

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПРОЦЕССЕ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА И РОСТА ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ

© М. А. Брейгина,¹ А. В. Смирнова, Н. П. Матвеева, И. П. Ермаков

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
¹электронный адрес: pollen-ions@rambler.ru

Методами количественной флуоресцентной микроскопии изучали изменения мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна в процессе прорастания и в растущей трубке. Использовали два потенциал-чувствительных красителя: DiBAC₄(3) — для определения средней величины мембранного потенциала в пыльцевых зернах и изолированных из них протопластах; Di-4-ANEPPS — для картирования распределения потенциала на поверхности пыльцевого протопласта и пыльцевой трубки. Показано, что активация пыльцевого зерна табака сопровождается гиперполяризацией плазматической мембраны вегетативной клетки примерно на 8 мВ. Значения мембранного потенциала для изолированных пыльцевых протопластов лилии были существенно более отрицательными (–108 мВ), чем для пыльцевых зерен, из которых они были выделены (–23 мВ). Выявлено полярное распределение мембранного потенциала на поверхности протопласта и градиентное с выходом на плато — вдоль пыльцевой трубки. Характер продольного градиента в трубке изменялся, но он не исчезал при действии ингибитора H⁺-АТФазы плазмалеммы ортованадата (1 мМ) или фузикокина (1 мкМ), стимулирующего работу этого фермента. Ингибитор анионных каналов NPPB (40 мкМ) полностью снимал продольный градиент в пыльцевой трубке. Полученные результаты свидетельствуют о гиперполяризации плазматической мембраны в процессе прорастания пыльцевого зерна и о неоднородном его распределении на поверхности пыльцевого зерна и трубки. Ингибиторный анализ распределения потенциала в трубке выявил участие H⁺-АТФазы плазматической мембраны и анионных каналов в регуляции его величины.

Ключевые слова: мембранный потенциал, прорастание пыльцевого зерна, полярный рост.

Принятые сокращения: DiBAC₄(3) — Bis(1,3-dibutylbarbituric acid(5)) trimethine oxonol, Di-4-ANEPPS — 3-(4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthyl)-trans-ethenyl)pyridinium)propanesulfonate, NPPB — (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)) benzoic acid.

Пыльцевое зерно покрытосеменных растений, прорастая на рыльце пестика, формирует пыльцевую трубку, которая доставляет спермий к месту оплодотворения. Образуя трубку предшествует гидратация пыльцевого зерна, активация в нем метаболических процессов и структурная реорганизация цитоплазмы, связанная с формированием оси полярности. Пыльцевая трубка является одним из наиболее изученных объектов в исследованиях закономерностей полярного роста (Taylor, Hepler, 1997).

Исследования ионной регуляции прорастания пыльцевого зерна и роста трубки были начаты более 30 лет назад, когда с помощью неселективных микроэлектродов обнаружили, что активация пыльцевого зерна лилии приводит к появлению трансмембранных ионных токов (Weisenseel et al., 1975). Входной ток достигал максимальных значений в области будущего прорастания, а выходной — на противоположном полюсе. После прорастания входные токи были распределены вдоль трубки, а выходные были смещены к пыльцевому зерну. Значения мембранного потенциала для вегетативной клетки пыльцевого зерна лилии, по данным этих авторов (Weisenseel, Weisenseel, 1980), составляли от –90 до –130 мВ. В более поздних исследованиях, проводившихся с использованием усовершенствованных микроэлектродных методов, полу-

чены сходные значения потенциала для пыльцы лилии (от –110 до –150 мВ) (Obermeyer, Blatt, 1995). Для пыльцевых зерен других видов растений приводятся более положительные значения мембранного потенциала: –30 мВ у *Pentunia hybrida* и –37 мВ у *Narcissus* (Feijo et al., 1995), а потенциал изолированных пыльцевых протопластов *Brassica chinensis* составлял –79 мВ (Fan et al., 2003). Мембранный потенциал пыльцевых трубок также различен у разных объектов, в частности у *Agapanthus umbellatus* он составлял –55 (Malho et al., 1995), а у *Arabidopsis* — около –100 мВ (Mouline et al., 2002).

В работах последних лет на основе ингибиторного анализа и (или) изучения мутантов по транспортным белкам плазмалеммы была выявлена важная роль трансмембранного переноса H⁺, K⁺, Ca²⁺ и Cl[–] в регуляции прорастания пыльцы и роста пыльцевой трубки (Матвеева и др., 2003; Holdaway-Clarke, Hepler, 2003; Hepler et al., 2006; Брейгина и др., 2009). Наряду с этим установлена связь ростовых процессов с формированием ионных градиентов в цитоплазме трубки: концентрация кальция убывает по мере удаления от кончика, величина внутриклеточного рН минимальна в апексе и постепенно изменяется по длине трубки (Holdaway-Clarke, Hepler, 2003; Hepler et al., 2006).

