенциала (Delay et al., 2012). При фиксации потенциала ток (I) оказывается прямо пропорционален проводимости мембраны (R^{-1}) (*рисунок VII*). Кроме того, фиксация потенциала позволяет напрямую контролировать функциональное состояние потенциал-чувствительных каналов (Delay et al., 2012).

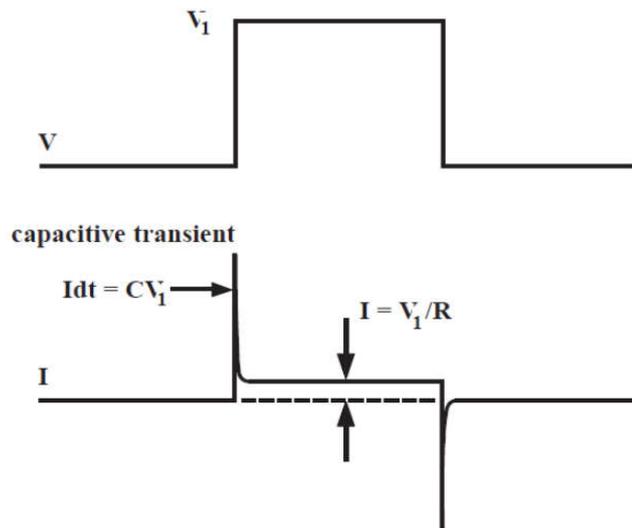


Рисунок VII. При фиксации потенциала оказывается возможным зафиксировать мембранный потенциал на заданном уровне V_1 . При этом регистрируемый ионный ток (I) будет обратно пропорционален сопротивлению (R) или прямо пропорционален проводимости (R^{-1}) мембраны. Кратковременный ёмкостный ток (I_{dt}) пропорционален ёмкости (C) (Delay et al., 2012).

Конфигурации пэтч-клампа. После установления гигаомного контакта пипетки с плазмалеммой и компенсации временных ёмкостных токов становится возможным измерение токов через индивидуальные каналы (конфигурация «cell-attached»). Прикладывая к пипетке отрицательное давление, или действуя импульсом высокого напряжения, можно разрушить область патча и перейти к конфигурации «целая клетка» («whole cell»): данная конфигурация позволяет измерять токи, протекающие через всю поверхность клетки. Кроме того, в данной конфигурации содержимое пипетки диффундирует в цитоплазму, что позволяет контролировать её состав. Манипулируя давлением в пипетке и прочими параметрами, можно перейти к двум другим конфигурациям: «outside-out patch» (наружный слой липидов направлен во внешнюю среду) и «inside-out patch» (во внешнюю среду направлен внутренний слой липидов).

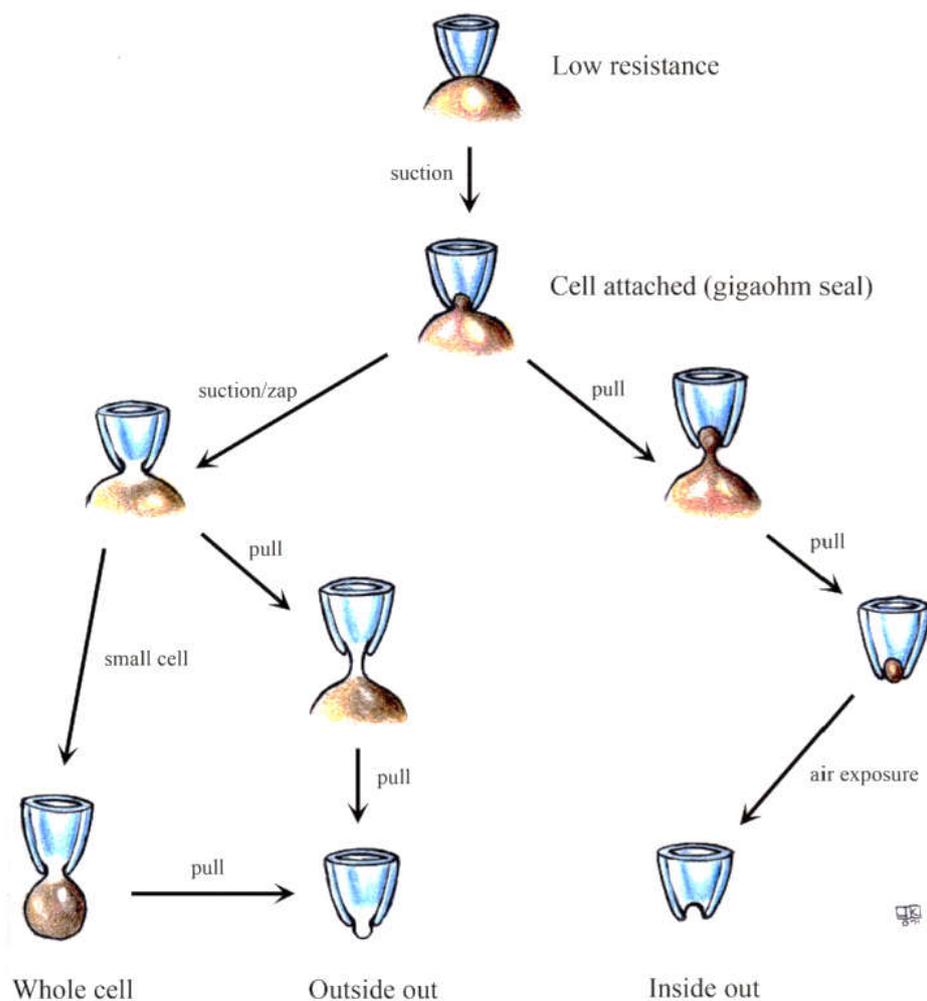


Рисунок VIII. Различные конфигурации в пэтч-кламп методе (Kornreich, 2007).

В настоящей работе изучение трансмембранных ионных токов проводили методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» («whole cell»). 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 ($0.5 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$). Для записи тока использовали установку кафедры Физиологии человека и животных МГУ им. Ломоносова, включающую усилитель Axopatch 200A (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA), USB усилитель

ЕРС-800 (НЕКА 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 ± 32 пФ ($n = 53$) в экспериментах по установлению регуляторной роли H_2O_2 и 238 ± 32 пФ ($n = 26$) в экспериментах с тяжелыми металлами. После установления конфигурации «whole cell» ждали полной перфузии раствора из пипетки в протопласт в течение 30-45 минут. Все записи тока выполняли при комнатной температуре (24 ± 1 °C).

Выходящий K^+ ток 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 (камера) раствор для записи K^+ тока: 10 мМ глутамат калия, 10 мМ $CaCl_2$, 5 мМ MES, 1 мМ $MgCl_2$, pH 5.8 (титровали TRIS), осмоляльность составляла $1.5 \text{ моль} \times \text{кг}^{-1}$ (доводили D-сорбитолом) (Fan et al., 2003).

Внутренний (пипеточный) раствор для записи K^+ тока: 100 мМ глутамат калия, 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ EGTA, 5 мМ HEPES, pH 7.2 (титровали TRIS), осмоляльность составляла $1.5 \text{ моль} \times \text{кг}^{-1}$ (доводили D-сорбитолом) (Fan et al., 2003). Для подтверждения K^+ природы ионного тока использовали ингибитор K^+ -проводящих каналов TEA (10 и 100 мМ) (Sigma-Aldrich, USA).

Входящий Ca^{2+} ток 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 (камера) раствор для записи Ca^{2+} тока: 0.2 мМ D-глюкоза, 10 мМ $CaCl_2$, 5 мМ MES, pH 5.8 (титровали TRIS), осмоляльность составляла $800 \text{ мОсмоль} \times \text{кг}^{-1}$ (доводили D-сорбитолом) (Qu et al., 2007).

Внутренний (пипеточный) раствор для записи Ca^{2+} тока: 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 возбуждали деполяризующими пилообразными импульсами продолжительность 5 с, с интервалом 15 с, с пиками -100 и +100 мВ, при стационарном потенциале 0 мВ.

Внешний (камера) раствор для записи H^+ тока: 50 мМ NMG, 30 мМ L-глутаминовая кислота, 10 мМ L-глутамат кальция, 15 мМ TEA, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ сахароза, 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 (пипетка) раствор для записи H^+ тока: 50 мМ NMG, 50 мМ L-глутаминовая кислота, 15 мМ TEA, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ сахароза, 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.

VIII. 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 использовали статистические критерии для малых выборок (критерии Вилкоксона и Манна-Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Цитологическая характеристика пыльцевых протопластов

Протопласты из пыльцевых зёрен лилии (*Lilium longiflorum* Thumb.) выделяли по адаптированной методике (Tanaka et al., 1987). Пыльцевое зерно лилии имеет крупную продольную апертуру (моноапертурная, сульфатная пыльца), поэтому данный объект хорошо подходит для выделения протопластов из активированных зёрен. На *рисунке 1* представлена суспензия протопластов, содержащая также пустые оболочки. Средний диаметр протопластов, полученных по данной методике, составил $90 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (среднее \pm ст.ошибка, $n = 65$). Данное значение диаметра использовали для расчета объема при записи ионных токов методом фиксации потенциала (пэтч-кламп).

Субпротопласты из пыльцевых трубок табака (*Nicotiana tabacum* L.) получали по оптимизированной методике, которая основывалась на нескольких работах (Desprez et al., 1995; Kroh and Knuiman, 1988; Yu et al., 2006). В процессе выделения субпротопласты, как правило, отшнуровывались в апикальной части пыльцевой трубки (*рисунок 2*), что согласуется с данными о дифференциальном строении клеточной оболочки растущей трубки: в апексе преобладают легко растяжимые и подверженные действию ферментов метоксилированные пектины (Rounds and Bezanilla, 2013).



Рисунок 1. Суспензия протопластов, выделенных из пыльцевых зёрен лилии (*Lilium longiflorum* Thumb.). Масштабная линейка 50 μm .

Как протопласты из пыльцевых зёрен лилии, так и субпротопласты из пыльцевых трубок табака охарактеризовали с применением ряда общепринятых цитологических методов. Для того чтобы подтвердить полное отсутствие клеточной оболочки применяли флуоресцентный краситель Tinopal, связывающий полисахариды (целлюлозу и каллозу) внутреннего слоя пыльцевой оболочки (интины) и стенки пыльцевой трубки (**рисунок 3, рисунок 4**). С использованием оптимизированных протоколов выделения удалось добиться хорошего выхода протопластов и субпротопластов. Отсутствие клеточной стенки в дальнейшем позволило избежать неспецифического связывания красителей с материалом оболочки и сделало плазмалемму доступной для микропипетки в пэтч-кламп измерениях трансмембранных ионных токов.



Рисунок 2. Субпротопласты отшнуровываются от пыльцевых трубок табака (*Nicotiana tabacum* L.). Масштабная линейка 8 μ м.

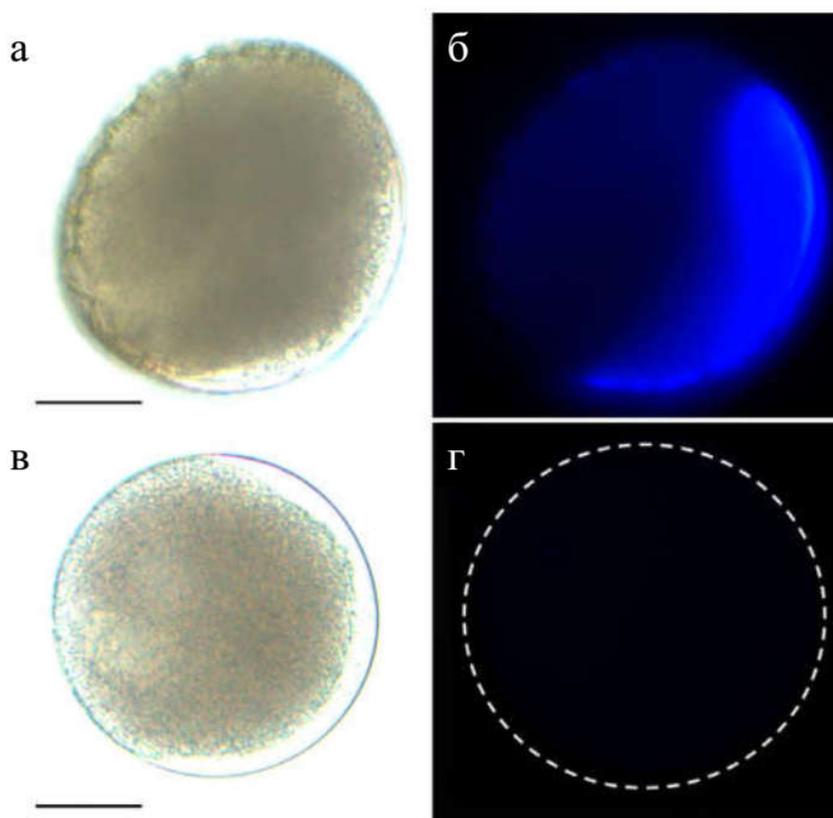


Рисунок 3. Пыльцевое зерно лилии в проходящем свете (**а**) и окрашенное Tinopal, связывающимся с полисахаридами внутреннего слоя клеточной оболочки (интины) (**б**). Протопласт из пыльцевого зёрна лилии в проходящем свете (**в**) и окрашенный Tinopal (**г**). Отсутствие флуоресценции на фотографии

подтверждает полное отсутствие полисахаридной клеточной стенки. Масштабная линейка 30 μm .

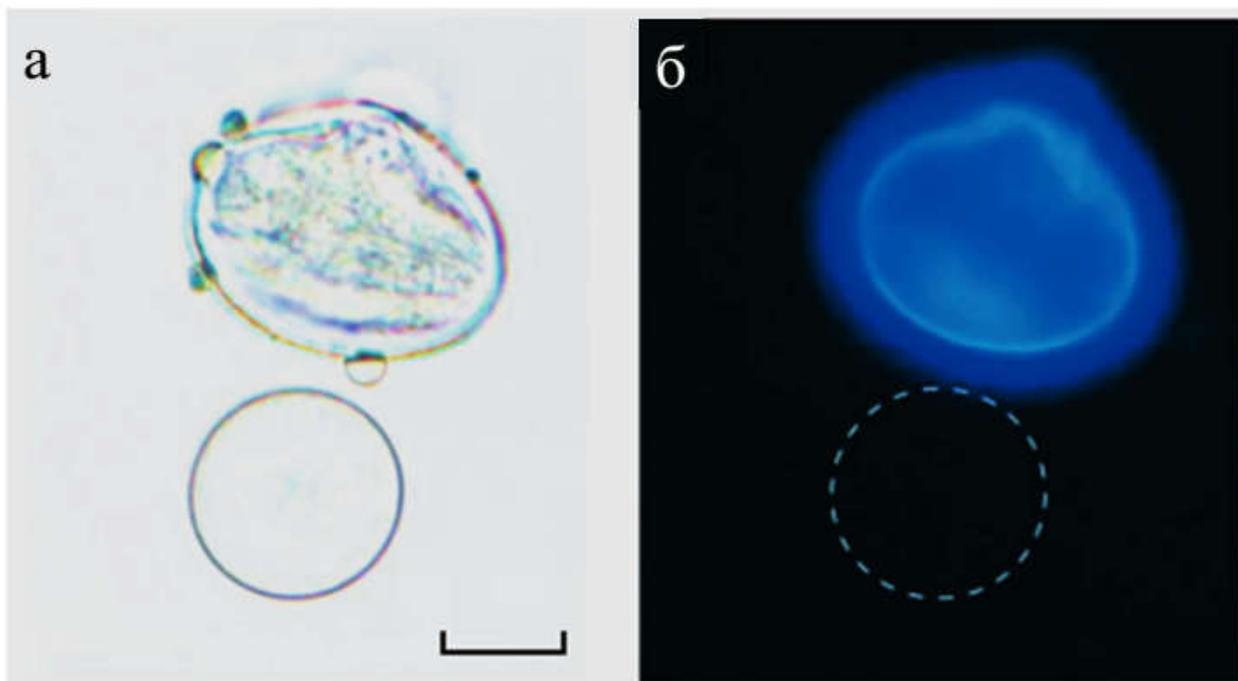


Рисунок 4. Пыльцевое зерно табака и субпротопласт в проходящем свете (**а**) и окрашенные Tinopal (**б**). Отсутствие флуоресценции на поверхности субпротопласта подтверждает полное отсутствие полисахаридной клеточной стенки. Масштабная линейка 10 μm .

Для того, чтобы проверить наличие ядра вегетативной клетки и генеративной клетки, провели окрашивание красителем DAPI, связывающимся с АТ-богатыми участками малой борозды двунитевой ДНК (Kubista et al., 1987). Протопласты, вышедшие через большую апертуру пыльцевых зёрен лилии, содержали как вегетативное ядро, так и генеративную клетку с конденсированным хроматином (**рисунок 5**). На **рисунке 6** представлено окрашивание DAPI субпротопластов из пыльцевых трубок табака: видно, что в субпротопластах нет ни вегетативного ядра, ни генеративной клетки. Подобный результат не удивителен, учитывая, что отделение субпротопластов происходит от апекса, а выделение проводили из пыльцевых трубок длиной примерно в 2 диаметра зерна (при такой длине трубки у табака как вегетативное ядро, так и генеративная клетка всё ещё располагаются в пыльцевом зерне).

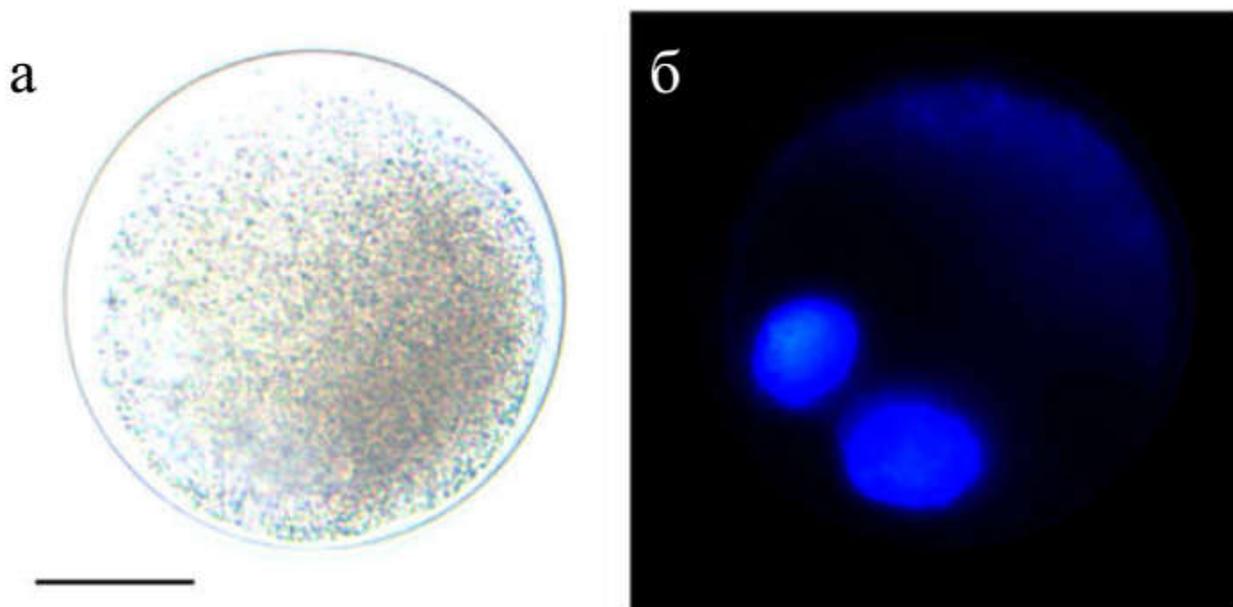


Рисунок 5. Протопласт из пыльцевого зерна лилии в проходящем свете (**а**) и в свете флуоресценции, окрашенный DAPI (**б**). В свете флуоресценции хорошо видны окрашенные вегетативное ядро и генеративная клетка. Масштабная линейка 30 μm .

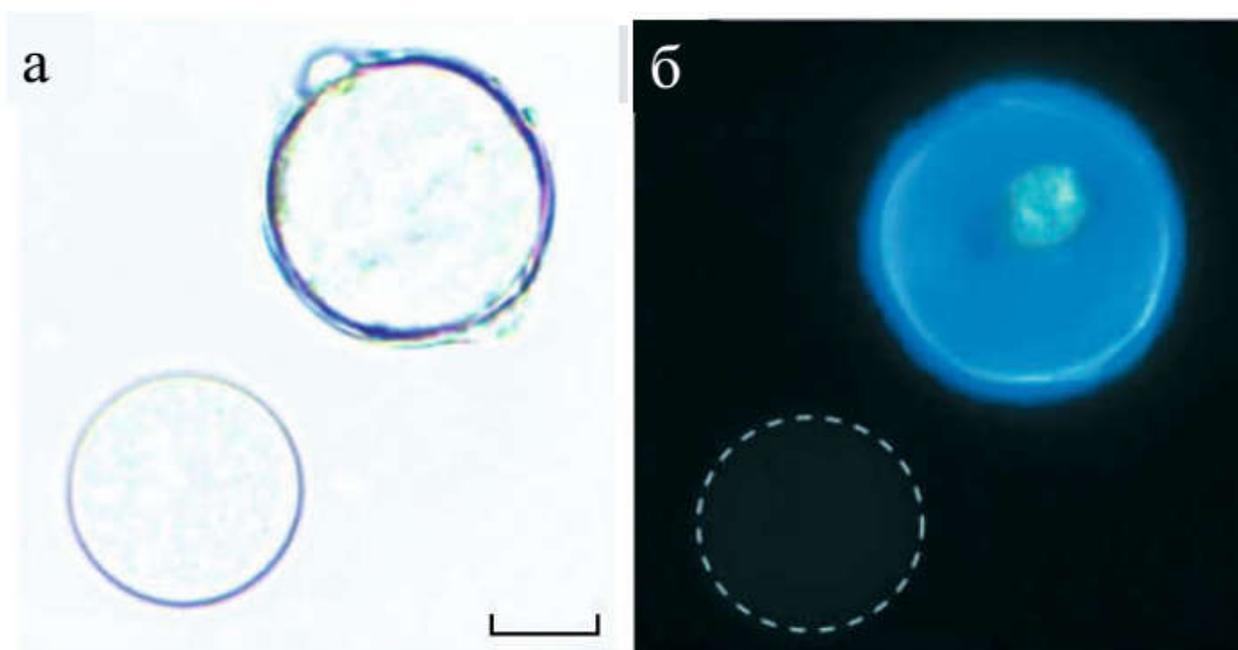


Рисунок 6. Пыльцевое зерно и субпротопласт из пыльцевой трубки табака после обработки ферментами в проходящем свете (**а**) и в свете флуоресценции, окрашенные DAPI (**б**). В пыльцевом зерне видно вегетативное ядро или генеративную клетку. В субпротопласте окрашивание полностью отсутствует, что говорит об отсутствии ядер. Масштабная линейка 10 μm .

II. Функционирование регуляторного модуля $\uparrow A\Phi K \leftrightarrow \uparrow [Ca^{2+}]_{cyt}$ в мужском гаметофите.

II.1. H_2O_2 -индуцированный входящий Ca^{2+} ток в протопластах лилии

Измерения трансмембранного Ca^{2+} тока в протопластах из пыльцевых зёрен лилии проводили наиболее точным и надежным на данный момент методом пэтч-кламп (метод фиксации потенциала) в конфигурации целая клетка («whole cell»). Из *рисунка 7* видно, что каналы, через которые осуществляется ток, потенциал-зависимые и активируются при гиперполяризации плазматической мембраны. Как видно из *рисунка 7 в*, при добавлении 100 μM H_2O_2 во внешнюю среду происходит усиление тока Ca^{2+} в 1.5–2 раза. Проведенный ингибиторный анализ показал, что ток обладает высокой чувствительностью к La^{3+} , что характерно для Ca^{2+} токов, ранее описанных в протопластах из пыльцевых зерен лилии. Незначительное снижение интенсивности тока наблюдалось при действии другого ингибитора – нифедепина.

Обнаружив яркий эффект пероксида водорода, мы должны были проверить, какие концентрации действующего вещества являются губительными для клеток, то есть провоцируют окислительный стресс, а какие не снижают жизнеспособность, то есть могут называться физиологическими. Для этого нами был проведен классический тест на жизнеспособность протопластов с красителем FDA при различных концентрациях H_2O_2 от 0,1 до 10 мМ (*рисунок 8*). На рисунке приводятся лишь крайние концентрации. Можно видеть, что при действии 100 μM H_2O_2 не происходит падения сигнала FDA, то есть жизнеспособность остается на уровне контроля. При дальнейшем повышении концентрации H_2O_2 до 10 мМ происходит снижение интенсивности флуоресценции FDA, свидетельствующее о падении жизнеспособности клетки, в результате выхода за границы редокс-буферной ёмкости цитоплазмы. Также при 10 мМ H_2O_2 наблюдаются цитологические изменения протопластов (оптически прозрачный ободок в субмембранной области).

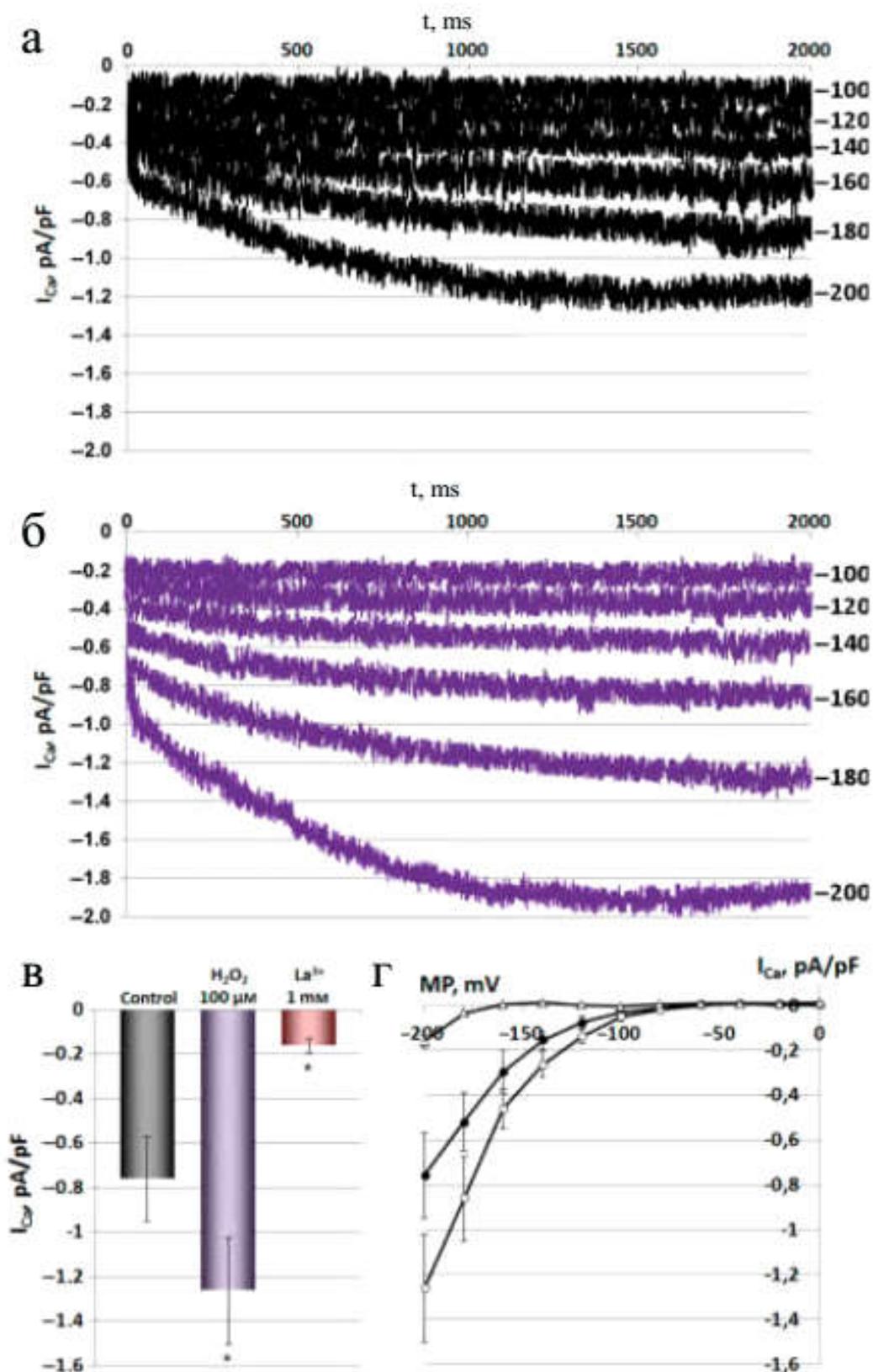


Рисунок 7. Входящий Ca^{2+} ток в протопластах лилии и его модуляция H_2O_2 и $LaCl_3$. Исходный потенциал составлял 0 мВ, затем производили ступенчатое снижение до -200 мВ с интервалами по 20 мВ. Представлены репрезентативные оригинальные записи ионных токов при различных значениях потенциала в контроле (**а**) и после инкубации в течение 5 минут в среде, содержащей 100 μ M

H₂O₂ (б). (в) Сравнение средних пиков Ca²⁺ тока, записанного при -200 мВ в контроле, а также при действии 100 μМ H₂O₂ и ингибитора Ca²⁺-проводящих каналов – 1 мМ хлорида лантана (LaCl₃). Количественные показатели приводятся после вычета линейного тока утечки. Результаты представлены в виде среднего ±ст.ошибка, n = 8. * - статически значимые отличия от контроля (p < 0.05, U-критерий Манна-Уитни). (г) Средние вольт-амперные характеристики пикового входящего Ca²⁺ тока, записанного в контрольных условиях (●), при действии 100 μМ H₂O₂ (○) и в присутствии 1 мМ La³⁺ (Δ). Из приведенных значений также вычтен линейный ток утечки.

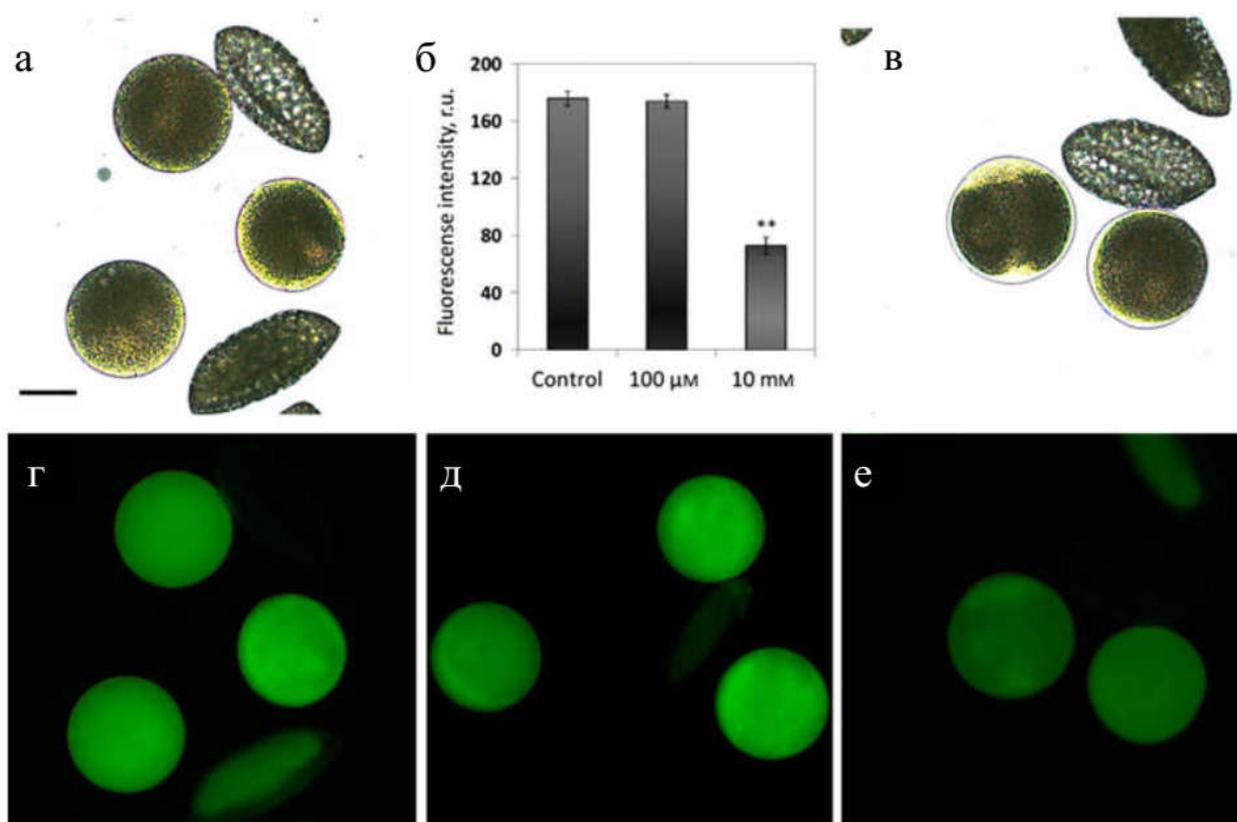


Рисунок 8. Протопласты лилии в тесте на жизнеспособность с FDA в контроле (а, г), при действии 100 μМ (д) и 10 мМ H₂O₂ (в, е). На рисунке б представлено изменение среднего сигнала флуоресценции FDA в контроле, а также при действии 10 μМ и 10 мМ H₂O₂ (n = 350, ** - P < 0.01 по t-критерию Стьюдента).

Эта и даже более низкие концентрации нами в физиологических экспериментах не использовались, а в данном опыте точка 10 мМ служила негативным контролем (стресс-фактор). Однако, J. Wu с соавторами ранее использовали для активации кальциевого тока именно такие концентрации H₂O₂, воздействуя на протопласты из пыльцевых зёрен груши (Wu et al., 2010), хотя едва ли можно говорить о

регуляторной роли пероксида водорода при столь высоких концентрациях. К сожалению, в описанной работе не было проведено никаких тестов на жизнеспособность, поэтому нельзя исключать, что интенсификация Ca^{2+} тока наблюдаемая J. Wu с соавторами, является результатом деструктивных изменений, происходящих в плазмалемме в результате разбалансировки редокс-регуляторных систем клетки.

С применением флуоресцентного АФК-чувствительного красителя DCFH нами было экспериментально показано, что при обработке клеток экзогенным пероксидом водорода вещество проникает через плазматическую мембрану вегетативной клетки, пропорционально повышая уровень внутриклеточных АФК (*рисунок 9*). Данные результаты хорошо согласуются с существующими представлениями о том, что пероксид водорода крайне слабая кислота ($\text{pK}_a = 11.7$), то есть, при физиологических значениях pH молекула H_2O_2 не заряжена, что делает возможной ограниченную диффузию через липидный бислой. Также показано, что свой вклад в поступление H_2O_2 в клетки разных объектов вносят водные каналы (аквапорины), при этом они значительно отличаются между собой по пропускной способности в отношении к H_2O_2 (Bienert et al., 2007, 2006; Miller et al., 2010). В мужском гаметофите *Arabidopsis* и табака также выявлен ряд аквапоринов различной локализации: в плазмалемме, мембранах везикул, тонопласте вегетативной клетки, а также в мембране генеративной клетки (AtNIP4;1, AtNIP4;2, AtTIP1;3, AtTIP5;1, NtPIP1;1, NtPIP2;1) (Bots et al., 2008; Di Giorgio et al., 2016; Soto et al., 2008; Wudick et al., 2014). Аквапорины в пыльце в первую очередь контролируют гидратацию при прорастании, поступление воды в вегетативную клетку и её вакуоль в ходе полярного роста. Однако, опираясь на данные о пропускной способности аквапоринов в отношении H_2O_2 , нельзя исключать, что они принимают участие и в этом процессе. Только у части обнаруженных в мужском гаметофите аквапоринов (AtTIP1;3, AtTIP5;1) при гетерологической экспрессии в дрожжах была исследована пропускная способность к H_2O_2 (Bienert et al., 2007). К сожалению, подробные экспериментальные исследования поступления, компартиментализации и

нейтрализации H_2O_2 в мужском гаметофите пока отсутствуют. С другой стороны, имеются математические модели, описывающие распределение и установление стационарной концентрации H_2O_2 в клетках при его добавлении во внешнюю среду (Marinho et al., 2013). Во всяком случае, наблюдаемый нами результат подтверждает, что на молекулярном уровне H_2O_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 изучения и интерпретации.

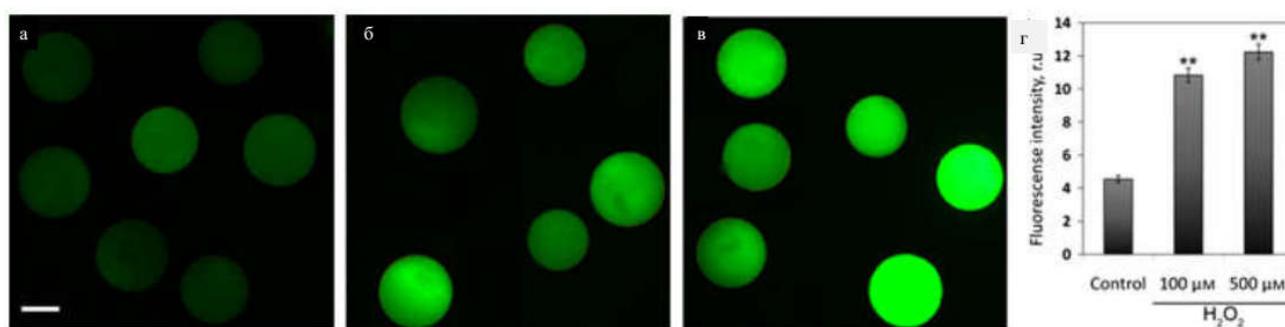


Рисунок 9. Повышение концентрации внутриклеточных АФК в протопластах лилии при воздействии экзогенным пероксидом водорода в концентрации 100 (**б**) и 500 (**в**) μM H_2O_2 по сравнению с контролем (**а**). На графике **г** представлено возрастание интенсивности флуоресценции АФК-чувствительного красителя DCFH при действии пероксида водорода в концентрациях 100 и 500 μM ($n = 120$, ** - $P < 0.01$ по t-критерию Стьюдента).

Можно предположить несколько не исключających друг друга функций обнаруженного H_2O_2 -чувствительного входящего Ca^{2+} тока. Известно, что АФК (главным образом H_2O_2) накапливаются в рецептивных спорофитных тканях рыльца у целого ряда видов (Hiscock et al., 2007). Соответственно, на стадии прорастания пыльцевого зерна *in vivo* данный ток может обеспечивать описанное ранее в ряде работ увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в области функциональной апертуры, с последующим увеличением $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ по всей цитоплазме вегетативной клетки (Diao et al., 2018; Iwano et al., 2004). В этом случае H_2O_2 будет играть роль межклеточного сигнала, генерируемого спорофитными клетками рыльца, и обеспечивать активацию пыльцевого зерна. Естественно, для подтверждения

предположения о том, что H_2O_2 является мессенджером в системе спорофит-гамеофит, требуются дальнейшие эксперименты в системе *in vivo*, однако, в соответствии с поставленными задачами, в данной работе мы уделяли основное внимание установлению возможных механизмов регуляции физиологических параметров пыльцевого зерна экзогенным H_2O_2 . Таким образом, АФК-индуцированная активация входящего Ca^{2+} тока – один из ключевых регуляторных механизмов.

С другой стороны, наличие H_2O_2 -чувствительного входящего Ca^{2+} тока подтверждает, что продуцируемые НАДФН-оксидазой (то есть, эндогенные) АФК могут активировать каналы, через которые осуществляется Ca^{2+} ток, поддерживающий градиент $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Дальнейшие исследования должны быть направлены на идентификацию каналов на молекулярном уровне и установление соответствия между обнаруженными белками и профилями ионных токов. Кроме того, в будущем должны быть изучены точные механизмы АФК-индуцированной активации каналов. Можно предположить, что она происходит через АФК-индуцированное глутатионилирование каналов (подобный механизм, наряду с другими механизмами редокс-регуляции, сопровождающимися модификацией остатков цистеина, был выявлен для целого ряда ион-транспортных систем животных) (Dalle-Donne et al., 2009; Park et al., 2014; Petrushanko et al., 2012; Tang et al., 2011; Yang et al., 2014).

II.2. H_2O_2 -индуцированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ и долговременные эффекты, связанные с регенерацией клеточной оболочки субпротопластов

Значение H_2O_2 в контроле гомеостаза $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ подтверждают эксперименты, проведенные на субпротопластах, выделенных из пыльцевых трубок табака. Для мониторинга $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ был использован флуоресцентный краситель Fluo-3. Полученные результаты иллюстрирует **Рисунок 10**, на котором представлена динамика интенсивности флуоресценции красителя в клетках, обработанных H_2O_2 (10 μM), нормированная к интенсивности флуоресценции контрольных клеток. Видно, что H_2O_2 (10 μM) индуцирует увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в субпротопластах; показатель достигает максимальной величины приблизительно к 6-ой минуте

после добавления H_2O_2 . Аналогичная динамика $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ наблюдалась в работе Foreman с соавторами на корневых волосках: примерно к 4-ой минуте после добавления $\cdot\text{OH}$ (2 мМ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+} + \text{аскорбат}$) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ достигала максимального значения, а затем происходило медленное снижение. Поскольку АФК-индуцированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в корневых волосках и других объектах обусловлено входом Ca^{2+} через ионные каналы плазмалеммы (Foreman et al., 2003) (а не выход кальция, допустим, из внутриклеточных депо), мы предположили, что аналогичным образом происходит вход Ca^{2+} и в нашем случае. Подтверждение было получено с применением ингибиторного анализа: в присутствии дигидропиридинового ингибитора – нифедипина (100 μM) не происходит H_2O_2 -индуцированного увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, т.е., нифедипин полностью снимает эффект пероксида водорода в данной модели. При этом динамика $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в присутствии нифедипина (100 μM) без пероксида не отличалась от контроля. Рассматривая полученный результат в совокупности с данными пЭТЧ-кламп, можно говорить об универсальности регуляторной схемы: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{вход } \text{Ca}^{2+} \text{ через катионные каналы} \rightarrow \text{повышение } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, для двух стадий прорастания мужского гаметофита, а также и для двух групп растений (однодольные и двудольные). Также можно упомянуть, что чувствительность субпротопластов выше, поскольку действующая концентрация пероксида на порядок ниже.

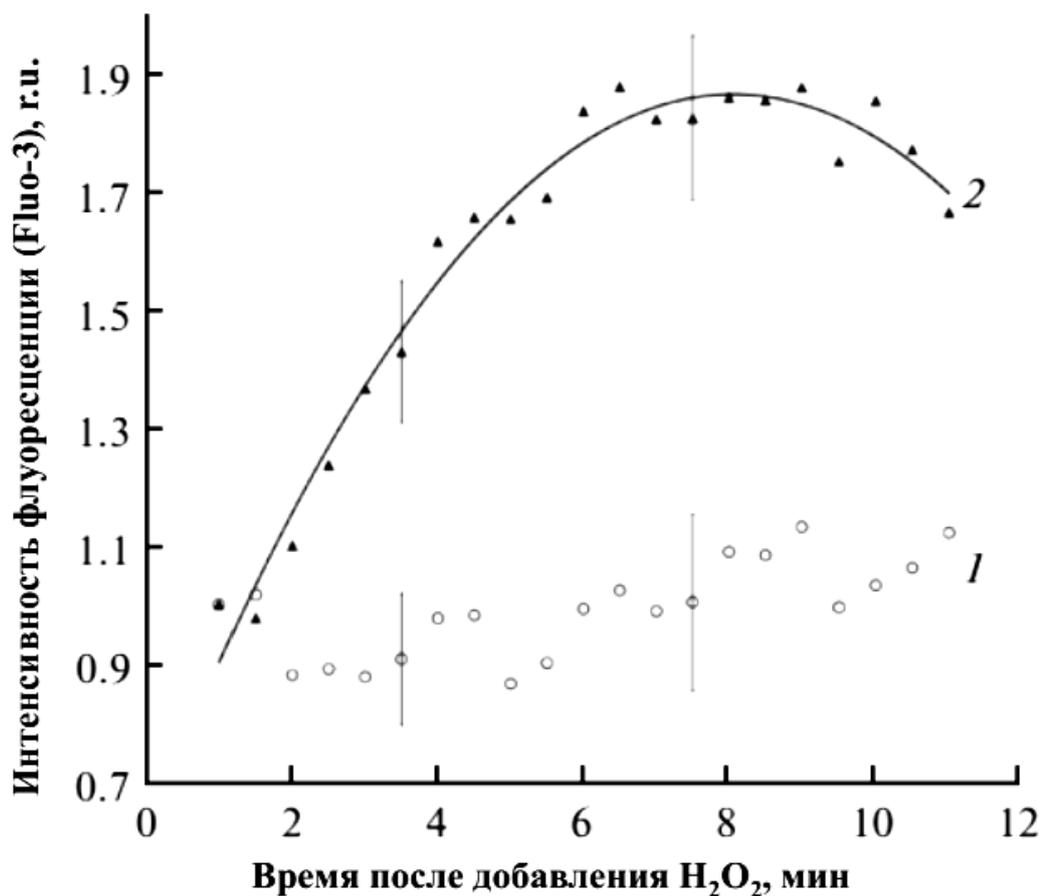


Рисунок 10. Динамика интенсивности флуоресценции Fluo-3, отражающая изменения $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ под действием H_2O_2 ($10 \mu M$). 1 - предобработка субпротопластов нифедипином ($100 \mu M$) снимает эффект H_2O_2 , что подтверждает H_2O_2 -индуированный вход Ca^{2+} в цитоплазму через нифедипин-чувствительные Ca^{2+} -каналы плазмалеммы. Уровень флуоресценции нормализован по отношению к контролю. Приводятся стандартные ошибки среднего.

Нифедипин и другие дигидропиридины широко используются в качестве ингибиторов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазмалеммы животных клеток (Nguemo et al., 2013) и эффективны также в отношении Ca^{2+} -проводящих каналов растительных клеток. Так, например, было показано, что нифедипин значительно подавляет вход Ca^{2+} через каналы, активируемые при гиперполяризации, в клетках суспензионной культуры томата (Gelli and Blumwald, 1997). В ряде работ изучалось действие нифедипина на прорастание пыльцевого зерна и рост пыльцевых трубок. В ранних работах Reiss и Herth, выполненных на *Lilium longiflorum*, было показано, что добавление нифедипина в среду прорастания в

концентрации 10 - 100 μM приводит к диссипации градиента $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, формированию разветвленных пыльцевых трубок и ингибированию роста (Reiss and Herth, 1985). В работе Iwano с соавторами, выполненной на *Arabidopsis*, нифедипин также использовался в качестве эффективного ингибитора Ca^{2+} -проводящих каналов; было показано, что добавление нифедипина (100 μM) приводит к диссипации градиента $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ в прорастающем пыльцевом зерне и ингибирует дальнейший рост трубки (Iwano et al., 2004).

Также нами были обнаружены долговременные эффекты H_2O_2 -индуцированного входа Ca^{2+} в цитоплазму субпротопластов. В качестве маркера физиологической активности был выбран такой удобный для наблюдения показатель, как скорость регенерации клеточной стенки. За процессом мы наблюдали в течение суток и оценивали эффективность регенерации по интенсивности окрашивания протопластов Tinopal. Оказалось, что 10 μM H_2O_2 активирует регенерацию стенки (**Рисунок 11**). В контроле около 20% всех субпротопластов к 20 часам после выделения абсолютно не окрашивались Tinopal, т.е. не имели клеточной стенки, остальные, как правило, имели отдельные патчи (фрагменты) материала клеточной стенки (**Рисунок 12а, б**). Более 95% субпротопластов, инкубированных в течение 20 часов в присутствии H_2O_2 , интенсивно окрашивались Tinopal, при этом значительная часть завершила строительство стенки к этому моменту (**Рисунок 12в**). Предобработка субпротопластов нифедипином снимала обнаруженный стимулирующий эффект H_2O_2 (**Рисунок 12г, д**): окрашивание субпротопластов было ближе к уровню контроля. Данный результат говорит об активации регенерации клеточной стенки под действием H_2O_2 ; при этом тот факт, что ингибитор Ca^{2+} -проводящих каналов снимает наблюдаемый эффект, указывает на участие Ca^{2+} в запуске регенерации клеточной стенки. В качестве одной из гипотез, объясняющих действие Ca^{2+} , можно предложить следующую: увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ может стимулировать слияние мембранных везикул, содержащих полисахариды клеточной стенки, с плазмалеммой. В пользу этого предположения свидетельствуют данные

литературы об участии Ca^{2+} в регуляции экзоцитоза в пыльцевой трубке (Camacho and Malho, 2003; Ge et al., 2007; Roy et al., 1999).

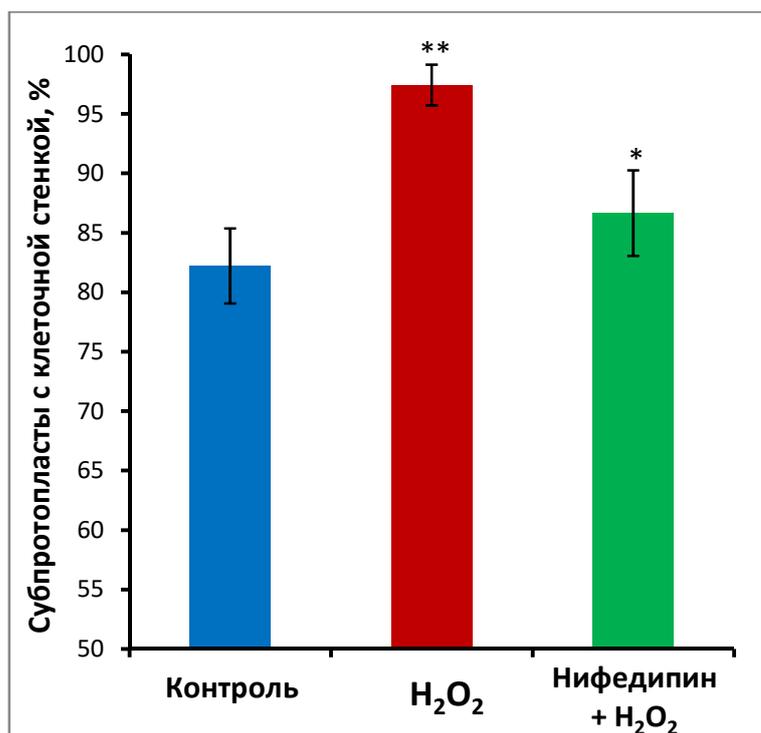


Рисунок 11. Регенерация клеточной стенки субпротопластов после 20 часов инкубации. H_2O_2 (10 μM) активирует регенерацию клеточной стенки субпротопластов. Предобработка субпротопластов нифедипином снимает наблюдаемый эффект. Статистически достоверное различие: ** - $P < 0.01$; * - $P < 0.05$.

Таким образом, влияние пероксида водорода на кальциевый гомеостаз было изучено с двух сторон: во-первых, путём непосредственной регистрации тока кальция 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.

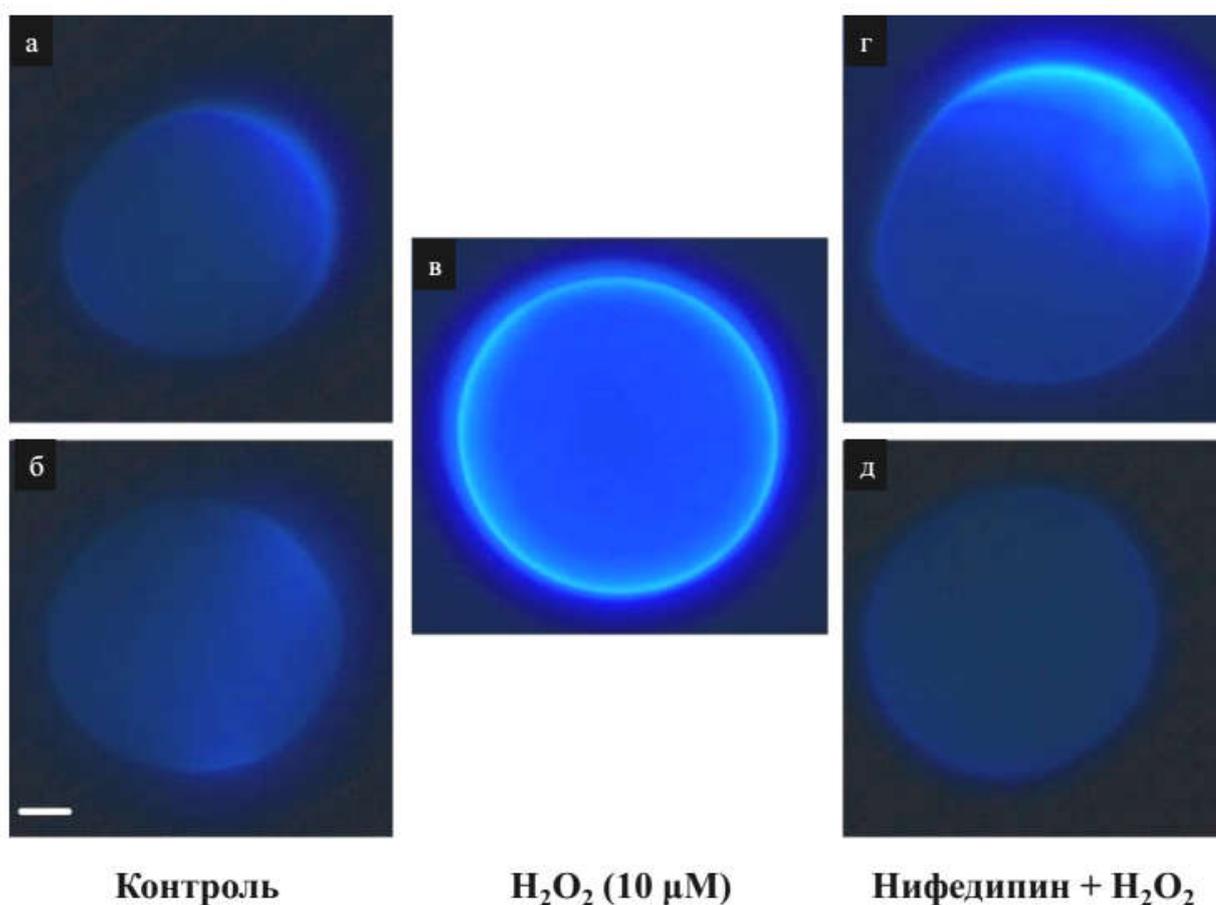


Рисунок 12. Регенерация клеточной стенки субпротопластов после 20 часов инкубации (окрашивание Tinopal). В контроле и при предобработке нифедипином у части субпротопластов клеточная стенка полностью отсутствовала (**б, д**) у некоторых присутствовали отдельные патчи клеточной стенки (**а, г**). В присутствии H_2O_2 большая часть субпротопластов имела клеточную стенку (**в**). Масштабная линейка 4 μm .

III. Регуляторная роль H_2O_2 в контроле K^+ тока

На протопластах из пыльцевых зёрен лилии была показана роль H_2O_2 в контроле выходящего K^+ тока. Запись тока проводили на целых протопластах (конфигурация «whole cell») согласно протоколу Fan с соавторами, разработанному ранее для протопластов из пыльцы *Brassica chinensis* (Fan et al., 2003). Активацию тока обеспечивали деполяризующими прямоугольными импульсами от -58 мВ до +40 - +80 мВ с интервалом в 10 мВ. В ответ на деполяризующий импульс наблюдали сигмовидную кривую выходящего тока, с максимумом на 3 с импульса (**рисунок 13а**). После начала записи тока ждали его стабилизации в течение 3 – 4 минут, и только затем применяли

различные модулирующие агенты. Для подтверждения K^+ -природы тока использовали ингибитор ТЕА. При добавлении 10 мМ ТЕА наблюдали уменьшение тока более чем в два раза (*рисунок 13б, в, г*). При добавлении ТЕА в концентрации 100 мМ ток практически полностью блокировался (*рисунок 13г*). Следует отметить, что ингибирующий эффект ТЕА был обратим и при отмывке протопластов в течение 5 – 7 минут удавалось достичь восстановления интенсивности K^+ тока до контрольного уровня (*рисунок 13а*). Подобные результаты согласуются с данными Griessner и Obermeyer, которые впервые записали K^+ ток в протопластах лилии и продемонстрировали возможность его ингибирования с помощью ТЕА (Griessner and Obermeyer, 2003).

Далее нами была впервые показана возможность H_2O_2 -активации выходящего K^+ тока в протопластах из пыльцы (*рисунок 11а, в, г*). В данной серии опытов были использованы три концентрации H_2O_2 : 10, 100 μ М и 1 мМ. При добавлении H_2O_2 до конечной концентрации 10 μ М статистически значимого эффекта зарегистрировать не удалось. Однако при достижении концентрации H_2O_2 100 μ М было зарегистрировано небольшое по величине (около 10% от контроля), но статистически значимое усиление выходящего K^+ тока. Дальнейшее увеличение концентрации H_2O_2 до 1 мМ усиливало эффект (сила тока возрастала примерно на 20% от контроля) (*рисунок 13в*).

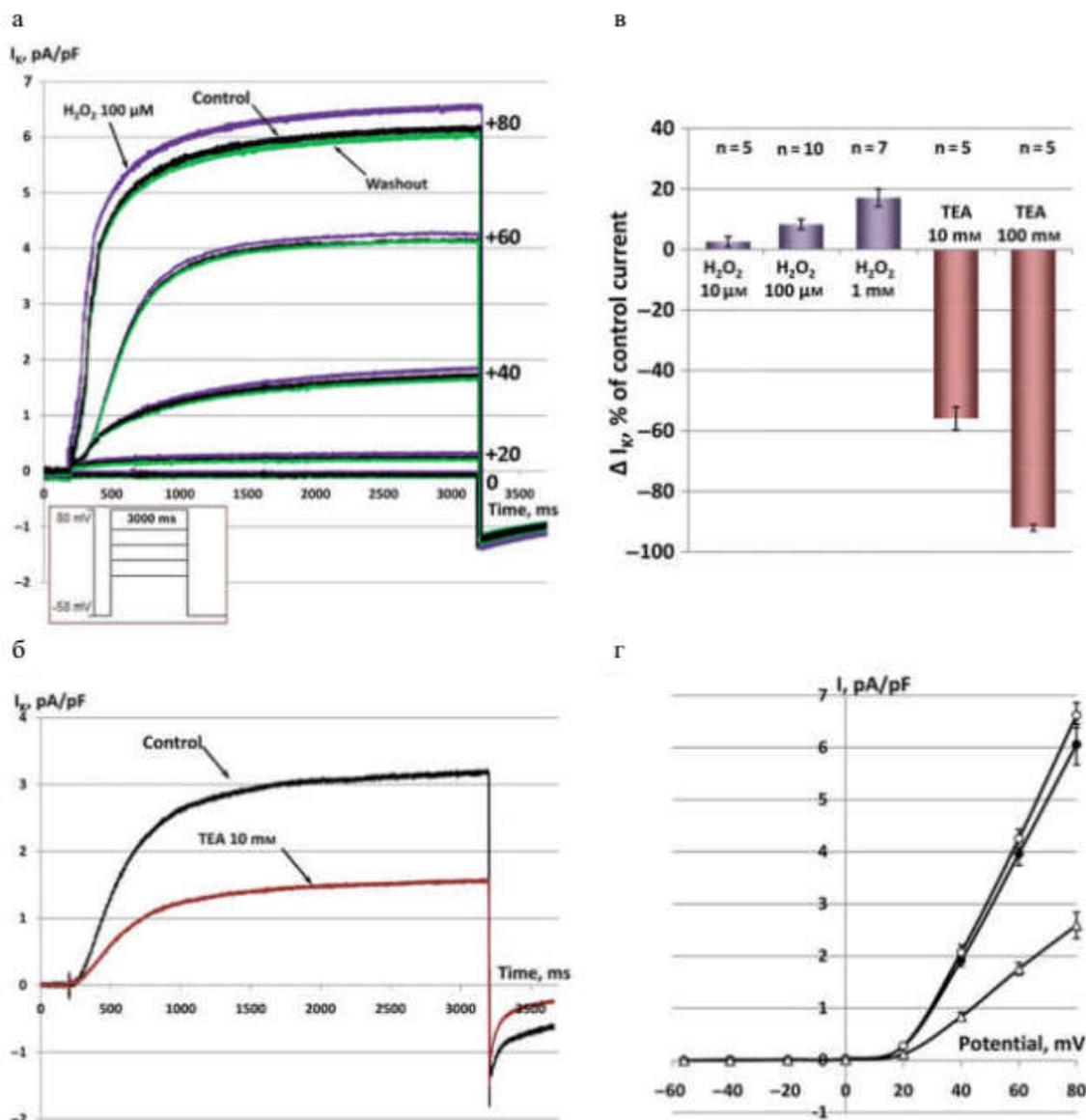


Рисунок 13. Выходящий K^+ ток и его модуляция тетраэтиламином (ТЕА) и H_2O_2 . (а) Оригинальные репрезентативные записи K^+ тока, индуцированного в результате деполяризующего прямоугольного импульса (на вставке) в контрольных условиях (черные кривые), при действии $100 \mu M H_2O_2$ (фиолетовые кривые) и после 5 минут отмывки от H_2O_2 (зелёные кривые). (б) Оригинальные записи K^+ тока, вызванного прямоугольным деполяризующим импульсом от -58 мВ до $+60$ мВ, в контроле (черная кривая) и при добавлении 10 мМ ТЕА. (в) Максимальные изменения в плотности K^+ тока, вызванные H_2O_2 и ТЕА, выраженные в процентах от плотности K^+ тока в контроле. Результаты представлены в виде среднего \pm ст.ошибка, $n = 5 - 10$ протопластов (указано на диаграмме). Все эффекты, кроме действия $10 \mu M H_2O_2$ статистически достоверны ($p < 0.05$, критерий Вилкоксона). (г) Средние вольтамперные кривые для выходящего K^+ тока, записанные в контрольных условиях (\bullet , $n = 7$), с $100 \mu M H_2O_2$ (\circ , $n = 7$) и 10 мМ ТЕА (Δ , $n = 5$).

Обнаруженная активация выходящего K^+ тока под действием H_2O_2 согласуется с тем фактом, что в пыльцевых трубках мутанта *Arabidopsis* с потерей функции НАДФН-оксидаз (*rboh-1 rbohj-1*) происходит снижение интенсивности выходящего K^+ тока (Lassig et al., 2014). Кроме того, в пыльцевых трубках *Arabidopsis* показано уменьшение как входящего, так и выходящего токов при ингибировании НАДФН-оксидаз DPI (100 μ M). Эти факты косвенно свидетельствуют о том, что продуцируемые НАДФН-оксидазой АФК активируют выходящий K^+ ток. Вместе с тем, в обсуждаемой работе R. Lassig с соавторами на пыльцевых трубках не удалось зафиксировать изменений выходящего K^+ тока при добавлении H_2O_2 в высокой концентрации (10 мМ) в среду культивирования. Интерпретируя такой результат, авторы подчеркивают, что добавление H_2O_2 во внешнюю среду не отражает эффекты, наблюдаемые при изменении продукции АФК *in situ* при участии НАДФН-оксидаз. С подобным взглядом нельзя не согласиться, однако следует также отметить, что такой результат, внешне противоречащий полученным нами данным, может являться следствием того, что Lassig с соавторами проводили свои эксперименты на интактных трубках. Известно, что внеклеточный матрикс растений обладает антиоксидантными свойствами, в частности, в стенке присутствуют пероксидазы (Welinder, 1992). Поэтому добавление внеклеточной H_2O_2 к пыльцевым трубкам может не приводить к изменению концентрации H_2O_2 вблизи плазмалеммы и внутри клетки. Такие результаты также могут быть обусловлены видоспецифичностью или тем, что в нашей работе использовались протопласты, выделенные из пыльцевых зёрен (а не трубок). Кроме того, как было показано выше, добавление пероксида водорода до конечной концентрации 10 мМ существенно снижает жизнеспособность протопластов лилии и вполне вероятно, что в описанной работе происходило падение жизнеспособности пыльцевых трубок *Arabidopsis*.

Физиологическое значение активации выходящего K^+ тока H_2O_2 в нашей модели может заключаться в поднятии уровня метаболизма пыльцевого зерна во время прорастания. Ранее при исследовании пыльцы рогоза (*Typha latifolia*) было

показано, что, в зависимости от условий прорастания, в экспериментах *in vitro* происходят потери K^+ от 90% до 35% (выход калия в среду прорастания определяли методом пламенной фотометрии) (Hoekstra et al., 1999). Также в работе Брейгиной с соавторами с применением метода рентгеноструктурного микроанализа был показан выход K^+ и Cl^- из цитоплазмы пыльцевых зерен табака на стадии гидратации и активации (первые 20 минут). При этом удалось показать выход K^+ и Cl^- как в экспериментах *in vitro*, так и в опытах на рыльце *in vivo* (Брейгина и др., 2012). Также известно, что блокаторы каналов, проводящих K^+ и Cl^- (TEA и NPPB, соответственно), являются эффективными ингибиторами прорастания пыльцы (Матвеева и др., 2003). Ранее в работе Bashe и Mascarenhas на *Tradescantia paludosa* была прослежена связь между концентрацией K^+ в цитоплазме вегетативной клетки и интенсивностью синтеза белка на рибосомах (Bashe and Mascarenhas, 1984). В бесклеточной трансляционной системе авторы установили, что оптимальная для синтеза белка концентрация K^+ составляет 100-130 мМ. При $[K^+]_{\text{цит}}$ более 220 мМ трансляция блокируется, поскольку K^+ препятствует связыванию мРНК с рибосомами. Таким образом, высокие значения $[K^+]_{\text{цит}}$ в дегидратированном пыльцевом зерне (> 280 мМ) препятствуют инициации трансляции, а выход K^+ в процессе прорастания является необходимым условием для сборки полисом и активации синтеза белка. Кроме того, в данной работе была показана различная чувствительность мРНК к высоким концентрациям K^+ . Это позволяет предполагать, что постепенное снижение концентрации цитоплазматического K^+ в результате его H_2O_2 -индуцированной утечки может избирательно запускать трансляцию различных мРНК. Подобная гипотеза, конечно, нуждается в дополнительной проверке.

Также следует указать, что, согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Каца, проницаемость мембраны для K^+ играет в растительных клетках ключевую роль в определении мембранного потенциала (Nobel, 2009; Stahlberg et al., 2012; Опритов и др., 1991). Ранее в нашей группе была показана постепенная гиперполяризация плазматической мембраны вегетативной клетки пыльцевого зерна табака при активации и подготовке к прорастанию (Брейгина и др., 2009).

Таким образом, существенную роль в постепенной гиперполяризации может играть H_2O_2 -активируемый выходящий K^+ ток.

IV. АФК-индуцированные изменения мембранного потенциала как интегрального показателя работы ион-транспортных систем плазмалеммы.

IV.1. Гиперполяризация субпротопластов пыльцевых трубок табака, индуцированная H_2O_2

Для проверки возможности влияния H_2O_2 на мембранный потенциал был поставлен эксперимент на субпротопластах из пыльцевых трубок табака. При регистрации динамики мембранного потенциала с помощью быстрого флуоресцентного красителя di-4-ANEPPS в подавляющем большинстве протопластов происходила гиперполяризация плазмалеммы (достоверные различия проявлялись в среднем через 3,5 минуты с момента добавления H_2O_2 до конечной концентрации 10 μM) (*Рисунок 14а*). Следует отметить, что среди многочисленных индивидуальных кривых динамики мембранного потенциала при добавлении H_2O_2 не все демонстрировали гиперполяризацию: встречались такие, в которых эффекта не было или он был направлен в другую сторону, однако данный класс был незначительным и не оказывал влияния на среднее значение.

Одним из механизмов гиперполяризации может быть ингибирование выходящего анионного тока вследствие инактивации соответствующих каналов. На эту возможность указывает сравнение значений F_b/F_g , определенных в настоящей работе, со значениями в работе Брейгиной с соавторами (Брейгина и др., 2009). Так, отношение F_b/F_g субпротопластов в контроле (~ 1.8) близко к таковому в апикальной части контрольной пыльцевой трубки, в то время как после воздействия H_2O_2 значение этого показателя (~ 1.6) соответствует потенциалу в апикальной части пыльцевой трубки после обработки ингибитором анионных каналов NPPB (Брейгина и др., 2009). В связи с этим можно высказать предположение об ингибирующем действии H_2O_2 на анионные каналы. Проверка

этого предположения является одной из ближайших задач в опытах на проточном цитометре, которые сотрудники лаборатории проводят в настоящее время.

Одним из ключевых механизмов действия H_2O_2 на ионные каналы, пока что достоверно обнаруженным лишь в клетках животных, является глутатионилирование. Так, в работе Park с соавторами было показано, что H_2O_2 может активировать K^+ каналы миоцитов кровеносных сосудов крысы путём глутатионилирования, что в дальнейшем приводит к усиленному выходу K^+ из клетки и гиперполяризации плазмалеммы (Park et al., 2014). Показано глутатионилирование Ca^{2+} канала $\text{Ca}_v1.2$ L-типа в кардиомиоцитах человека и морских свинок при окислительном стрессе (Tang et al., 2011). Известно, что глутатионилированию также подвергается каталитическая α субъединица Na/K-АТФазы крыс (Petrushanko et al., 2012). Данный механизм редокс-регуляции активно изучается и, по мнению ряда авторов, может лежать в основе контроля активности ион-транспортирующих белков растительных клеток (Dalle-Donne et al., 2009; Ogawa, 2005; Yang et al., 2014). Однако, на данный момент при исследовании протеомов растений среди глутатионилированных белков не было обнаружено ионных каналов (Dixon et al., 2005; Lee et al., 2004), поэтому рассматривать участие данного механизма в редокс-регуляции у растений можно пока только гипотетически.

Для более детального исследования обнаруженного феномена гиперполяризации необходимо было определить абсолютные величины мембранного потенциала и исследовать распределение этого показателя в популяции субпротопластов. С этой целью был использован медленный потенциал-чувствительный краситель DiBAC₄(3). Распределение популяции субпротопластов по величине мембранного потенциала представлено на **Рисунке 14b**. Обе гистограммы демонстрируют физиологическую гетерогенность популяции клеток, однако, видно, что при воздействии 10 μM H_2O_2 мода распределения (наиболее частое значение в выборке) смещается в более отрицательную область, что указывает на гиперполяризацию большей части протопластов. Также, как и при исследовании динамики мембранного потенциала

по флуоресценции Di-4-ANEPPS, в данном эксперименте H_2O_2 вызывал двунаправленное действие, т.е. часть субпротопластов подвергалась деполяризации (незначительное плечо распределения в области -50 мВ).

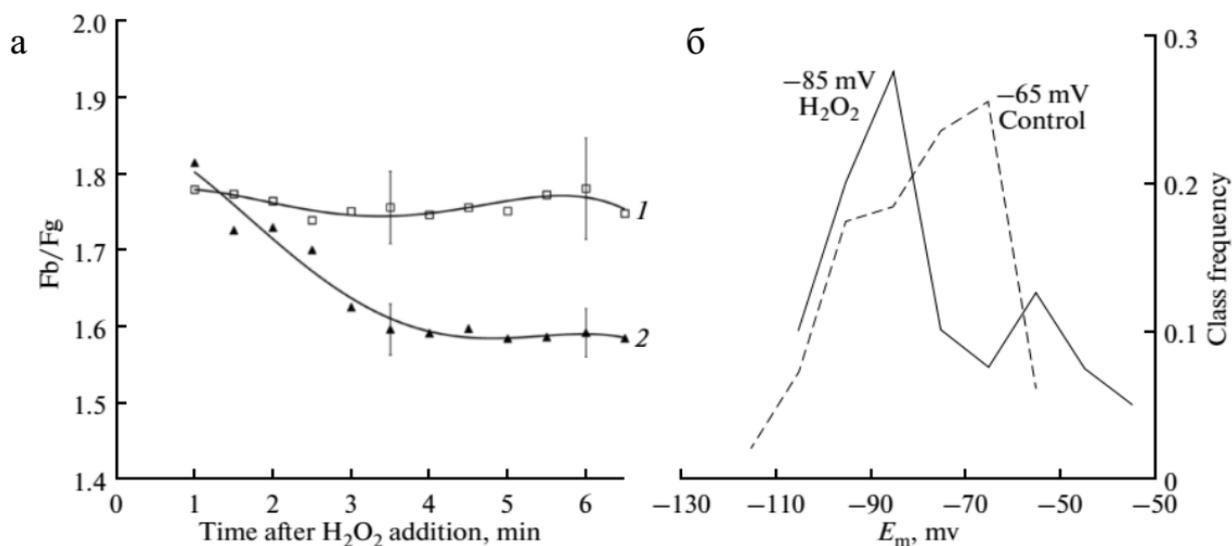


Рисунок 14. Изменение мембранного потенциала субпротопластов табака при действии H_2O_2 ($10 \mu M$). (а) Динамика мембранного потенциала в контроле (1) и при действии H_2O_2 (2) по окрашиванию di-4-ANEPPS. Падение показателя F_g/F_b свидетельствует о гиперполяризации плазмалеммы при добавлении пероксида водорода; статистически достоверные различия (t-тест Стьюдента, $p < 0.05$) регистрируются через 3,5 минуты после добавления H_2O_2 . Приведенные кривые представляют среднее из более чем 20 субпротопластов; приводятся стандартные ошибки среднего. (б) Распределение субпротопластов по значению мембранного потенциала (E_m) в контроле (штриховая линия) и к 10-й минуте после добавления H_2O_2 в конечной концентрации $10 \mu M$ (сплошная линия) на основании окрашивания DiVAC₄(3) и пересчета с использованием фиксированных клеток. На распределении представлены модальные значения.

Таким образом, сдвиг потенциала в сторону более отрицательных значений был обнаружен двумя независимыми методами, что делает этот результат вполне убедительным. Средняя величина мембранного потенциала, полученная в наших опытах (-78 мВ), практически совпадает со значением потенциала в пыльцевых трубках табака (Брейгина и др., 2009) и находится в том же диапазоне, что и значения потенциала пыльцевых трубок для других видов (-55 – 150 мВ) (Malho et

al. 1995; Mouline et al. 2002). Влияние H_2O_2 на мембранный потенциал в мужском гаметофите ранее не изучалось. Однако, эффекты АФК, подобные обнаруженному нами, были ранее описаны в клетках животных. В частности, была показана гиперполяризация миоцитов сосудов под действием H_2O_2 (Matoba et al., 2000), продуцирующегося в эндотелиальных клетках. Авторы предполагают, что в данной системе H_2O_2 может играть роль межклеточного сигнала. С другой стороны, в других системах АФК могут оказывать противоположное действие на мембранный потенциал. Например, была показана деполяризация мембраны корневых волосков в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением $\cdot OH$ (Cu^{2+} и аскорбат) (Demidchik et al., 2010). Деполяризация в этих условиях была обусловлена выходом из клетки K^+ и его противоионов (Cl^- , NO_3^- , малат $^{2-}$, цитрат $^{3-}$). Подобная «утечка» электролитов является маркером стресса, вызванного различными факторами (Demidchik et al., 2014). Выявленная в нашей работе гиперполяризация мембраны субпротопластов под действием H_2O_2 не является компонентом стресса, а напротив, судя по всему, носит сигнальный характер и стимулирует метаболизм (это предположение предстоит проверить).

IV.2. Латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели и его модуляция при сдвиге редокс-баланса

Сотрудниками нашей лаборатории в 2009 был впервые обнаружен латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака (Брейгина и др., 2009): кончик (субапикальный домен) трубки деполяризован относительно более дистальной части, что вполне согласовывалось с представлениями о неравномерном распределении ионных токов и каналов, а также H^+ -АТФазы в плазмалемме растущей трубки (Holdaway-Clarke and Hepler, 2003). Регистрировать потенциал в самом кончике трубки не удавалось из-за интенсивного экзоцитоза в этой зоне мембраны. Позже эти данные обсуждались, были признаны убедительными и цитируются в зарубежной литературе. В работах тех лет было показано, что ключевую роль в поддержании градиента

играют анионные каналы, а также плазмалеммная H^+ -АТФаза. Позже мы исследовали полярный рост на эволюционно более древнем объекте – пыльцевой трубке ели. Предстояло определить, присутствует ли в нём градиент мембранного потенциала, и если да, то какие ион-транспортные системы участвуют в его поддержании.

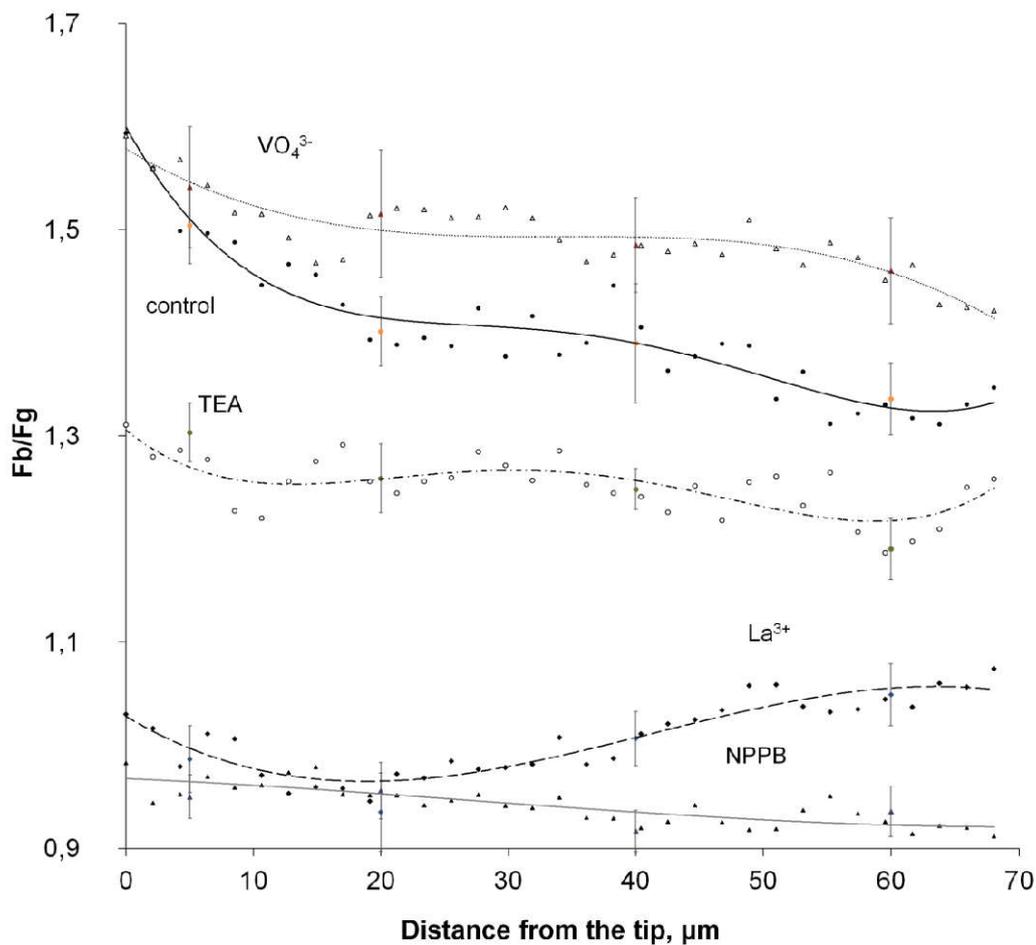


Рисунок 15. Распределение мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели, определенное путём оптического картирования с Di-4-ANEPPS. Величина мембранного потенциала пропорциональна отношению интенсивностей флуоресценции красителя, локализованного в плазмалемме, при возбуждении в синей (Fb) и зеленой (Fg) областях спектра (Fb/Fg). Градиент присутствует в контрольных трубках: в апикальной зоне (5 μm от кончика) мембрана достоверно деполяризована относительно остальных частей трубки (20, 40 и 60 μm от кончика, $P < 0.01$). 100 μM Na_3VO_4 вызывает деполяризацию в суапикальной части и дистальной зоне трубки (20 μm, 60 μm от кончика, $P < 0.05$) и диссипацию градиента; 10 mM TEA, 100 μM $LaCl_3$ и 0.4 mM NPPB вызывают гиперполяризацию по всей длине трубки и диссипацию градиента ($P < 0.01$).

Оказалось, что градиент присутствует в растущих трубках ели, он значительно менее резкий, чем у табака, однако кончик деполяризован относительно более дистальной части (*Рисунок 15*). В случае трубок ели удавалось регистрировать потенциал непосредственно в апикальном домене, поскольку экзоцитоз у ели происходит значительно медленнее и скопления мембранного материала не происходит. Кончик оказался сильнее всего деполяризован. На основании полученных данных мы можем заключить, что такая особенность ионного гомеостаза полярно растущих клеток, как градиент мембранного потенциала, является достаточно фундаментальной и появилась в эволюции относительно давно. Какие же системы участвуют в поддержании градиента? Мы протестировали ряд общепринятых ингибиторов, которые ранее использовались нами в работах на пыльце покрытосеменных и показали свою эффективность: для кальций-проводящих каналов – хлорид лантана, для анионных каналов – NPPB, для калиевых каналов – ТЕА, для H^+ -АТФазы плазмалеммы – ортованадат натрия. Оказалось, что все ингибиторы в той или иной мере сдвигали уровень потенциала, а главное – практически все они снимали градиент, то есть делали значения потенциала равномерными по длине трубки (*Рисунок 15*). При этом ортованадат натрия вызывал деполяризацию в суапикальной части и дистальной зоне трубки (что вполне ожидаемо, если предположить, что в пыльцевых трубках хвойных, как и цветковых растений, H^+ -АТФаза локализована и работает как раз в этих зонах); ТЕА, $LaCl_3$ и NPPB, наоборот, вызывали гиперполяризацию. Это также укладывается в существующие представления: блокирование входных калиевых каналов и выходных анионных каналов сдвигает потенциал в сторону более отрицательных значений. Что касается кальциевых каналов, они, по данным литературы, не регулируют потенциал напрямую, поскольку ток кальция слишком мал, чтобы существенно сдвинуть распределение зарядов на мембране. Однако, их рассматривают как ключевой регулятор ионного транспорта, поэтому эффект La^{3+} на мембранный потенциал можно объяснить именно с этой позиции. Так, мы видим, что эффект

блокаторов кальциевых и анионных каналов практически совпадают, а ранее на цветковых было показано, что внутриклеточный кальций является регулятором анионного транспорта через активацию Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ (у *Arabidopsis* это CPK2/20), обеспечивающих фосфорилирование и последующую активацию анионного канала SLAH3 (Gutermuth et al., 2013).

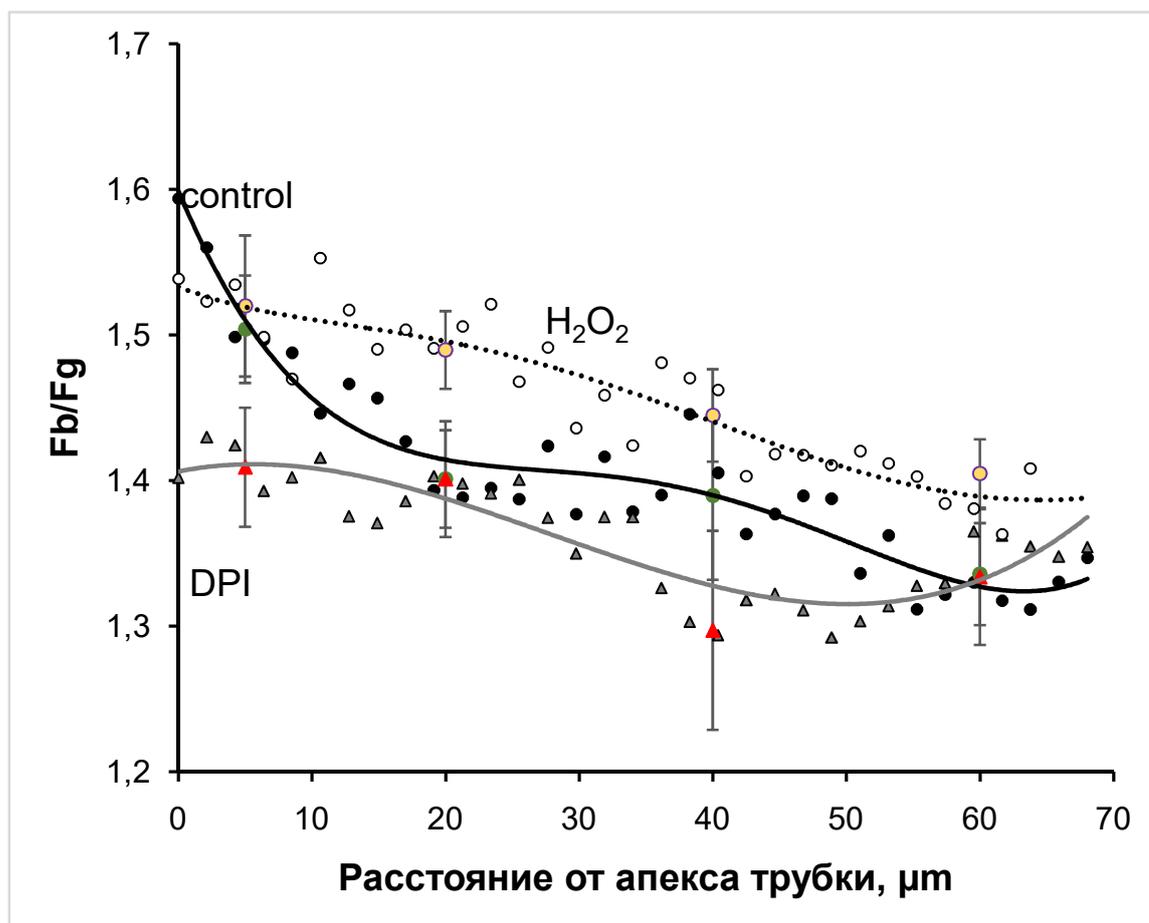


Рисунок 16. Действие H_2O_2 и DPI на распределение мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели (оптическое картирование с Di-4-ANEPPS). 100 μM DPI вызывает гиперполяризацию в апикальной части трубки (5 μm от кончика, $P < 0.05$), H_2O_2 вызывает деполаризацию в субапикальной части трубки (20 μm от кончика, $P < 0.05$).

Обнаружив градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели, мы проверили, реагирует ли этот показатель на сдвиг редокс-баланса, то есть, может ли он участвовать в передаче сигнала от экзогенных АФК и/или быть зависимым от уровня эндогенных АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой плазмалеммы. Чтобы смоделировать экзогенные АФК, которые, возможно,

содержатся в опылительной капле и/или при появлении продуцируются клетками женского спорофита и гаметофита, использовали пероксид водорода в концентрации 100 μM . Чтобы смоделировать изменение внутреннего баланса АФК, использовали ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилен-иодониум (DPI).

На *Рисунке 16* видно, что блокирование НАДФН-оксидазы вызывает диссипацию градиента за счёт гиперполяризации в апикальной зоне. Это вполне согласуется с предположением о том, что производство АФК с помощью этого фермента максимально в апикальной зоне пыльцевой трубки, которое неоднократно высказывалось в литературе (Wudick and Feijo, 2014), хотя данные на этот счет были весьма противоречивые (Cardenas et al., 2006; Liu et al., 2009; Potocký et al., 2012). В тоже время, апикальная локализация данного эффекта может указывать не то, что он опосредован ионами кальция, концентрация которых в норме максимальна именно в кончике (Wang et al., 2009). Сравнивая эффекты DPI и блокатора кальциевых каналов, мы видим, что они однонаправлены (оба вызывают повышение потенциала по абсолютной величине и диссипацию градиента), хотя в случае прямого эффекта на кальциевые каналы гиперполяризация значительно более выражена. Добавление экзогенного H_2O_2 в концентрации 100 μM не влияло на мембранный потенциал в апикальной области, а, напротив, вызывало деполяризацию по длине трубки в ее дистальной области (*Рисунок 16*). Вопрос о посредниках данного эффекта в настоящий момент может обсуждаться только на уровне спекуляции, т.к. мишени для АФК у хвойных ещё совершенно не изучены. По аналогии с покрытосеменными можно предположить, что ими являются каналы, проводящие Ca^{2+} и K^+ . В этом случае наблюдаемую деполяризацию можно было бы объяснить активацией данных каналов (входящий ток). Однако, поскольку на протопласты из пыльцевых трубках табака пероксид водорода, как мы выяснили, действует противоположным образом (*Рисунок 14*), скорее, следует предположить, что у хвойных растений мишенями для АФК могут быть другие ион-транспортные системы, которые ещё предстоит изучить. Из данной части работы мы можем заключить, что обе системы – система транспортёров, поддерживающая латеральный градиент потенциала, и система

реагирования на небольшие изменения уровня АФК – уже у хвойных активно функционируют в пыльцевых трубках и взаимосвязаны. Вопрос о редокс-сигналинге при прорастании пыльцы хвойных растений ранее не изучался, и принципиальная возможность быстрой реакции на такого рода сигнал впервые была продемонстрирована нами.

V. Cu^{2+} и Ni^{2+} как регуляторы ионных токов на плазмалемме пыльцевого зерна

Использование протопластов из пыльцевых зёрен лилии в качестве модельной системы для измерений ионных токов методом пэтч-кламп открыло широкие возможности для проверки возможных влияний различных реагентов на ионный транспорт в мужском гаметофите. Наряду с физиологическими (сигнальными) воздействиями АФК, такими, как описанный выше эффект низких концентраций H_2O_2 , мы изучали однозначно стрессовые воздействия, которые модулируют прорастание пыльцы в ситуации антропогенной нагрузки на экосистемы, в том числе, активируя продукцию АФК. Мы выбрали два металла, Cu^{2+} и Ni^{2+} , которые представляют собой два широко распространенных промышленных токсиканта, оказывающие серьезные эффекты на рост и развитие растений (Mohsenzadeh and Chehregani, 2011; Viehweger, 2014), один из которых, по данным литературы, действует в основном через посредство АФК, а второй преимущественно оказывает АФК-независимые эффекты.

V.1. Cu^{2+} -индуцированная продукция АФК в протопластах

В оптимальных концентрациях Cu принимает участие в многочисленных метаболических процессах благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам (Anjum et al., 2015); в случае избытка данного элемента те же свойства приводят к гиперпродукции АФК (Rodrigo-Moreno et al., 2013). Cu - широко известный участник реакции Фентона, которая является частью цикла взаимопревращений АФК (так называемого цикла Габера-Вейса) (Pham et al., 2013). Ni^{2+} , напротив, не может служить эффективным катализатором продукции

АФК, поскольку его окислительно-восстановительный потенциал довольно высок. При длительной инкубации никель может косвенно способствовать продукции АФК в стрессированных клетках, однако, поскольку в данной работе мы регистрировали только прямые эффекты на очень коротких временах, никель рассматривался как АФК-независимый модулятор. Гиперпродукцию АФК в протопластах под действием 100 μM Cu^{2+} иллюстрирует **Рисунок 17**. Уровень АФК в присутствии Ni^{2+} достоверно не отличается от контроля.

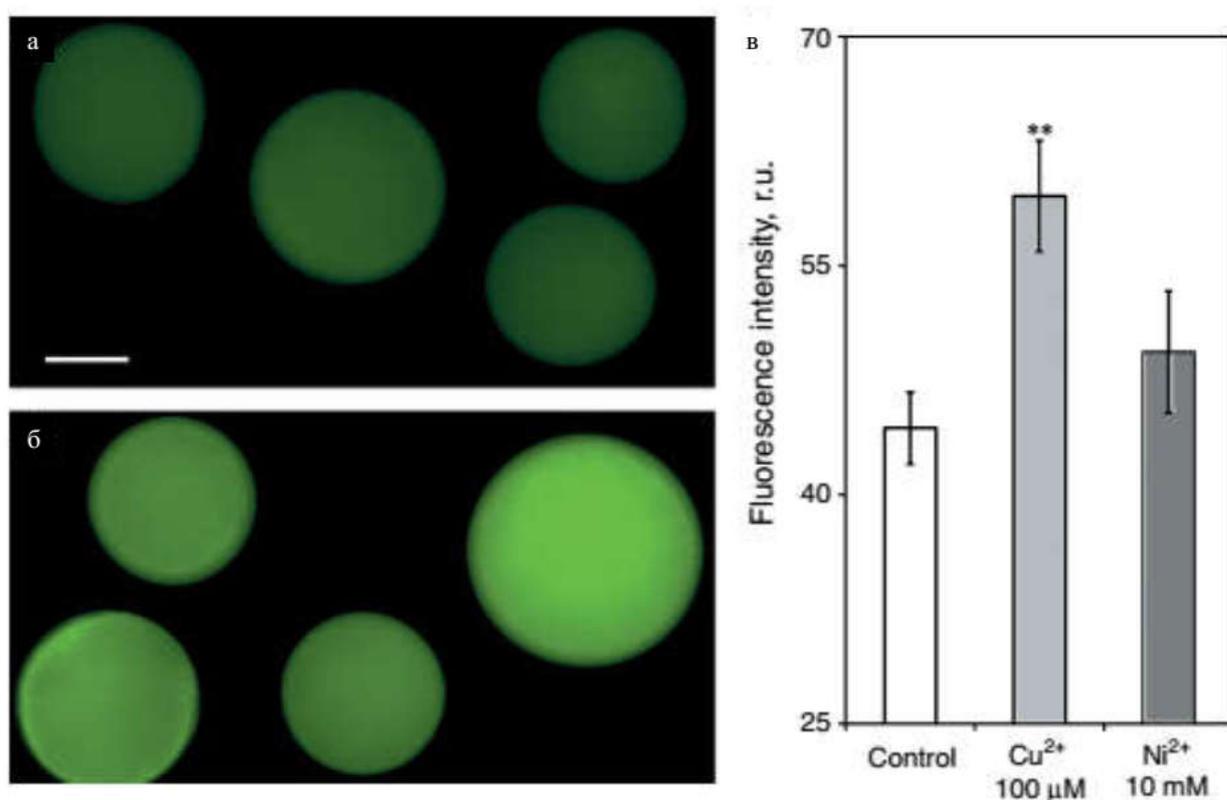


Рисунок 17. Накопление АФК в пыльцевых протопластах, обработанных тяжелыми металлами. а, б – АФК-зависимая флуоресценция DCFH в контрольной суспензии (а) и после 10-минутной обработки 100 μM Cu^{2+} (б). Средние значения сигнала для популяции протопластов ($n = 120$) демонстрируют умеренное возрастание этого показателя при инкубации с медью ($P < 0.01$, t тест Стьюдента) (г). Протопласты, обработанные Ni^{2+} (1 mM), достоверно не отличались по уровню АФК от контрольных.

На основании данных литературы о действии тяжелых металлов на ионный транспорт в различных модельных системах (зиготы, устьичные клетки, клетки корня и т.п.) для пэтч-кламп опытов было выбрано два тока: K^+ и H^+ . Оба тока

достаточно сильные, их принципиальное отличие в механизме переноса иона: если K^+ ток проходит через каналы, то транспорт H^+ энергозависимый и происходит с участием протонной помпы. Известно, что выход K^+ и H^+ активируются на начальных этапах прорастания пыльцевого зерна до появления трубки, однако если выход K^+ происходит, предположительно, по всей поверхности вегетативной клетки, то выкачивание протонов приурочено к месту выхода трубки (Bashe and Mascarenhas, 1984; Feijó et al., 1995; Michard et al., 2016). Оба иона непосредственно участвуют в регуляции мембранного потенциала пыльцевого зерна и трубки.

V.2. Действие Ni^{2+} на выходящий ток K^+

Выходящий K^+ ток регистрировали по ранее упомянутой методике (Fan et al., 2003), аналогично экспериментам с пероксидом водорода (см. *Раздел III*). Принадлежность тока проверяли путём добавления ингибитора ТЕА (*Рисунок 13*). Чтобы выявить возможное действие тяжелых металлов, испытывали $100 \mu M Cu^{2+}$, 1 и $10 mM Ni^{2+}$. В то время как остальные воздействия (*Рисунок 18б*) не вызывали заметных изменений тока, $10 mM Ni^{2+}$ провоцировал резкое и сильное снижение амплитуды K^+ тока (*Рисунок 18*), которое было полностью обратимо (отмывка 7-10 мин). Таким образом, никель обратимо ингибирует калиевый ток. Этот результат согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными о разнообразных эффектах никеля на пыльцевые зёрна и трубки табака (Breugina et al., 2012). Так, никель обратимо ингибировал прорастание пыльцевых зёрен табака в концентрации $1 mM$, при этом критической фазой для его действия была стадия активации (до 30 минут). Трубки реагировали на металл неоднозначно: многие переставали расти, но некоторые даже ускоряли свой рост. У замедливших рост обнаруживались нарушения мембранного транспорта (экзоцитоза) и аномальное отложение каллозы в кончике. 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 показано с помощью специфического окрашивания (Breygina et al., 2012).

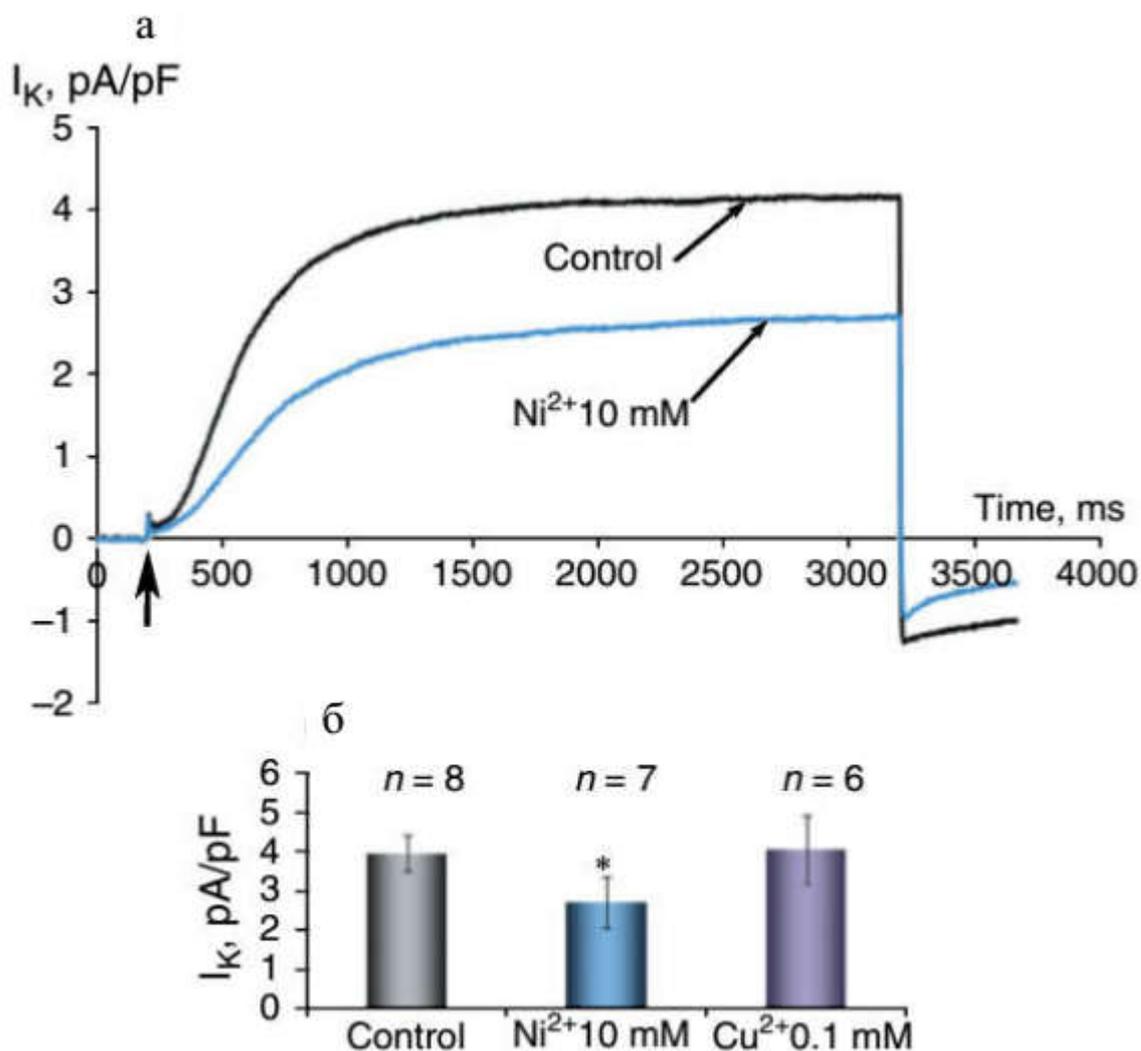


Рисунок 18. Ингибирование выходящего калиевого тока Ni^{2+} . а – оригинальное измерение калиевого тока, активированного прямоугольным импульсом в контрольных условиях и после добавления 10 mM Ni^{2+} . б – сравнение максимальной плотности тока в контрольных условиях и в присутствии 10 mM Ni^{2+} или 100 μM Cu^{2+} . Представлены средние \pm стандартная ошибка, количество измеренных протопластов указано над столбцами диаграммы ($P < 0.05$, тест Mann-Whitney).

Следует отметить, что в присутствии эффективных концентраций никеля протопласты оставались вполне жизнеспособными и поддерживали мембранный потенциал на постоянном уровне (*Таблица 1*). Можно заключить, что способность пыльцевого зерна поддерживать гомеостаз оказалась не затронута

никелем в концентрации 10 мМ, что вполне согласуется с обратимостью эффекта на ток K^+ . Отсутствие изменений мембранного потенциала при активации калиевого тока может быть связано с компенсаторными токами через другие ион-транспортные системы, например, анионные каналы. Чувствительность ион-транспортных систем растительных клеток к никелю и другим двухвалентным металлам была показана в классических работах на корнях кукурузы (Cocucci and Morgutti, 1986; Morgutti et al., 1981), но эффекта на калиевые каналы в этих работах не наблюдали. Стоит отметить, что чувствительность неселективных катионных каналов (NSCC) к никелю была показана для тонопласта в клетках гипераккумулятора никеля (Corem et al., 2009). Чувствительность калиевых каналов плазмалеммы к никелю в растительных клетках описана нами впервые. Отсутствие реакции калиевого тока на медь говорит о специфичности данного эффекта. Данный эффект может лежать в основе стрессового действия высоких концентраций никеля на клеточном уровне, а также служить для запуска защитного ответа.

V.3. Активация протонного тока под действием Cu^{2+}

Для измерения выходящего протонного тока электрические параметры установки были заданы в соответствии с Taylor and Assmann (Taylor and Assmann, 2001). Поскольку носителем протонного тока служит АТФаза, а не потенциал-чувствительные каналы, для его запуска использовался 5-секундный широкий скачок потенциала от -100 to +100 мВ (*Рисунок 19, врезка*) (помпы не требуют, в отличие от каналов, времени на активацию и дезактивацию). Стабилизация потока занимала 15 минут, после чего производили добавки необходимых химических агентов. Запись в контрольной группе протопластов шла непрерывно для сравнения с опытными пробами.

Na_3VO_4 (3 мМ), стандартный блокатор АТФаз Р-типа, вызывал значительное уменьшение регистрируемого потока (*Рисунок 19*), хотя полностью подавить его он не мог: для этого требовалась более высокая концентрация, однако, она препятствовала контакту протопласта с пипеткой (отрыв мембраны),

поэтому мы не использовали ее. Чувствительность протонной помпы плазмалеммы к ортованадату была ранее показана для пыльцы лилии (Pertl et al., 2010), а параметры тока, который мы регистрировали, были очень похожи не те, которые описали ранее другие авторы, идентифицировавшие ток протонов через H^+ -АТФазу в этом объекте (Gehwolf et al., 2002). Поэтому мы считали, что наблюдаемый эффект на ток представляет собой эффект на H^+ -АТФазу плазмалеммы.

В опытах с регистрацией H^+ тока мы испытывали $100 \mu M Cu^{2+}$ и $10 mM Ni^{2+}$ при разных значениях потенциала. При $+100 mV$ ни один из металлов не оказывал значимого эффекта на протонную помпу (*Рисунок 19 с*), при $0 mV$ $10 mM Ni^{2+}$ также никакого влияния не оказывал, а $100 \mu M Cu^{2+}$ вызывала значительное повышение амплитуды регистрируемого тока (*Рисунок 19 в*), которое не проявлялось в присутствии ортованадата. Таким образом, VO_4^{3-} -чувствительный H^+ ток значительно усиливается в присутствии Cu^{2+} .

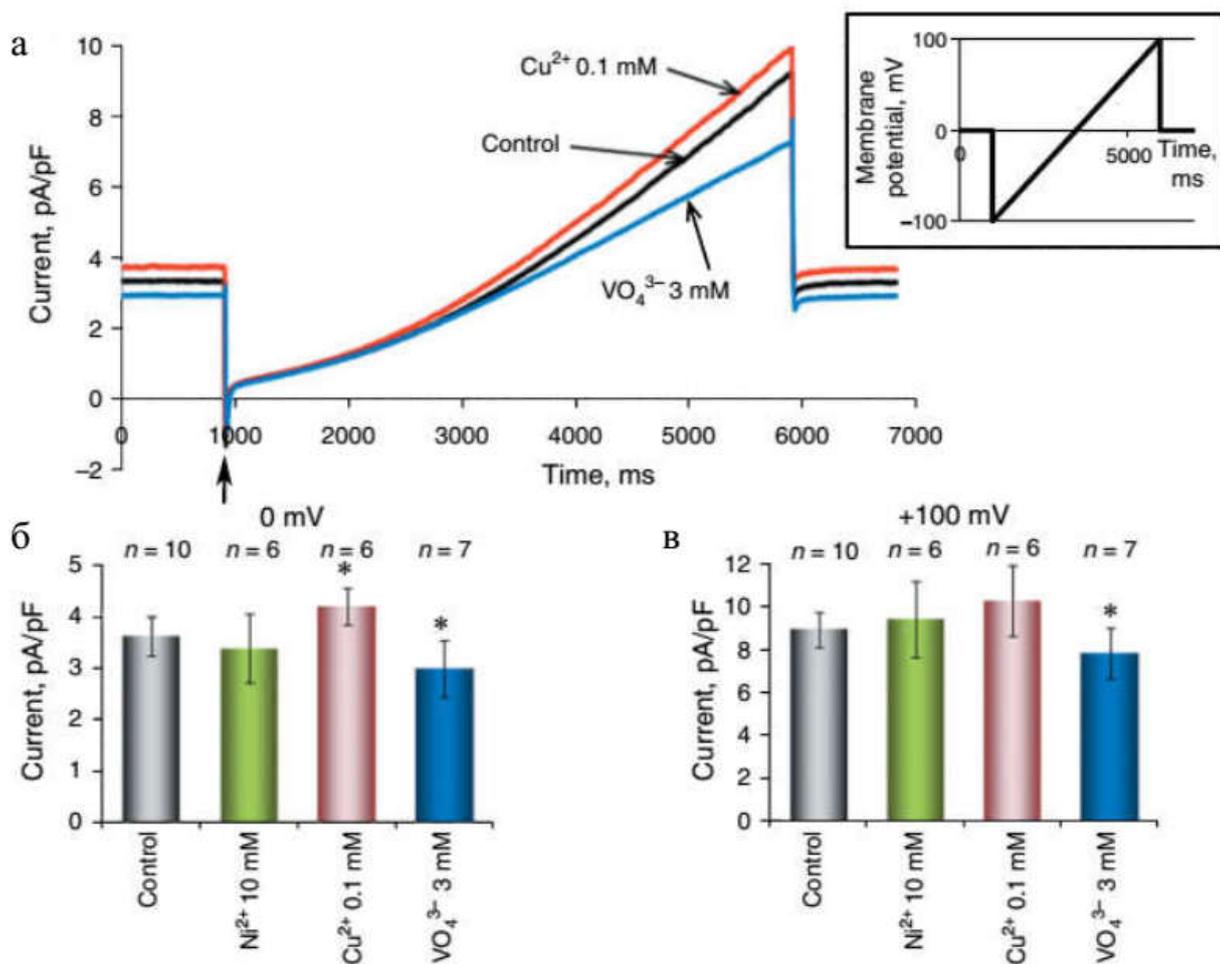


Рисунок 19. Выходящий H^+ ток в протопластах из пылевых зёрен лилии а – оригинальная кривая (на врезке – протокол активации тока сдвигом потенциала) в контроле, в присутствии 3 mM VO_4^{3-} и 100 μM Cu^{2+} . б, в – сравнение плотности тока при потенциале покоя (б) и максимально положительных значениях (а) в контроле и в присутствии 10 mM Ni^{2+} , 100 μM Cu^{2+} и 3 mM VO_4^{3-} . Представлены средние с измерений 6-10 протопластов (количество над столбиками) и стандартные ошибки. * - достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$, тест Mann-Whitney).

Обнаруженные изменения активности H^+ -АТФазы могли бы послужить причиной изменения внутриклеточного рН в протопластах с 100 μM Cu^{2+} . Мы использовали ратиометрический краситель BCECF для количественной оценки рН цитозоля и не обнаружили заметного сдвига этого показателя после 20-минутной инкубации с медью (**Таблица 1**). По всей видимости, внутриклеточный рН эффективно поддерживается на постоянном уровне даже при сдвиге активности H^+ -АТФазы.

В работах, выполненных на спорофитных тканях, было установлено, что H^+ -АТФаза играет ключевую роль в адаптации растений к меняющимся условиям окружающей среды, особенно в случае воздействия стрессовых факторов (Janicka-Russak, 2011). Действие Cu^{2+} на активность перекачки H^+ было зафиксировано в различных объектах, и эффекты были также различными. Например, противоречивые данные были получены для корней кукурузы и огурца *in vivo*: Cu^{2+} индуцировал выход H^+ в корнях кукурузы, а у огурца наблюдали его ингибирование (Burzyhski and Kolano, 2003). Активация H^+ -АТФазы в ситуации стресса, вызванного Cu^{2+} и Cd^{2+} , была обнаружена в другом исследовании клеток корня огурца (Janicka-Russak et al., 2012). Вестерн блот показал, что возросшая активность H^+ -АТФазы в этом случае была вызвана фосфорилированием фермента (Janicka-Russak et al., 2012). Активация протонной помпы на плазмалемме происходила и в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, подвергшихся умеренному стрессу в присутствии меди (максимальная концентрация 0.5 мМ) (Fernandes and Sa-Correia, 2001), а у *Dictyostelium discoideum* этот металл ингибировал H^+ -АТФазу (Serrano et al., 1985). Регуляция активности этого фермента тяжелыми металлами в пыльце ранее не изучалась.

В тех работах, где было показано блокирование протонной помпы, речь шла о токсическом действии Cu^{2+} , а в случаях, когда она активировалась, авторы предположительно относили этот эффект к комплексу защитных механизмов, помогающих клеткам сохранить жизнеспособность в присутствии тяжелых металлов. Поэтому стимулирующий эффект, обнаруженный нами в пыльце, может рассматриваться как регуляция активности фермента, вовлеченная в кратковременную адаптацию. Мы показали, что рН цитозоля в пробах с медью сохранялся на контрольном уровне и можем заключить, что способность пыльцевого зерна поддерживать гомеостаз оказалась не затронута медью: активация H^+ токов в присутствии Cu^{2+} не вызывает сдвига рН. Этот результат вполне объясним, учитывая, что рН в мужском гаметофите регулируется целым комплексом механизмов (Matveeva et al., 2003).

Таблица 1 Отсутствие эффектов Cu^{2+} на рН (оценивался с помощью флуоресцентного ратиометрического красителя BCECF), а также Cu^{2+} и Ni^{2+} на мембранный потенциал (оценивался с помощью потенциал-чувствительного ратиометрического красителя di-4-ANEPPS). Отсутствие статистически значимых отличий было проверено с использованием критерия Стьюдента.

	Control	100 μM Cu^{2+}	10 mM Ni^{2+}
BCECF	1,32±0,04	1,39±0,03	-
Fb/Fg	2,67±0,05	2,76±0,03	2,65±0,05

VI. Особенности АФК-регуляции прорастания пыльцы хвойных растений.

Основной массив работ по изучению полярного роста относится к исследованию пыльцевых трубок и корневых волосков покрытосеменных растений (см. *Обзор литературы*). Однако в нашей работе мы также использовали эволюционно более древний объект с полярным ростом, который характеризуется рядом особенностей, в том числе, низкой скоростью роста: мужской гаметофит ели голубой. Фундаментальный интерес представляли особенности АФК-регуляции данного типа полярного роста. В рамках данного проекта мы исследовали распределение внутриклеточных АФК в пыльцевой трубке ели, выделение АФК в окружающую среду и значение различных АФК для прорастания. Редокс-регуляция мембранного потенциала была рассмотрена выше (*раздел IV.2.*).

VI.1. Выделение АФК во внеклеточную среду пыльцой ели

Мы использовали связанный с БСА непроникающий в клетки краситель ОхуBurst, чтобы регистрировать уровень внеклеточных АФК в среде прорастания. Мы обнаружили, что в среде, кондиционированной пыльцевыми зёрнами в течение 1 минуты, уже содержатся заметные количества АФК по сравнению с чистой средой (*Рисунок 20a* представляет собой репрезентативную запись спектра флуоресценции). Количество АФК продолжило увеличиваться в течение последующей инкубации пыльцы в контрольной суспензии (*Рис. 20*). Для

определения возможного источника внеклеточных АФК использовался ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодониум (DPI). 0.1 mM DPI не оказывал влияния на количество АФК в среде после 1 минуты инкубации, однако он блокировал дальнейшее повышение уровня АФК (*Рис. 20б*).

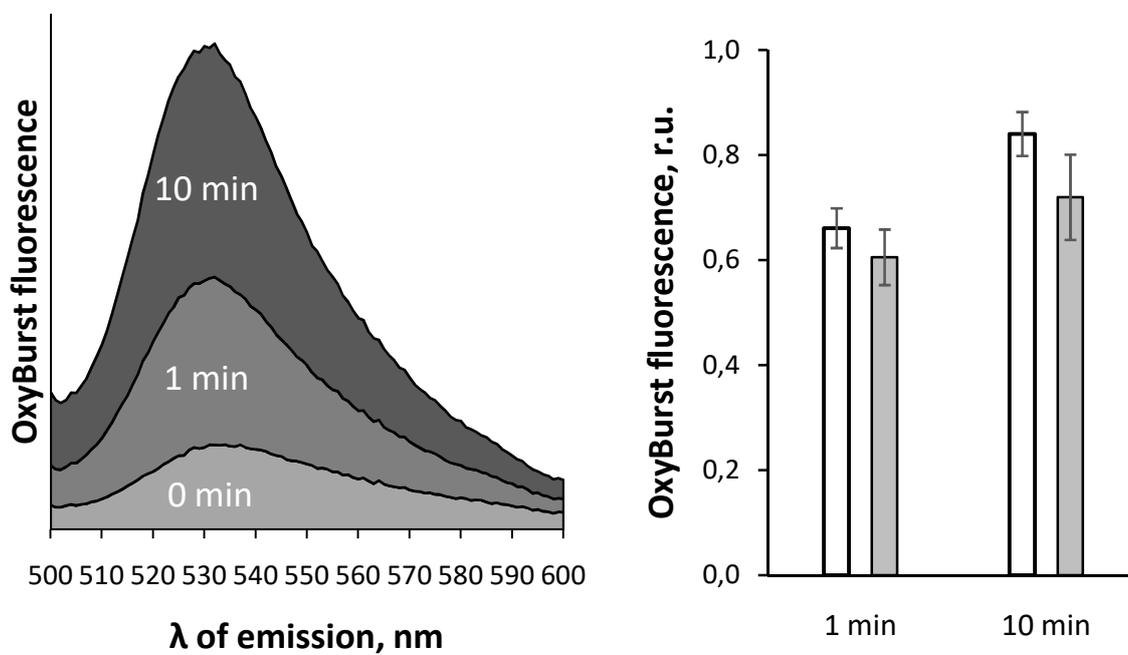


Рисунок 20. Внеклеточные АФК, выделяемые пыльцой на ранней стадии прорастания. а – репрезентативная запись спектра флуоресценции АФК-сенсора ОхуВурст в контрольной среде до (0 мин) и после 1 и 10 минут инкубации пыльцы. б – эффект DPI на выделение АФК (средние на основании 5 суспензий). В контрольной суспензии (белые столбики) флуоресценция существенно выросла в интервале от 1 до 10 минут ($P < 0.01$, t-критерий Стьюдента), а в суспензии с DPI (серые столбики) статистически значимого возрастания не наблюдалось.

Таким образом, мы можем 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, по всей видимости, в основном обеспечивается НАДФН-оксидазой. Ранее в нашей лаборатории был обнаружен выход АФК из пыльцевых зёрен табака: для этого использовалась дезтерифицированная форма красителя DCFH, и выход также подавлялся 0.1 mM DPI (Smirnova et al., 2009). Выход пероксида водорода в среду инкубации из

пыльцевых зёрен киви был позднее обнаружен спектрофлуориметрически (Speranza et al., 2011). Мы можем заключить, что активация НАДФН-оксидазы, приводящая к массивной продукции АФК на ранней стадии прорастания пыльцы типична как для цветковых растений, так и для хвойных растений, по крайней мере для модельных видов.

VI.2. Картирование внутриклеточных АФК в пыльце ели

Субклеточную локализацию АФК мы изучали методом конфокальной микроскопии (ББС МГУ, респ. Карелия) с помощью двух красителей: высокоспецифичный пентафлуоробензен сульфонилфлуоресцеин (PFBSF) использовали для визуализации H_2O_2 (Maeda et al., 2004), а MitoSOX для супероксид-радикала, локализованного в митохондриях (Robinson et al., 2008). Митохондрии, продуцирующие $O_2^{\cdot-}$ (красный краситель), были локализованы вдоль всей трубки, за исключением апикального домена и зоны, занятой амилопластами (*Рисунок 21*). Мы обнаружили, что в пыльцевых трубках H_2O_2 (зелёный краситель) частично колокализуется с $O_2^{\cdot-}$, что указывает на митохондрии как один из важных источников цитоплазматических АФК (*Рисунок 21 e,f*). Но мы можем видеть H_2O_2 и снаружи митохондрий, в том числе, в высокой концентрации в апексе трубки. Амилопласты также содержат значимые количества H_2O_2 .

Мы также окрашивали зёрна PFBSF, чтобы выяснить, происходит ли накопление H_2O_2 в апикальной зоне на этапе запуска полярного роста, или оно проявляется на более поздней стадии. Оказалось, что в инициалах пыльцевых трубок («носиках») и очень коротких трубках накопление красителя в апикальной зоне прекрасно видно, что указывает на ранне становление градиента H_2O_2 (*Рисунок 22. 3a-c*). В случаях биполярного прорастания (которое типично для ели и происходит примерно в 25% пыльцевых зёрен), накопление можно видеть в обеих инициалах (*Рисунок 22. d*).

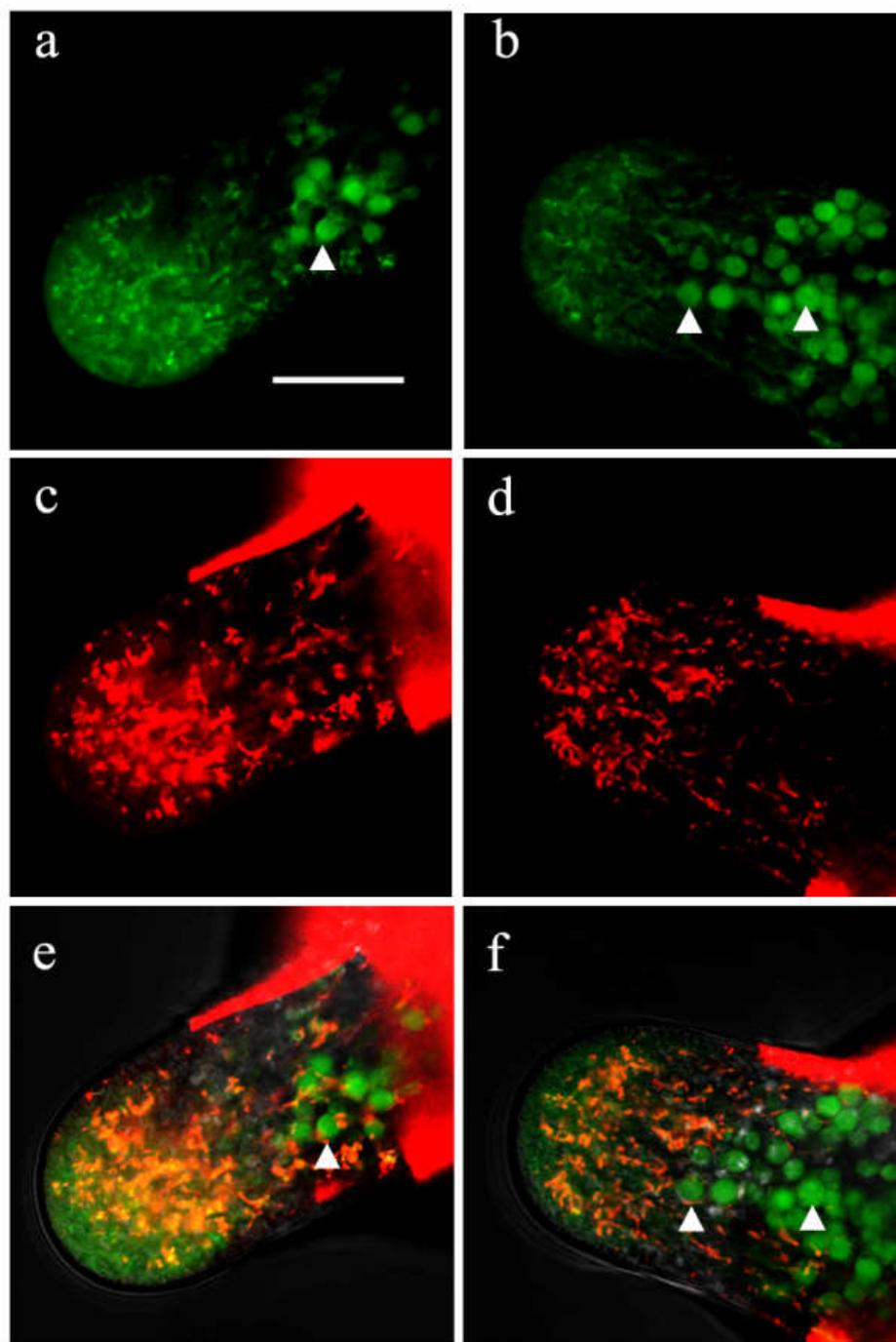


Рисунок 21. Локализация H_2O_2 и митохондриального O_2^- в пыльцевых трубках ели. Две случайно выбранные пыльцевые трубки после 18 часов инкубации, окрашенные PFBSF (a, b) и MitoSOX (c, d). *e, f* представляют собой наложение двух каналов и показывают частичную колокализацию двух АФК. Трубка в первом столбце имеет более высокий уровень эндогенных АФК, чем трубка во втором (индивидуальные различия между клетками), однако, локализация вполне совпадает. Митохондрии, производящие O_2^- , накапливаются в субапикальной части, H_2O_2 частично колокализуется с митохондриями, но

значительный уровень также виден в апикальном домене и в амилопластах (крупные органеллы, маркированные стрелочками). Масштабная линейка – 20 μm .

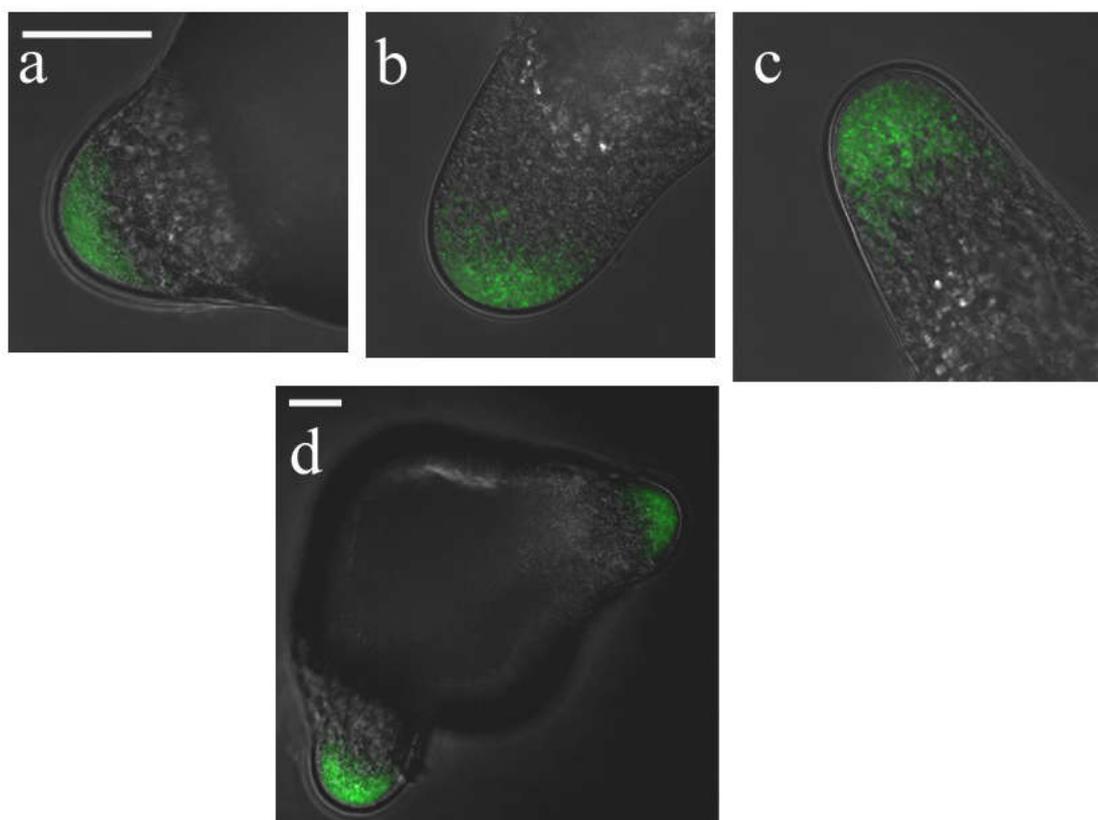


Рисунок 22. Локализация H_2O_2 в инициалах и коротких пыльцевых трубках ели. Инициали пыльцевых трубок в процессе униполярного (а) и биполярного (d) прорастания (13 часов инкубации), окрашенные PFBSF. Видно накопление H_2O_2 в цитоплазме в апикальной зоне. Аналогичное распределение пероксида видно в двух случайно выбранных пыльцевых трубках (15 часов инкубации) (b, c). Масштабная линейка – 20 μm .

Локализация H_2O_2 в апексе пыльцевых трубок, а $\text{O}_2^{\cdot -}$ митохондриального происхождения в субапикальной части хорошо согласуется с ранее показанным суммарным накоплением АФК в трубках ели Мейера (Liu et al., 2009), однако, проясняет и уточняет эти данные, показывая, что разные активные формы распределены по-разному. 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). Полученные этими авторами данные, как и точки зрения,

противоречили друг другу. В настоящей работе мы показали, что, по крайней мере, для ели обе точки зрения верны, однако речь идет о разных АФК: колокализация H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot -}$ в митохондриях указывают на то, что эти органеллы являются источником АФК в процессе роста трубки, как и НАДФН-оксидаза плазмалеммы. Ранее митохондриальное происхождение АФК постулировалось для пыльцевых трубок *Lilium formosanum* (Cardenas et al., 2006) и пыльцевых зёрен табака (Смирнова и др., 2009).

VI.3. Значение АФК для прорастания пыльцевых зёрен ели

Чтобы проверить, являются ли эндогенные АФК необходимыми для прорастания пыльцевого зерна ели, мы использовали различные вещества, сдвигающие баланс образования/ликвидации АФК: супероксиддисмутазу (СОД), убирающую $\text{O}_2^{\cdot -}$, Mn-ТМРР, разлагающий как $\text{O}_2^{\cdot -}$, так и H_2O_2 , ROBN/EtOH, избирательный тушитель $\cdot\text{OH}$ (Smirnova et al., 2013). Аскорбиновая кислота в наших опытах служила внеклеточным антиоксидантом, поскольку при pH 5.8 (среда прорастания) молекула представляет собой анион аскорбата ($\text{pK}_a^1 = 4.2$, $\text{pK}_a^2 = 11.6$) и не проникает через клеточную мембрану (Noremans et al., 2000). Антиоксиданты присутствовали в среде на протяжении всего периода инкубации. Эффективность прорастания контроле после 13 часов составляла приблизительно 40%, в связи с чем мы и выбрали это время – таким образом можно было обнаружить как стимулирующие, так и ингибирующие эффекты добавленных веществ. Были обнаружены различные эффекты, представленные на *Рисунке 23*. СОД (100 units/ml) снижала процент прорастания, а аскорбиновая кислота (0.1 или 1 mM) и ROBN-EtOH не оказывали влияния на этот показатель (*Рис. 23а*). Прорастание ингибировалось Mn-ТМРР, причем наблюдалась четкая концентрационная зависимость, 1 mM полностью подавлял появление пыльцевых трубок (*Рис. 23б*). Мы можем заключить, что $\text{O}_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 являются наиболее значимыми АФК для прорастания пыльцы *Picea pungens*: СОД дисмутирует внеклеточный $\text{O}_2^{\cdot -}$, но не снижает концентрации H_2O_2 , при этом прорастание поддерживается на невысоком уровне. В отсутствие обеих АФК (высокие

концентрации Mn-TMPP), прорастание полностью подавляется. $\cdot\text{OH}$, по-видимому, не является необходимым для прорастания.

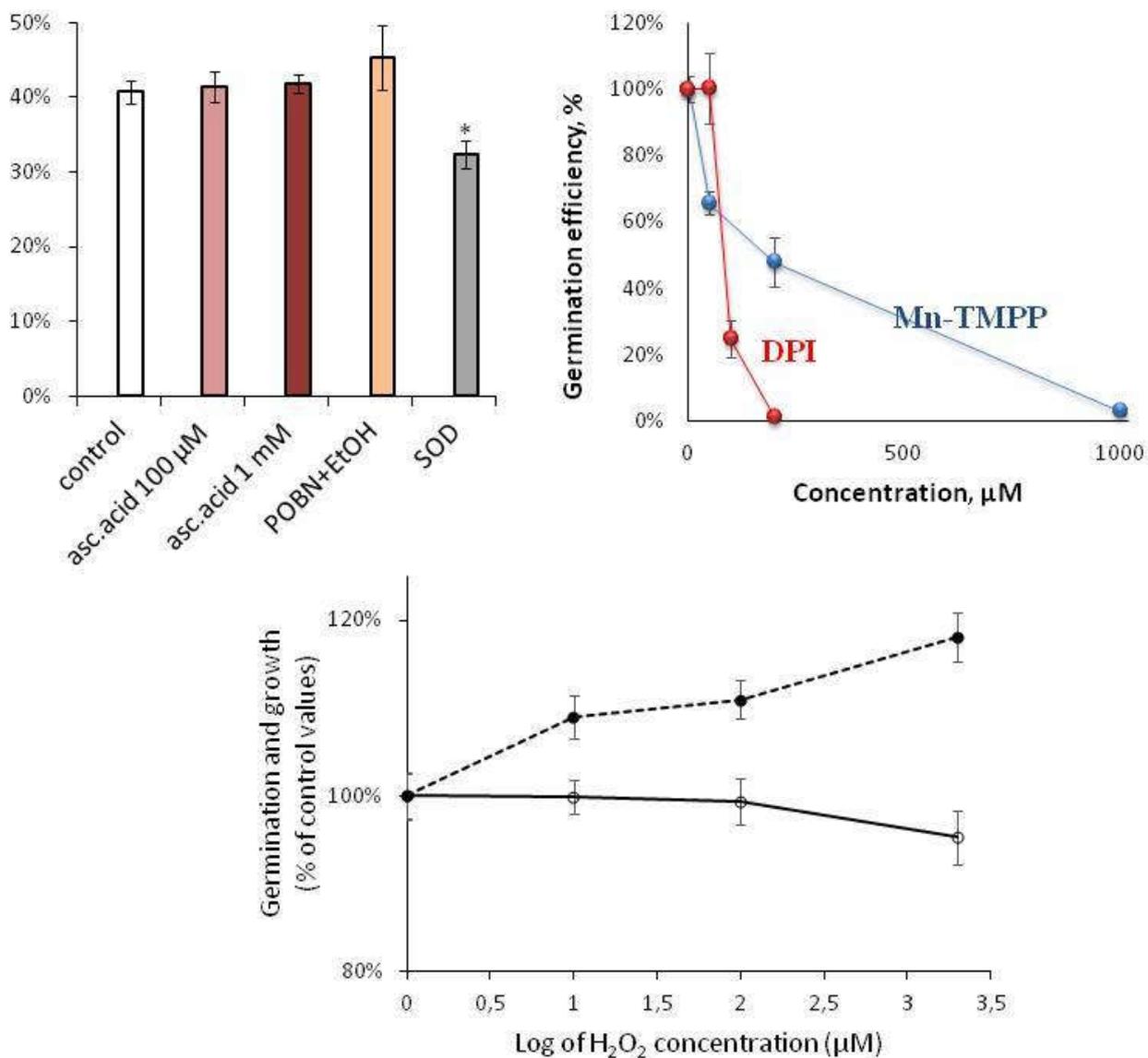


Рисунок 23. Эффекты антиоксидантов, DPI и H_2O_2 на прорастание пыльцевых зёрен ели. а – эффективность прорастания в контроле, в присутствии аскорбиновой кислоты, POBN + этанола и СОД после 13 часов инкубации. Аскорбиновая кислота и POBN не оказывают эффекта, СОД достоверно ($P < 0.01$), но не сильно снижает эффективность прорастания. б – эффективность прорастания в суспензиях, обработанных различными концентрациями DPI и MnTMPP (нормализовано к контролю). Оба вещества блокируют прорастание, в обоих случаях наблюдается концентрационная зависимость. в – экзогенный H_2O_2 не оказывает эффекта на прорастание (сплошная линия), но стимулирует рост пыльцевых трубок (пунктирная линия, $P < 0.01$). Абсолютные значения нормализованы к контролю.

Важность $O_2^{\cdot-}$, продуцируемого НАДФН-оксидазой, и H_2O_2 , образующейся из него в результате дисмутации, для прорастания пыльцы ели, была продемонстрирована в опытах с DPI. Все концентрации ингибитора, кроме самой низкой (0.05 mM) сильно подавляли прорастание (*Рис. 23б*). Этот факт хорошо согласуется с выявленными эффектами антиоксидантов, особенно Mn-TMPP, на прорастание (*Рис. 23а*) и с действием DPI на продукцию экстраклеточных АФК (*Рис. 20*).

Поскольку некоторые из тестируемых веществ, снижающих продукцию АФК (DPI), или тушителей экстраклеточных АФК (Mn-TMPP, СОД) снижали процент прорастания, но ни одно из них не оказывало положительного воздействия, мы предположили, что прорастание может стимулироваться экзогенными АФК. Самой устойчивой формой, которая может сохраняться в растворе в течение длительного времени и способна к перемещению, является пероксид водорода. Мы протестировали несколько концентраций H_2O_2 , но ни одна из них, включая низкую (0.1 mM) и высокую (2 mM) не оказывала какого-либо действия на эффективность прорастания (*Рис. 23в*). Однако все исследованные концентрации H_2O_2 стимулировали рост пыльцевых трубок. В пробах с высокой концентрацией H_2O_2 трубки были на 20% длинее, чем в контроле (*Рис. 23в*).

Обсуждая полученные данные о значении эндогенных АФК, нельзя не упомянуть ключевые работы, выполненные по аналогичной схеме на пыльце покрытосеменных растений, в том числе, в нашей лаборатории (Smirnova et al., 2013; Смирнова и др., 2009; Speranza et al., 2011), тем более, что для хвойных этот вопрос ранее не изучался. В отличие от ели, на табаке эффекты практически всех веществ, сдвигающих баланс образования/ликвидации АФК, на прорастание были разнонаправленными в зависимости от концентрации. Так, у табака низкие концентрации антиоксидантов, включая аскорбиновую кислоту, Mn-TMPP и СОД, стимулировали прорастание пыльцы. У ели стимуляция не обнаруживалась. Одно из самых простых объяснений заключается в том, что уровень эндогенных АФК в пыльце покрытосеменных значительно выше, чем у голосеменных.

Экспериментальная проверка этой гипотезы затруднена из-за кратно различающихся размеров пыльцевых зёрен модельных цветковых и хвойных растений, однако предварительные данные (пока неопубликованные) данную гипотезу подтверждают. Можно предположить, что женские ткани у покрытосеменных активно участвуют в поддержании АФК-баланса пыльцы, продуцируя АФК и/или антиоксиданты на разных этапах прогамной фазы оплодотворения. Поэтому когда пыльца таких растения культивируется *in vitro*, уровень эндогенных АФК может быть избыточным по отношению к оптимальному. У хвойных, напротив, скорее всего, баланс эндогенных АФК до стадии полярного роста поддерживается самим гаметофитом, и поэтому их уровень в суспензии *in vitro* является необходимым для оптимального прорастания.

Негативный эффект антиоксидантов у ели и табака также отличались: внеклеточная аскорбиновая кислота и обе концентрации РОВН ингибировали прорастание пыльцы табака (Smirnova et al., 2013; Смирнова и др., 2009), но не оказывали действия на пыльцу ели. Напротив, СОД, которая стимулировала прорастание у табака, блокировала его у ели. И, наконец, сильнейшие ингибирующие эффекты были обнаружены для MnTMPP и DPI (**Рис.23**), 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). Для второго из трёх видов, хоть немного изученных в этом отношении, киви, эффекты двух модуляторов – DPI и MnTMPP – были сходны с обнаруженными у ели (Speranza et al., 2011), а другие вещества в данном опыте не тестировались.

Отрицательный эффект СОД и тотальное подавление прорастание под действием MnTMPP и DPI (наиболее направленный и сильный эффект) демонстрируют ключевую роль $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и, конкретно, НАДФН-оксидазы в прорастании пыльцы ели. По-видимому, значение этого регуляторного модуля у ели даже больше, чем у табака. Апопластные АФК, на которые воздействует

аскорбиновая кислота, и $\cdot\text{OH}$, по-видимому, практически не участвуют в регуляции прорастания.

Отсутствие эффекта H_2O_2 в широком диапазоне концентраций также послужило важным отличием пыльцы ели от табака (Smirnova et al., 2013). Отсутствие как положительных, так и отрицательных влияний H_2O_2 поддерживает гипотезу об относительной независимости пыльцы хвойных от экзогенных АФК на стадии активации и запуска полярного роста, которая была нами выдвинута. Можно заключить, что взаимодействие пыльцы и женских тканей спорофита на ранней стадии прорастания впервые возникло у покрытосеменных растений (однако, это тема для отдельного исследования эволюционной направленности). Следующая стадия развития, растущая пыльцевая трубка, напротив, продемонстрировала чувствительность к H_2O_2 , что сближает ее с табаком и указывает на древнее происхождение данной регуляторной связи и ее универсальность среди семенных растений.

Заключение

Регуляторный модуль «АФК-ионный транспорт» успешно функционирует в клетках и тканях в ключевые моменты онтогенеза растений, обеспечивая тонкий и многоплановый контроль клеточной физиологии и морфогенеза. Важная роль этого модуля проявляется как при восприятии сигналов внешней среды (в частности, его компоненты сами могут быть сигналом), так и в процессах, для которых характерна относительная автономность и самоорганизация.

Мужской гаметофит демонстрирует в этом смысле двоякую природу. В системе *in vitro* мы можем наблюдать самоорганизацию, т.е. полярный рост, контролируемый внутренними системами. Мы хотели показать, что такая самоорганизация для представителя хвойных растений – ели голубой – включает в себя модуль «АФК-ионный транспорт», т.е. что эндогенные АФК важны для запуска полярного роста и поддержания ионного гомеостаза в гаплоидном организме. С применением целого ряда подходов нам это удалось: было показано, что АФК синтезируются пыльцой, что они необходимы для ее прорастания, что они поддерживают показатель нормального ионного статуса растущей клетки – градиент мембранного потенциала. Кроме того, мы выяснили, какие именно АФК находятся в кончике клетки, где они накапливаются и т.п.

С другой стороны, мужской гаметофит для выполнения своих основных функций (доставка гамет и оплодотворение) должен обладать способностью чутко реагировать на внешние сигналы, в первую очередь, те, которые продуцирует спорофит и женский гаметофит после его гидратации. На данный момент было установлено, что этот сигнал в значительной мере представляет собой АФК, т.е. является редокс-сигналом. Используя в качестве объектов растения из разных групп, мы показали, что на плазмалемме вегетативной клетки находятся чувствительные сенсоры редокс-статуса – ионные каналы, которые активируются в ответ на пероксид водорода, изменяя как внутриклеточный гомеостаз, так и свойства самой мембраны (в частности, ее электрический потенциал).

Таким образом, мы показали, насколько важен регуляторный модуль «АФК-ионный транспорт» в жизни мужского гаметофита, и как он работает.

ВЫВОДЫ

1. В комплексном исследовании, с применением методов пэтч-кламп и флуоресцентной микроскопии, было показано, что H_2O_2 в протопластах вегетативных клеток пыльцевого зерна у исследованных покрытосеменных растений активирует Ca^{2+} токи и вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$. Ингибирование входа Ca^{2+} блокирует регенерацию клеточной оболочки. Таким образом, одной из ключевых мишеней для H_2O_2 в пыльце покрытосеменных растений являются кальций-проводящие каналы.
2. С применением метода пэтч-кламп показано, что H_2O_2 активирует выходящий K^+ ток из протопластов пыльцевых зёрен. Таким образом, калиевые каналы также являются мишенями для H_2O_2 на плазмалемме вегетативной клетки.
3. С применением количественной флуоресцентной микроскопии обнаружен латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели, в регуляции которого участвуют, по данным ингибиторного анализа, все протестированные ион-транспортные системы. H_2O_2 воздействует на мембранный потенциал в субпротопластах из пыльцевых трубок табака, а также в интактных пыльцевых трубках ели. Таким образом, мембранный потенциал, являясь комплексным показателем ионного гомеостаза, проявляет чувствительность к экзогенному H_2O_2 в мужском гаметофите как табака, так и ели.
4. Обнаружены мишени для двух тяжелых металлов на мембране протопластов: Cu^{2+} , способствуя образованию АФК в протопластах, активирует H^+ -АТФазу плазмалеммы, а Ni^{2+} , не влияя на редокс-статус пыльцевых зёрен, блокирует ток K^+ .
5. Пыльцевые зёрна ели генерируют экстраклеточные АФК на раннем этапе прорастания, при активном участии НАДФН-оксидазы.

6. С применением конфокальной микроскопии показано распределение $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в растущей пыльцевой трубке ели: обнаружено два ключевые места скопления АФК: митохондрии, где присутствуют обе формы, амилопласты и апикальное скопление H_2O_2 , которое присутствует как в трубках, так и в инициалах трубок на начальном этапе прорастания.
7. С использованием ряда антиоксидантов (тушителей) и ингибиторного анализа продемонстрирована необходимость эндогенных АФК, а именно, $O_2^{\cdot-}$, продуцируемого НАДФН-оксидазой, и H_2O_2 для эффективного прорастания пыльцевых зёрен ели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов, Г.К., Батыгина, Т.Б., Бугара, А.М., и др. 1994. Эмбриология цветковых растений (терминология и концепции). Мир и семья, Санкт-Петербург.
2. Билан, Д. С., Шохина, А. Г., Лукьянов, С. А., Белоусов, В. В. Основные редокс-пары клетки. // Биоорганическая Химия. Т. 41. С. 385–402.
3. Брейгина, М.А., Матвеева, Н.П., Андреюк, Д.С., Ермаков, И.П. Трансмембранный перенос K^+ и Cl^- в процессе активации пыльцевого зерна *in vitro* и *in vivo*. // Онтогенез. 2012. Т. 43. С. 103–112.
4. Брейгина, М.А., Смирнова, А.В., Масленников, М.В., Матвеева, Н.П., Ермаков, И.П. Влияние ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака. // Цитология. 2009 52, 334–341.
5. 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. 2010. Т. 51. С. 815–823.
6. Бутенко, Р.Г., 1999. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. ФБК-ПРЕСС, Москва.
7. Матвеева, Н.П., Полевова, С.В., Смирнова, А.В., Ермаков, И.П. Накопление спорополленина в оболочке микроспоры *Nicotiana tabacum* L. в процессе её развития. // Цитология. 2012. Т 54. С. 176–184.
8. Матвеева, Н.П., Андреюк, Д.С., Ермаков, И.П. Трансмембранный перенос Cl^- при прорастании пыльцевого зерна табака. // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1550–1555.
9. Медведев, С.С., 2012. Электрофизиология растений. Изд-во С.-Петербургского Университета.
10. Медведев, С.С. Кальциевая сигнальная система растений. // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 1–24.
11. Опритов, В.А., Пятыгин, С.С., Ретивин, В.Г., 1991. Биоэлектрогенез у высших растений. Наука, Москва.

12. Полесская, О.Г., 2007. Растительная клетка и активные формы кислорода. КДУ, Москва.
13. Скулачѳв, В.П., Богачѳв, А.В., Каспаринский, Ф.О., 2010. Мембранная биоэнергетика. Издательство Московского университета, Москва.
14. Смирнова, А.В., Матвеева, Н.П., Полесская, О.Г., Ермаков, И.П. Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна. // Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 425–435.
15. Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press.
16. Agudelo, C.G., Muthukumaran, P., Geitmann, A., 2014. Lab-on-a-Chip for Studying Growing Pollen Tubes, in: Źárský, V., Cvrckova, F. (Eds.), Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols. Springer Science+Business Media New York, pp. 237–248.
17. Allbritton, N.L., Meyer, T., Stryer, L. Range of Messenger Action of Calcium Ion and Inositol 1,4,5-Triphosphate. // Science. 1992. Vol. 258. P.1812–1816.
18. Amien, S., Kliwer, I., Márton, M.L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D., Dresselhaus, T. Defensin-like ZmES4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1. // PLoS Biol. 2010. Vol. 8. P. 1–13.
19. Angelo, C.D., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schu, S., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., Kudla, J. Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. // Plant J. 2006. V. 48. P. 857–872.
20. Anjum, N.A., Singh, H.P., Khan, M.I.R., Masood, A., Per, T.S., Negi, A., Batish, D.R., Khan, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I. Too much is bad — an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. Vol. 22. P. 3361–3382.
21. Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373–99.
22. Barberini, M.L., Sigaut, L., Huang, W., Mangano, S., Juarez, S.P.D., Marzol, E., Estevez, J., Obertello, M., Pietrasanta, L., Tang, W., Muschietti, J. Calcium dynamics in tomato pollen tubes using the Yellow Cameleon 3.6 sensor. // Plant Reprod. 2018. Vol.

31. P. 159–169.
23. Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Frachisse, J.-M., Ephritikhine, G., Maurel, C. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. // *Biochim. Biophys. Acta* 2000. P. 1465-1473.
24. Bashe, D., Mascarenhas, J.P. Changes in potassium ion concentrations during pollen dehydration and germination in relation to protein synthesis. // *Plant Sci. Lett.*, 1984. Vol. 35. P. 55–60.
25. Batistic, O., Kudla, J., Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. // *Planta*. 2004. Vol. 219. P. 915–924.
26. Batistic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., Kudla, J. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. // *Plant J.* 2010. Vol. 61. P. 211–222.
27. Becker, D., Boavida, L.C., Carneiro, J., Haury, M., Feijo, A. Transcriptional Profiling of *Arabidopsis* Tissues. // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133. P. 713–725.
28. Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., Hedrich, R. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. // *PNAS*. 2004. Vol. 101. P. 15621–15626.
29. Bell, E., Takeda, S., Dolan, L., 2009. Reactive oxygen species in growth and development, in: Rio, L.A., Puppo, A. (Eds.), *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 43–53.
30. Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. Vol. 1. P. 11–21.
31. Bienert, G.P., Moller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, 1183–1192.
32. Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. Membrane transport of hydrogen

- peroxide. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1758. P. 994–1003.
33. Boisson-Dernier, A., Lituiev, D.S., Nestorova, A., Franck, C.M., Thirugnanarajah, S., Grossniklaus, U. ANXUR Receptor-Like Kinases Coordinate Cell Wall Integrity with Growth at the Pollen Tube Tip Via NADPH Oxidases. // PLoS Biol. 2013. Vol. 11.
 34. Bosch, M., Hepler, P.K. Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. // Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 3219–3226.
 35. Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., Mariani, T. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development // J. Exp. Bot. 2008. Vol. 56. P. 113–121.
 36. Bowler, C., Fluhr, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling. // Trends Plant Sci. 2000. Vol. 5. P. 241–246.
 37. Brewbaker, J.L., Kwack, B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. // Am. J. Bot. 1963. Vol. 50. P. 859–865.
 38. Breygina, M., Matveyeva, N., Polevova, S., Meychik, N., Nikolaeva, Y., Mamaeva, A., Yermakov, I. Ni²⁺ effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. // Biometals 2012. Vol. 25, P. 1221–1233.
 39. Bright, J., Hiscock, S.J., James, P.E., Hancock, J.T. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. // Plant Signal. Behav. 2009. Vol. 4. P. 416–8.
 40. Burzyhskl, M., Kolano, E. *In vivo* and *in vitro* effects of copper and cadmium on the plasma membrane H⁺-ATPase from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots. // Acta Physiol. Plant. 2003. Vol. 25. P. 39–45.
 41. Camacho, L., Malho, R. Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca²⁺ and GTPases. // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54. P. 83–92.
 42. Campanoni, P., Blatt, M.R. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. // J. Exp. Bot. 2007. Vol. 58. P. 65–74.
 43. Card, S.D., Pearson, M.N., Clover, G.R.G. Plant pathogens transmitted by pollen. // Australas. Plant Pathol. 2007. Vol. 36. P. 455–461.
 44. Cardenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. Pollen Tube Growth

Oscillations and Intracellular Calcium Levels Are Reversibly Modulated by Actin Polymerization. // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 146. P. 1611–1621.

45. Cárdenas, L., McKenna, S.T., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 142. P. 1460–1468.

46. Carol, R.J., Dolan, L. Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2002. Vol. 357. P. 815–21.

47. Carter, C., Thornburg, R.W. Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? // *Trends Plant Sci.* 2004. Vol. 9. P. 5–9.

48. Certal, A.C., Almeida, R.B., Carvalho, L.M., Wong, E., Moreno, N., Michard, E., Carneiro, J., Rodríguez-Léon, J., Wu, H.-M., Cheung, A.Y., Feijó, J.A. Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. // *Plant Cell.* 2008. Vol. 20. P. 614–634.

49. Chae, K., Lord, E.M. Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. // *Ann. Bot.* 2011. Vol. 108. P. 627–636.

50. Cheung, A.Y., Wu, H.-M. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. Vol. 59. P. 547–572.

51. Chuprov-Netochin, R., Neskorođov, Y., Marusich, E., Mishutkina, Y., Volynchuk, P., Leonov, S., Skryabin, K., Ivashenko, A., Palme, K., Touraev, A. Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen. // *BMC Plant Biol.* 2016. Vol. 16. P. 1–11.

52. Clapham, D.E. Calcium signaling. // *Cell.* 2007. Vol. 131. P. 1047–58.

53. Clapham, D.E. Calcium Signaling // Review. *Cell.* 1995. Vol. 80. P. 259–268.

54. Cocucci, S.M., Morgutti, S. Stimulation of proton extrusion by K^+ and divalent cations (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) in maize root segments. // *Physiol. Plant.* 1986. Vol. 68. P. 497–501.

55. Coelho, S.M., Taylor, A.R., Ryan, K.P., Sousa-pinto, I., Brown, M.T., Brownlee, C. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca^{2+} wave propagation in *Fucus Rhizoid* Cells. // *Plant Cell.* 2002. Vol. 14. P. 2369–2381.

56. Coelho, S.M.B., Brownlee, C., Bothwell, J.H.F. A tip-high, Ca^{2+} -interdependent,

- reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. // *Planta*. 2008. Vol. 227. P. 1037–46.
57. Coelho, S.M.B., Brownlee, C., Bothwell, J.H.F. Feedback control of reactive oxygen and Ca^{2+} signaling during brown algal embryogenesis. // *Plant Signal. Behav.* 2008b. Vol. 3. P. 570–572.
58. Corem, S., Carpaneto, A., Soliani, P., Cornara, L., Gambale, F., Scholz-Starke, J. Response to cytosolic nickel of slow vacuolar channels in the hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. // *Eur. Biophys. J.* 2009. Vol. 38. P. 495–501.
59. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. // *Trends Biochem. Sci.* 2009. Vol. 34. P. 85–96.
60. Day, I.S., Reddy, V.S., Ali, G.S., Reddy, A.S.N. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3. P. 1–24.
61. Delay, M.J., Finkel, A.S., Lester, H.A., Powell, W.G., Sherman-Gold, R., 2012. *The Axon Guide: A guide to Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques*, 3rd ed.
62. Demidchik, V., 2010. Ion channels and plant stress responses, in: Demidchik, V., Maathuis, F. (Eds.), *Signaling and Communication in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 207–232.
63. Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A., Yurin, V. *Arabidopsis* root K^+ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. // *J. Cell Sci.* 2010. Vol. 123. P. 1468–1479.
64. Demidchik, V., Shabala, S.N., Davies, J.M. Spatial variation in H_2O_2 response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca^{2+} flux and plasma membrane Ca^{2+} channels. // *Plant J.* 2007. Vol. 49. P. 377–86.
65. Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., Yurin, V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+ -permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65. P. 1259–1270.

66. Desikan, R., Cheung, M.-K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J., ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. // *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 205–12.
67. Desprez, B., Chupeau, Y., Bourgin, J.-P. Preparation and fusion properties of protoplasts from mature pollen of *Nicotiana tabacum*. // *Plant Cell Rep.* 1995. Vol. 14. P. 199–203.
68. Di Giorgio, J.A.P., Bienert, G.P., Ayub, D., Yaneff, A., Barberini, M.L., Mecchia, A., Amodeo, G., Soto, C. Pollen-specific aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 are required for pollen development and pollination in *Arabidopsis thaliana*. // *Plant Cell.* 2016. Vol. 28. P. 1053–1077.
69. Diao, M., Qu, X., Huang, S. Calcium imaging in *Arabidopsis* pollen cells using G-CaMP5. // *J. Integr. Plant Biol.* 2018. Vol. 60. P. 897-906.
70. Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., Edwards, R. Stress-Induced Protein S-Glutathionylation in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 138. P. 2233–2244.
71. Dodd, A.N., Kudla, J., Sanders, D. The Language of Calcium Signaling. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. Vol. 61. P. 593–620.
72. Domingos, P., Prado, A.M., Wong, A., Gehring, C., Feijo, J.A. Nitric Oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants. // *Mol. Plant.* 2014. Vol. 8. P. 1–15.
73. Drerup, M.M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., Kudla, J. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the arabidopsis NADPH oxidase RBOHF. // *Mol. Plant.* 2013. Vol. 6. P. 559–569.
74. Duan, Q., Kita, D., Johnson, E.A., Aggarwal, M., Gates, L., Wu, H.-M., Cheung, A.Y. Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. P. 3129.
75. Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A.Y., Wu, H.-M. FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. P. 17821–6.
76. Dumas, C., Gaude, T. Fertilization in plants: Is calcium a key player? // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. Vol. 17. P. 244–253.

77. Dutta, R., Robinson, K.R. Identification and Characterization of Stretch-Activated Ion Channels in Pollen Protoplasts // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 135. P. 1398–1406.
78. Edel, K.H., Kudla, J. Integration of calcium and ABA signaling. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. Vol. 33. P. 83–91.
79. Edel, K.H., Kudla, J. Cell Calcium Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. // *Cell Calcium* 2015. Vol. 57. P. 231–246.
80. Fan, L.-M., Wang, Y.-F., Wu, W.-H. Outward K⁺ channels in *Brassica chinensis* pollen protoplasts are regulated by external and internal pH. // *Protoplasma.* 2003. Vol. 220. P. 143–152.
81. Fan, L., Wang, Y., Wang, H., Wu, W. *In vitro Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. // *J Exp Bot.* 2001. Vol. 52. P. 1603–1614.
82. Fan, L., Wu, W., Yang, H. Identification and Characterization of the Inward K⁺ Channel in the Plasma Membrane of *Brassica* Pollen Protoplasts. // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40. P. 859–865.
83. Feijó, J. a., Costa, S.S., Prado, A.M., Becker, J.D., Certal, A.C. Signalling by tips. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. Vol. 7. P. 589–598.
84. Feijó, J.A., Malhó, R., Obermeyer, G. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. // *Protoplasma.* 1995. Vol. 187. P. 155–167.
85. Feijo, J.A., Malho, R., Pais, M.S.S. A cytochemical study on the role of ATPases during pollen germination in *Agapanthus umbelatus* L'Her. // *Sexual Plant Reprod.* 1992. Vol. 5. P. 138–145.
86. Feijo, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. // *J. Cell Biol.* 1999. Vol. 144. P. 483–496.
87. Feijo, J.A., Sainhas, J., Holdaway-Clarke, T., Cordeiro, M.S., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube

paradigm. // *BioEssays*. 2001. Vol. 23. P. 86–94.

88. Fernandes, A.R., Sa-Correia, I. The activity of plasma membrane H⁺-ATPase is strongly stimulated during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth under high copper stress, accompanying intracellular acidification. // *Yeast*. 2001. Vol. 18. P. 511–521.

89. Fernando, D.D., Lazzaro, .M.D., Owens, J.N. Growth and development of conifer pollen tubes. // *Sexual Plant Reproduction*. 2005. Vol. 18. P. 149–162.

90. Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. // *Nature*. 2003 Vol. 422. P. 442–6.

91. Franklin-Tong, V. Signaling and the modulation of pollen tube growth. // *Plant Cell*. 1999. Vol. 11. P. 727–38.

92. Franklin-Tong, V.E., Holdaway-Clarke, T.L., Straatman, K.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. // *Plant J*. 2002. Vol. 29. P. 333–345.

93. Friedman, W.E. The evolutionary history of the seed plant male gametophyte. // *Tree*. 1993. Vol. 8. P. 15–21.

94. Frietsch, S., Wang, Y.-F., Sladek, C., Poulsen, L.R., Romanowsky, S.M., Schroeder, J.I., Harper, J.F. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. P. 14531–6.

95. Gao, Q.-F., Fei, C.-F., Dong, J.-Y., Gu, L.-L., Wang, Y.-F. *Arabidopsis* CNGC18 Is a Ca²⁺-Permeable Channel. // *Mol. Plant*. 2014. Vol. 7. P. 739–743.

96. Gao, Q.-F., Gu, L.-L., Wang, H.-Q., Fei, C.-F., Fang, X., Hussain, J., Sun, S. Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca²⁺ channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. // *PNAS*. 2016. Vol. 113. P. 1–6.

97. Ge, L.L., Tian, H.Q., Russell, S.D. Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. // *Am. J. Bot.* 2007. Vol. 94. P. 1046–1060.

98. Gehwolf, R., Griessner, M., Pertl, H., Obermeyer, G. First patch, then catch: measuring the activity and the mRNA transcripts of a proton pump in individual *Lilium*

pollen protoplasts. // FEBS Lett. 2002. Vol. 512. P. 152–156.

99. Gelli, A., Blumwald, E. Hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channels in plasma membrane of tomato cells. // Membr. Biol. 1997. Vol. 155. P. 35–45.

100. Gilroy, S., Fricker, M.D., Read, N.D., Trewavas, A.J. Role of Calcium in Signal Transduction of Commelina Guard Cells. // Plant Cell. 1991. Vol. 3. P. 333–344.

101. Grabov, A., Blatt, M.R. Membrane voltage initiates Ca^{2+} waves and potentiates Ca^{2+} increases with abscisic acid in stomatal guard cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998. Vol. 95. P. 4778–83.

102. Griessner, M., Obermeyer, G. Characterization of whole-cell K^+ currents across the plasma membrane of pollen grain and tube protoplasts of *Lilium longiflorum*. // J. Membr. Biol. 2003. Vol. 193. P. 99–108.

103. Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S., Yang, Z. A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. // J. Cell Biol. 2005. Vol. 169. P. 127–138.

104. Gutermuth, T., Herbell, S., Lassig, R., Brosché, M., Romeis, T., Feijó, J.A., Hedrich, R., Konrad, K.R. Tip-localized Ca^{2+} -permeable channels control pollen tube growth via kinase-dependent R- and S-type anion channel regulation. // New Phytol. 2018. Vol. 218. P. 1089–1105.

105. Gutermuth, T., Lassig, R., Portes, M.-T., Maierhofer, T., Romeis, T., Borst, J.-W., Hedrich, R., Feijó, J.A., Konrad, K.R. 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. 2013. Vol. 25. P. 4525–43.

106. Hashimoto, K., Kudla, J. Calcium decoding mechanisms in plants. // Biochimie. 2011. Vol. 93. P. 2054–2059.

107. Hepler, P.K., Kunkel, J.G., Rounds, C.M., Winship, L.J. Calcium entry into pollen tubes. // Trends Plant Sci. 2012. Vol. 17. P. 32–38.

108. Hepler, P.K., Lovy-Wheeler, A., McKenna, S.T., Kunkel, J.G., 2006. Ions and Pollen Tube Growth. In: Malhó R. (eds) The Pollen Tube. Plant Cell Monographs, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg.

109. Hepler, P.K., Vidali, L., Cheung, A.Y. Polarized cell growth in higher plants. //

- Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001. Vol. 17. P. 159–187.
110. Heslop-Harrison, J. Pollen germination and pollen-tube growth. // Int. Rev. Cytol. 1987. Vol. 107. P. 1–78.
111. Hiscock, S.J., Allen, A.M. Diverse cell signalling pathways regulate pollen – stigma interactions: the search for consensus. // New Phytol. 2008. Vol. 179. P. 286–317.
112. Hiscock, S.J., Bright, J., McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T. Signaling on the Stigma Potential New Roles for ROS and NO in Plant Cell Signaling. // Plant Signal. Behav. 2007. Vol. 172. P. 221–228.
113. Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Aelst, A.C. van, Hemminga, M.A., 1999. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. // Plant. Cell Environ. 1999. Vol. 22. P. 1121–1131.
114. Holdaway-Clarke, T. L., Hepler, P. K., Control of pollen tube growth: Role of ion gradients and fluxes. // New Phytologist. 2003. Vol. 159. P. 539–563.
115. Horade, M., Yanagisawa, N., Mizuta, Y., Higashiyama, T., Arata, H. Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device. // Microelectron. Eng. 2014. Vol. 118. P. 25–28.
116. Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. // Trends Plant Sci. 2000. Vol. 5. P. 263–267.
117. Huang, S., Blanchoin, L., Chaudhry, F., Franklin-Tong, V.E., Staiger, C.J. A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 23364–23375.
118. Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., Takayama, S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. // Plant Physiol. 2009. Vol. 150. P. 1322–34.
119. Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.-S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A. Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. // Plant Physiol. 2004. Vol. 136. P. 3562–3571.

120. Jaffe, L.A., Weisenseel, M.H., Jaffe, L.F. Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 67. P. 488–492.
121. Janicka-Russak, M., 2011. Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses, in: Shanker, A. (Ed.), *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. p. 346.
122. Janicka-Russak, M., Kabała, K., Burzyński, M. Different effect of cadmium and copper on H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. // *J. Exp. Bot.* 2012. Vol. 63. P. 695–709.
123. Jordan, N.D., Ride, J.P., Rudd, J.J., Davies, E.M., Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C.H. Inhibition of self-incompatible pollen in *Papaver rhoeas* involves a complex series of cellular events. // *Ann. Bot.* 2000. Vol. 85. P. 197–202.
124. Kalbande, D.M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P.R., Wate, S.R. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. // *Environ. Monit. Assess.* 2008. Vol. 138. P. 233–238.
125. Katz, B.Y.B., Miledi, R. Nature of the acetylcholine potential and its molecular components. // *J. Physiol.* 1972. Vol. 224. P. 665–699.
126. Kawamura, R., Shimura, H., Mochizuki, T., Ohki, S.T., Masuta, C. Pollen Transmission of Asparagus virus 2 (AV-2) May Facilitate Mixed Infection by Two AV-2 Isolates in *Asparagus* Plants. // *Phytopathology*. 2014. Vol. 104. P. 1001–1006.
127. Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M.M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Takayama, S., Abe, M., Kuchitsu, K. Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by Arabidopsis RbohH and RbohJ Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth. // *Plant Cell*. 2014. Vol. 26. P. 1069–80.
128. Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N.F., Wuest, S.E., Ingram, G., Panstruga, R., Grossniklaus, U. Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. // *Science*. 2010. Vol. 330. P. 968–71.
129. Kohler, B., Hills, A., Blatt, M.R. Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 131. P. 385–388.

130. Konrad, K.R., Wudick, M.M., Feijó, J.A. Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. Vol. 14. P. 721–30.
131. Kornreich, B.G. The patch clamp technique: principles and technical considerations. // *J. Vet. Cardiol.* 2007. Vol. 9. P. 25–37.
132. Kroh, M., Knuiman, B. Development of subprotoplasts from in vitro-grown tobacco pollen tubes. // *Sex. Plant Reprod.* 1988. Vol. 1. P. 103–113.
133. Kubista, M., Akerman, B., Nordén, B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. // *Biochemistry.* 1987. Vol. 26. P. 4545–4553.
134. Kudla, J., Becker, D., Grill, E., Hedrich, R., Hippler, M., Kummer, U., Parniske, M., Romeis, T., Schumacher, K. Advances and current challenges in calcium signaling. // *New Phytol.* 2018. Vol. 218. P. 414–431.
135. Kushwaha, R., Singh, A., Chattopadhyay, S. Calmodulin7 Plays an Important Role as Transcriptional Regulator in *Arabidopsis* Seedling Development. // *Plant Cell.* 2008. Vol. 20. P. 1747–1759.
136. Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., Schroeder, J.I. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. // *EMBO J.* , 2003. Vol. 22. P. 2623–33.
137. Lassig, R., Gutermuth, T., Bey, T.D., Konrad, K.R., Romeis, T. Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. // *Plant J.* 2014. Vol. 78. P. 94–106.
138. Lazzaro, M.D., Cardenads, L., Bhatt, A.P., Justus, C.D., Phillips, M.S., Holdaway-Clarke, T.L., Hepler, P.K. Calcium gradients in conifer pollen tubes; dynamic properties differ from those seen in angiosperms. // *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56. P. 2619–28.
139. Lee, K., Lee, J., Kim, Y., Bae, D., Kang, K.Y., Yoon, S.C., Lim, D. Defining the plant disulfide proteome. // *Electrophoresis.* 2004. Vol. 25. P. 532–541.
140. Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.S., Oh, K.Y., Choi, E.J., Schroeder Taylor, A. T., Low, P.S., Lee, Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by

- inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. // Plant Physiol. 1999. Vol. 121. P. 147–52.
141. Lipchinsky, A. Electromechanics of polarized cell growth. // BioSystems. 2018. Vol. 173. P. 114–132.
142. Lipchinsky, A. Osmophoresis - a possible mechanism for vesicle trafficking in tip-growing cells. // Phys. Biol. 2015. Vol. 12. P. 1–8
143. Liu, P., Li, R.L., Zhang, L., Wang, Q.L., Niehaus, K., Baluška, F., Šamaj, J., Lin, J.X. Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. // Plant J. 2009. Vol. 60. P. 303–313.
144. Luan, S. The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. // Trends Plant Sci. 2008. Vol. 14. P. 37–42.
145. Maeda, H., Fukuyasu, Y., Yoshida, S., Fukuda, M., Saeki, K., Matsuno, H., Yamauchi, Y., Yoshida, K., Hirata, K., Miyamoto, K. Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. // Angew. Chemie - Int. Ed. 2004. Vol. 43. P. 2389–2391.
146. Mähns, A., Steinhorst, L., Han, J.P., Shen, L.K., Wang, Y., Kudla, J. The calcineurin B-like Ca^{2+} sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis*. // Mol. Plant. 2013 Vol. 6. P. 1149–1162.
147. Malho, R., Read, N.D., Trewavas, A.J., Pais, M.S. Calcium Channel Activity during Pollen Tube Growth and Reorientation. // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1173–1184.
148. Marinho, H.S., Cyrne, L., Cadenas, E., 2013. The Cellular Steady-State of H_2O_2 : Latency Concepts and Gradients, 1st ed, Hydrogen Peroxide and cell signaling, Part B. Elsevier Inc.
149. Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., Takeshita, A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. // J. Clin. Invest. 2000. Vol. 106. P. 1521–30.
150. Matveeva, N.P., Andreyuk, D.S., Lasareva, E.A., Ermakov, I.P. The effect of concanavalin A on membrane potential and intracellular pH during activation *in vitro* of tobacco pollen grains. // Russ. J. Plant Physiol. 2004. Vol. 51. P. 494–499.

151. Matveeva, N.P., Andreyuk, D.S., Voitsekh, O.O., Ermakov, I.P., 2003. Regulatory changes in the intracellular pH and Cl⁻ efflux at early stages of pollen grain germination *in vitro*. // Russ. J. Plant Physiol. 2003. Vol. 50. P. 360–365.
152. Matveeva, N.P., Voitsekh, O.O., Andreiuk, D.S., Ermakov, I.P. The role of H⁺-ATPase and alternative oxidase in the regulation of intracellular pH at the different stages of development of the tobacco male gametophyte. // Russ. J. Dev. Biol., 2002. Vol. 33. P. 355–361.
153. McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T. a., Hetherington, A.M. Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. // Plant Physiol. 1996. Vol. 111. P. 1031–1042.
154. McCormack, E., Tsai, Y., Braam, J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. // Trends Plant Sci. 2005. Vol. 10. P. 383–389.
155. McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? // New Phytol. 2006. Vol. 172. P. 221–228.
156. Michard, E., Alves, F., Feijó, J. A. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. // Int. J. Dev. Biol. 2009. Vol. 53. P. 1609–22.
157. Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G., Feijó, J. A. Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. // Science. 2011. Vol. 332. P. 434–7.
158. Michard, E., Simon, A.A., Tavares, B., Wudick, M.M., Feijó, J.A. Signaling with ions: the keystone for apical cell growth and morphogenesis in pollen tubes. // Plant Physiol. 2017. Vol. 173. P. 91–111.
159. Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., Lutterodt, L., Haines, T.H. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. // FEBS Lett. 2001. Vol. 507. P. 187–190.
160. Miller, D.D., Callahan, D.A., Gross, D.J., Hepler, P.K. Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. // J. Cell Sci. 1992. Vol. 101. P. 7–12.

161. Miller, E.W., Dickinson, B.C., Chang, C.J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. Vol. 107. P. 15681–6.
162. Mink, G.I. Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. // Annu. Rev. Phytopathol. 1993. Vol. 31. P. 375–402.
163. Mohsenzadeh, F., Chehregani, A. Effect of the heavy metals on developmental stages of ovule, pollen, and root proteins in *Reseda lutea* L. (Resedaceae). // Biol. Trace Elem. Res. 2011. Vol. 143. P. 1777–1788.
164. Molleman, A., 2003. Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. John Wiley & Sons Ltd.
165. Morgutti, S., Ferrari-Bravo, P., Marre, M.T., Cocucci, S.M. Effects of Ni²⁺ on proton extrusion and related transport processes and on the transmembrane electrical potential in maize roots. // Plant Sci. Lett. 1981. Vol. 23. P. 123–128.
166. Mouline, K., Véry, A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J., Sentenac, H. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. // Genes Dev. 2002. Vol. 16. P. 339–350.
167. Moutinho, A., Hussey, P.J., Trewavas, A.J., Malhó, R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001. Vol. 98. P. 10481–6.
168. Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fiber. // Nature. Vol. 260. P. 799–802.
169. Nguemo, F., Fleischmann, B.K., Gupta, M.K., Sarić, T., Malan, D., Liang, H., Pfannkuche, K., Bloch, W., Schunkert, H., Hescheler, J., Reppel, M. The L-type Ca²⁺ channels blocker nifedipine represses mesodermal fate determination in murine embryonic stem cells. // PloS. 2013. Vol. 8. P. e53407.
170. Nitsch, J.P. Deux espaces photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. // et *P. zeylanica* L. Bull. Bot. Fr. 1965. Vol. 112. P. 517–522.
171. Nobel, P.S., 2009. Physicochemical and Environmental Plant Physiology, 4th ed, Physicochemical and Environmental Plant Physiology. Elsevier.

172. Nobiling, R., Reiss, H.-D. Quantitative Analysis of Calcium Gradients and Activity in Growing Pollen Tubes of *Lilium longiflorum*. // *Protoplasma*. 1987. Vol. 139. P. 20–24.
173. Obermeyer, G., Blatt, M.R. Electrical properties of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*: characteristics of the non-germinating pollen grain. // *J. Exp. Bot.* 1995. Vol. 46. P. 803–813.
174. Obermeyer, G., Blatt, M.R. K⁺ Channels in the Plasma Membrane of Lily Pollen Protoplasts. // *Bot. Acta*. 1993. Vol. 106. P. 26–31.
175. Obermeyer, G., Liitzelschwab, M., Heumann, H., Weisenseel, M.H. Immunolocalization of H⁺-ATPases in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium longiflorum*. // *Protoplasma*. 1992. Vol. 171. P. 55–63.
176. Ogawa, K. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. // *Antioxid. Redox Signal*. 2005. Vol. 7. P. 973-81.
177. Palanivelu, R., Preuss, D. Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes *in vitro*. // *BMC Plant Biol*. 2006. Vol. 6. P. 164-158.
178. Park, S.W., Noh, H.J., Sung, D.J., Kim, J.G., Kim, J.M., Ryu, S.-Y., Kang, K., Kim, B., Bae, Y.M., Cho, H. Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive K_v currents through S-glutathionylation. // *Pflugers Arch*. 2014. Vol. 467. P. 285-297.
179. Parton, R.M., Fischer-Parton, S., Watahiki, M.K., Trewavas, A.J. Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes. // *J. Cell Sci*. 2001. Vol. 114. P. 2685–2695.
180. Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. // *Nature*. 2000. Vol. 406. P. 731–734.
181. Penner, R., Marty, A., Neher, E., Heineman, S.H., Sigworth, F.J., Benndorf, K., Gillis, K.D., Stuart, G., Eilers, J., Schneggenburger, R., Konnerth, A., Jonas, P., Chow, R.H., von Ruden, L., Hedrich, R., Hilgemann, D.W., McBride, D.W., Hamill, O.P., Hamill, J.P., Struhmer, W., Parekh, A.B., Monyer, H., Jonas, P., Horber, J.K.H., Mosbacher, J., Haberle, W., Colquhoun, D., Hawkes, A.G., Lauger, P., 1995. Single-

Channel Recording, 2nd ed. Springer.

182. Pertl, H., Himly, M., Gehwolf, R., Kriechbaumer, R., Strasser, D., Michalke, W., Richter, K., Ferreira, F., Obermeyer, G. Molecular and physiological characterisation of a 14-3-3 protein from lily pollen grains regulating the activity of the plasma membrane H⁺ ATPase during pollen grain germination and tube growth. // *Planta*. 2001. Vol. 213. P. 132–41.

183. Pertl, H., Pöckl, M., Blaschke, C., Obermeyer, G. Osmoregulation in *Lilium pollen* grains occurs via modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity by 14-3-3 proteins. // *Plant Physiol*. 2010. Vol. 154. P. 1921–1928.

184. Petrov, V.D., Breusegem, F. Van Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells. // *AoB Plants*. 2012, pls014.

185. Petrushanko, I.Y., Yakushev, S., Mitkevich, V.A., Kamanina, Y. V., Ziganshin, R.H., Meng, X., Anashkina, A.A., Makhro, A., Lopina, O.D., Gassmann, M., Makarov, A.A., Bogdanova, A. S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287. P. 32195–32205.

186. Pham, A.N., Xing, G., Miller, C.J., Waite, T.D. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. // *J. Catal*. 2013. Vol. 301. P. 54–64.

187. Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D. a, Shipley, a M., Rivers, B. a, Cresti, M., Hepler, P.K. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6. P. 1815–28.

188. Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D. A., van Aken, J., Hackett, G., Hepler, P.K. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. // *Dev. Biol*. 1996. Vol. 174. P. 160–73.

189. Pina, C., Pinto, F. Gene Family Analysis of the *Arabidopsis* Pollen Transcriptome Reveals Biological Implications for Cell Growth, Division Control, and Gene Expression Regulation. // *Plant Physiol*. 2005. Vol. 138. P. 744–756.

190. Potocky, M., Jones, M.A., Bezdova, R., Smirnoff, N., Zarsky, V. Reactive

oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. // *New Phytol.* 2007. Vol. 174. P. 742–751.

191. Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M.J., Potocká, A., Alché, J. de D., Kost, B., Žárský, V. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. // *J. Plant Physiol.* , 2012. Vol. 169. P. 1654–1663.

192. Prado, A.M. Nitric oxide is involved in growth regulation and reorientation of pollen tubes. // *Development.* 2004. Vol. 131. P. 2707–2714.

193. Prado, A.M., Colaço, R., Moreno, N., Silva, A.C., Feijó, J.A. Targeting of Pollen Tubes to Ovules Is Dependent on Nitric Oxide (NO) Signaling. // *Mol. Plant.* 2008. Vol. 1. P. 703–714.

194. Qin, Y., Yang, Z. Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011. Vol. 22. P. 816–824.

195. Qu, H.-Y., Shang, Z.-L., Zhang, S.-L., Liu, L.-M., Wu, J.-Y. Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. // *New Phytol.* 2007. Vol. 174. P. 524–36.

196. Qu, H., Jiang, X., Shi, Z., Liu, L., Zhang, S. Fast loading ester fluorescent Ca^{2+} and pH indicators into pollen of *Pyrus pyrifolia*. // *J. Plant Res.* 2012. Vol. 125, P. 185–195.

197. Qu, H., Xing, W., Wu, F., Wang, Y. Rapid and inexpensive method of loading fluorescent dye into pollen tubes and root hairs. // *PLoS One.* 2016. Vol. 11. P. 67-79.

198. Rathore, K.S., Cork, J.R., Robinson, K.R. A cytoplasmic gradient of Ca^{2+} is correlated with the growth of lily pollen tubes. // *Dev. Biol.* 1991. Vol. 148. P. 612–619.

199. Reiss, H.-D., Herth, W. Nifedipine-sensitive calcium channels are involved in polar growth of lily pollen tubes. // *J. Cell Sci.* 1985. Vol. 76. P. 247–254.

200. Reiss, H.-D., Herth, W. Visualization of the Ca^{2+} -Gradient in Growing Pollen tubes of *Lilium longiflorum* with Chlorotetracycline Fluorescence. // *Protoplasma.* 1978. Vol. 97. P. 373–377.

201. Reiss, H., Herth, W., Nobiling, R. Development of membrane- and calcium-gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum*. // *Planta.* 1985. Vol. 163. P.

84–90.

202. Reiss, H.D., Nobiling, R. Quin-2 fluorescence in lily pollen tube: distribution of free cytoplasmic calcium. // *Protoplasma*. 1986. Vol. 131. P. 244–246.
203. Roberts, S.K. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. // *New Phytol.* 2006. Vol. 169. P. 647–666.
204. Robinson, K.M., Janes, M.S., Beckman, J.S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. P. 941–947.
205. Rodrigo-Moreno, A., Andrés-Colás, N., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Penarrubia, L., Shabala, S. 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.* 2013. Vol. 36. P. 844–55.
206. Rounds, C.M., Bezanilla, M. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. Vol. 64. P. 243–65.
207. Rounds, C.M., Lubeck, E., Hepler, P.K., Winship, L.J. Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs. // *Plant Physiol.* 2011. Vol. 157. P. 175–87.
208. Rounds, C.M., Winship, L.J., Hepler, P.K. Pollen tube energetics: respiration, fermentation and the race to the ovule. // *AoB Plants*. 2011. P. 1–14.
209. Roy, S., Holdaway-Clarke, T., Hackett, G., Kunkel, J., Lord, E., Hepler, P. Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role of calcium in exocytosis. // *Plant J.* 1999. Vol. 19. P. 379–86.
210. Rudall, P.J., Bateman, R.M. Developmental bases for key innovations in the seed-plant microgametophyte. // *Trends Plant Sci.* 2007. Vol. 12. P. 317–326.
211. Rutten, T.L.M., Derksen, J. Microtubules in pollen tube subprotoplasts: organization during protoplast formation and protoplast outgrowth. // *Protoplasma*. 1992. Vol. 167. P. 231–237.
212. Rutten, T.L.M., Derksen, J. Organization of actin filaments in regenerating and outgrowing subprotoplasts from pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. // *Planta*. 1990. Vol. 180. P. 471–479.
213. Samaj, J., 2005. *Methods and Molecular Tools for Studying Endocytosis in Plants*

— an Overview, in: Plant Endocytosis. pp. 1–17.

214. Schafer, F. Q., Buettner, G. R., 2004. Redox State and Redox Environment in Biology. In Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles.

215. Schiøtt, M., Romanowsky, S.M., Baekgaard, L., Jakobsen, M.K., Palmgren, M.G., Harper, J.F. A plant plasma membrane Ca^{2+} pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101. P. 9502–9507.

216. Segal, A.W. NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans. // Open Biol. 2016. Vol. 6. P. 160028.

217. Selles, B., Michaud, C., Xiong, T.C., Leblanc, O., Ingouff, M. *Arabidopsis* pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. // New Phytol. 2018. Vol. 219. P. 58–65.

218. Serrano, R., Cano, A., Pestana, A. The plasma membrane ATPase of *Dictyostelium discoideum*. // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1985. Vol. 812. P. 553–560.

219. Shang, Z., Ma, L., Zhang, H., He, R., Wang, X., Cui, S., Sun, D. Ca^{2+} influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. // Plant Cell Physiol. 2005. Vol. 46. P. 598–608.

220. Sharma, B., Bhatla, S.C. Accumulation and scavenging of reactive oxygen species and nitric oxide correlate with stigma maturation and pollen – stigma interaction in sunflower. // Acta Physiol. Plant. 2013. Vol. 35. P. 2777–2787.

221. Shi, J., Kim, K.-N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S., Kudla, J. Novel Protein Kinases Associated with Calcineurin B-like Calcium Sensors in *Arabidopsis*. // Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 2393–2405.

222. Smirnova, A., Matveyeva, N., Yermakov, I. Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics. // Plant Biol. (Stuttg). 2013. Vol. 16. P. 252–257.

223. Soto, G., Alleva, K., Amodeo, G., Muschietti, J.P. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea.

// FEBS Letters. 2008. Vol. 582. P. 4077–4082.

224. Speranza, A., Crinelli, R., Scoccianti, V., Geitmann, A. Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. // *Plant Biol.* 2011. Vol. 14. P. 64–76.

225. Stahlberg, R., Miller, A.J., Wells, D.M., Shabala, S., Messerli, M.A., et al. 2012. *Plant Electrophysiology: Theory and Methods, Plant Electrophysiology: Signaling and Responses.* Springer, Berlin Heidelberg.

226. Steinhorst, L., Mahs, A., Ischebeck, T., Zhang, C., Zhang, X., Arendt, S., Schultke, S., Heilmann, I., Kudla, J. Vacuolar CBL-CIPK12 Ca²⁺-Sensor-Kinase Complexes Are Required for Polarized Pollen Tube Growth. // *Curr. Biol.* 2015. Vol. 25. P. 1–8.

227. Talke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J.M., Sanders, D. CNGCs: Prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? // *Trends Plant Sci.* 2003. Vol. 8. P. 286–293.

228. Tanaka, I., 1996. Haploid protoplasts: pollen protoplasts, in: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veileux, R.E. (Eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants.* pp. 287–307.

229. Tanaka, I., Kitazume, C., Ito, M. The isolation and culture of lily pollen protoplasts. // *Plant Sci.* Vol. 1987.50. P. 205–211.

230. Tang, H., Viola, H.M., Filipovska, A., Hool, L.C. Cav1.2 calcium channel is glutathionylated during oxidative stress in guinea pig and ischemic human heart. // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51.

231. Tavares, B., Moura, T.F., Dias, P.N., Feijo, A. Calcium-regulated anion channels in the plasma membrane of *Lilium longiflorum* pollen protoplasts. // *New Phytol.* 2011. Vol. 192. P. 45–60.

232. Taylor, A.R., Assmann, S.M. Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells. // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 125. P. 329–338.

233. Taylor, L.P., Hepler, P.K. Pollen germination and tube growth. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 48. P. 461–491.

234. Teardo, E., Carraretto, L., Wagner, S., Formentin, E., Behera, S., De Bortoli, S., Larosa, V., Fuchs, P., Lo Schiavo, F., Raffaello, A., Rizzuto, R., Costa, A., Schwarzländer, M., Szabò, I. Physiological Characterization of a Plant Mitochondrial

- Calcium Uniporter *in vitro* and *in vivo*. // *Plant Physiol.* V. 173. P. 1355–1370.
235. Thomas, S.G., Franklin-Tong, V.E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*. 2004. Vol. 16. P. 305–309.
236. Tunc-Ozdemir, M., Rato, C., Brown, E., Rogers, S., Mooneyham, A., Frietsch, S., Myers, C.T., Poulsen, L.R., Malhó, R., Harper, J.F. Cyclic nucleotide gated channels 7 and 8 are essential for male reproductive fertility. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 e55277.
237. Tunc-Ozdemir, M., Tang, C., Ishka, M.R., Brown, E., Groves, N.R., Myers, C.T., Rato, C., Poulsen, L.R., McDowell, S., Miller, G., Mittler, R., Harper, J.F. A cyclic nucleotide-gated channel (CNGC16) in pollen is critical for stress tolerance in pollen reproductive development. // *Plant Physiol.* 2013. Vol. 161. P. 1010–20.
238. Viehweger, K. How plants cope with heavy metals. // *Bot. Stud.* 2014. Vol. 55. P. 35.
239. Wagner, S., Behera, S., De Bortoli, S., Logan, D.C., Fuchs, P., Carraretto, L., Teardo, E., Cendron, L., Nietzel, T., Füßl, M., Doccia, F.G., Navazio, L., Fricker, M.D., Van Aken, O., Finkemeier, I., Meyer, A.J., Szabò, I., Costa, A., Schwarzländer, M. The EF-Hand Ca^{2+} Binding Protein MICU Choreographs Mitochondrial Ca^{2+} Dynamics in *Arabidopsis*. // *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 3190–3212.
240. Wang, Y.-F., Fan, L.-M., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wu, W.-H. Ca^{2+} -Permeable channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* pollen are regulated by actin microfilaments. // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. P. 3892–3904.
241. Wang, Y., Chen, T., Zhang, C., Hao, H., Liu, P., Zheng, M., Baluska, F., Samaj, J., Lin, J. Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. // *New Phytol.* 2009. Vol. 182. P. 851–862.
242. Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., Wu, W.-H. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 148. P. 1201–11.
243. Wang, Y.H., Li, X.C., Zhu-Ge, Q., Jiang, X., Wang, W.D., Fang, W.P., Chen, X., Li, X.H. Nitric Oxide Participates in Cold-Inhibited *Camellia sinensis* Pollen

- Germination and Tube Growth Partly via cGMP *In Vitro*. PLoS One. 2012. Vol. 7.
244. Watahiki, M.K., Trewavas, A.J., Parton, R.M. Fluctuations in the pollen tube tip-focused calcium gradient are not reflected in nuclear calcium level: A comparative analysis using recombinant yellow cameleon calcium reporter. // *Sex. Plant Reprod.* 2004. Vol. 17. P. 125–130.
245. Weaver, M.L., Breda, V., Gaffield, W. Nonenzymatic release of intact protoplasts from mature pollen of bean. // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1990. Vol. 115. P. 640–643.
246. Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants. // *Adv. Bot. Res.* 1996. Vol. 22. P. 45–96.
247. Weisenseel, M.H., Jaffe, L.F. The major growth current through lily pollen tubes enters as K^+ and leaves as H^+ . // *Planta.* 1976. Vol. 7. P. 1–7.
248. Weisenseel, M.H., Nuccitelli, R., Jaffe, L.F. Large electrical currents traverse growing pollen tubes. // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 66. P. 556–67.
249. Weisenseel, M.H., Wenisch, H.H. The membrane potential of growing lily pollen. // *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 1980. Vol. 99. P. 313–323.
250. Wilson, I.D., Hiscock, S.J., James, P.E., Hancock, J.T. Nitric oxide and nitrite are likely mediators of pollen interactions. // *Plant Signal. Behav.* 2009. Vol. 4. P. 416–418.
251. Wu, Juyou, Qu, H., Jin, C., Shang, Z., Wu, Jun, Xu, G., Gao, Y., Zhang, S. cAMP activates hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels in the pollen of *Pyrus pyrifolia*. // *Plant Cell Rep.* 2011. Vol. 30. P. 1193–1200.
252. Wu, Juyou, Shang, Z., Wu, Jun, Jiang, X., Moschou, P.N., Sun, W., Roubelakis-Angelakis, K.A., Zhang, S. Spermidine oxidase-derived H_2O_2 regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channels and pollen tube growth. // *Plant J.* 2010. Vol. 63. P. 1042–1053.
253. Wu, Y., Xu, X., Li, S., Liu, T., Ma, L., Shang, Z. Heterotrimeric G-protein participation in *Arabidopsis* pollen germination through modulation of a plasmamembrane hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channel. // *New Phytol.* 2007. Vol. 176. P. 550–559.
254. Wudick, M.M., Feijo, J.A. At the Intersection: Merging Ca^{2+} and ROS Signaling

- Pathways in Pollen. // *Mol. Plant*. 2014. Vol. 7. P. 1595–1597.
255. Wudick, M.M., Luu, D., Tournaireroux, C., Sakamoto, W., Maurel, C., Moléculaire, P., Biologie, I. De, De, U.M. Vegetative and Sperm Cell-Specific Aquaporins of *Arabidopsis* Highlight the Vacuolar Equipment of Pollen and Contribute to Plant Reproduction. // *Plant Physiology*. 2014. Vol. 164. P. 1697–1706.
256. Yang, H.Y. Fluorescein diacetate used as a vital stain for labeling living pollen tubes. // *Plant Sci*. 1986. Vol. 44. P. 59–63.
257. Yang, Y., Jin, X., Jiang, C. S-Glutathionylation of Ion Channels: Insights into the Regulation of Channel Functions, Thiol Modification Crosstalk, and Mechanosensing. // *Antioxid. Redox Signal*. 2014. Vol. 20. P. 937–951.
258. Yang, Z. Cell polarity signaling in *Arabidopsis*. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2008. Vol. 24. P. 551–75.
259. Yokota, E., Muto, S., ShimMen, T. Calcium-Calmodulin Suppresses the Filamentous Actin-Binding Activity of a 135-Kilodalton Actin-Bundling Protein Isolated from Lily Pollen Tubes. // *Plant Physiol*. 2000. Vol. 123. P. 645–654.
260. Yu, G., Liang, J., He, Z., Sun, M. Quantum dot-mediated detection of gamma-aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. // *Chem. Biol*. 2006. Vol. 13. P. 723–731.
261. Zafra, A., Rejón, J.D., Hiscock, S.J., Alché, J.D.D. Patterns of ROS Accumulation in the Stigmas of Angiosperms and Visions into Their Multifunctionality in Plant Reproduction. // *Front. Plant Sci*. 2016. Vol. 7. P. 1–7.
262. Zafra, A., Rodríguez-García, M., Alché, J. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. // *BMC Plant Biol*. 2010. Vol. 10. P. 36.
263. Zechmann, B., Koffler, B.E., Russell, S.D. Glutathione synthesis is essential for pollen germination *in vitro*. // *BMC Plant Biol*. 2011. Vol. 11. P. 54.
264. Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W., Song, C.P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 126. P. 1438–48.
265. Zhao, L.-N., Shen, L.-K., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wang, Y., Wu, W.-H. Ca²⁺-

- dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in *Arabidopsis* pollen tubes. // Plant Cell. 2013. Vol. 25. P. 649–61.
266. Zhou, L., Fu, Y., Yang, Z. A Genome-wide Functional Characterization of *Arabidopsis* Regulatory Calcium Sensors in Pollen Tubes. // J. Integr. Plant Biol. 2009. Vol. 51. P. 751–761.
267. Zhou, L., Lan, W., Chen, B., Fang, W., Luan, S. A Calcium Sensor-Regulated Protein Kinase, CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN-INTERACTING PROTEIN KINASE19, Is Required for Pollen Tube Growth and Polarity. // Plant Physiol. 2015. Vol. 167. P. 1351–1360.
268. Zhou, L., Lan, W., Jiang, Y., Fang, W., Luan, S. A calcium-dependent protein Kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. Mol. Plant. 2014. Vol. 7. P. 369–376.
269. Zonia, L., Cordeiro, S., Tupy J., Feijo J.A. 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. // The Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 2233–2249.