Вместе с тем получили подтверждение ранние данные (Weisenseel et al., 1975) о пространственном распределении ионных токов в пыльцевой трубке (Michard et al., 2009). Установлено, что H^+ , K^+ и Ca^{2+} входят в трубку в апикальной части. Выходные потоки протонов выявлены в более дистальных зонах, причем их интенсивность изменяется по длине трубки (Cortal et al., 2008; Michard et al., 2009). Полярное распределение ионных токов, по крайней мере в случае протонов, в значительной мере обусловлено полярным распределением ионтранспортирующих белков на плазмалемме. Об этом свидетельствуют эксперименты, в которых одновременно изучали протонные токи и распределение в плазмалемме пыльцевой трубки табака флуоресцентно меченной H^+ -АТФазы (Cortal et al., 2008). Она отсутствовала в апексе трубки, но выявлялась в субапикальной области, и по мере удаления от кончика ее содержание в плазмалемме возрастало одновременно с увеличением интенсивности выходного протонного тока. Более того, ортованадат, который ингибировал активность H^+ -АТФазы, подавлял и выходной протонный ток.

Вопрос о распределении токов Cl^- не решен окончательно. По некоторым данным (Zonia et al., 2002), Cl^- выходит из пыльцевой трубки в апикальной части, а входит в более дистальных районах, причем по мере удаления от кончика ток вначале возрастает, а затем выходит на плато. Другие авторы на основе аналогичных экспериментов пришли к заключению о том, что входные потоки H^+ могут быть ошибочно приняты за выходные потоки Cl^- (Messerli et al., 2004).

Данные о локализации ионтранспортирующих белков в плазмалемме пыльцевого зерна немногочисленны. В изолированных пыльцевых протопластах лилии обнаружено полярное распределение механочувствительных кальциевых каналов (Dutta, Robinson, 2004). Предполагают, что они локализованы в месте возможного появления трубки. В соответствии с этим для пыльцы *Arabidopsis* установлено, что локальное повышение концентрации кальция в области функциональной поры является необходимым условием прорастания *in vivo* (Iwano et al., 2004).

Рассмотренные выше микроэлектродные исследования ионной регуляции прорастания пыльцевого зерна выявили сложную сеть взаимосвязанных ионных потоков, которые в совокупности определяют разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны. Мембранный потенциал в свою очередь контролирует процессы транспорта ионов и метаболитов и взаимодействие клетки с окружающей средой. Вопрос о возможности пространственных и (или) временных изменений мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста трубки обсуждался в литературе (Holdaway-Clarke, Nepler, 2003; Robinson, Messerli, 2003), однако в рамках микроэлектродных исследований ответ на него не был получен.

Задачей настоящей работы стало выявление изменений мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна. Для решения этой задачи использовали методы флуоресцентной микроскопии с витальным окрашиванием клеток потенциалзависимыми красителями, которые ранее успешно применяли в исследованиях клеток животных и грибов.

Материал и методика

Растительный материал и подготовка проб. Объектами служили срезанные растения лилии *Lilium longiflorum* Thunb. сорта White Europe и растения та-

бака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, выращенные из семян в климатической камере (25 °С, 16-часовой световой день). Пыльники извлекали из цветков накануне их раскрытия и помещали в термостат (25 °С) на 3 сут. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при -20 °С. После размораживания пыльцевые зерна отмывали гексаном от трифины и высушивали на воздухе. Навески сухой пыльцы инкубировали во влажной камере при 25 °С (1—2 ч), после чего их использовали для получения культур пыльцевых зерен или протопластов.

Пыльцу проращивали в стандартной среде в чашках Петри диаметром 2.5 см или пластиковых культуральных камерах объемом 35 мкл (CoverWell, Schleicher & Schuell, Германия), обработанных изнутри 0.01%-ным поли-L-лизинном. В последнем случае анализировали пыльцевые трубки, прикрепившиеся к верхней стенке камеры. Плазмоллиз пыльцевых трубок проводили в течение 30 мин в стандартной среде, дополненной 0.9 М маннитом.

Для выделения протопластов пыльцу лилии инкубировали в среде с ферментами (см. ниже) в течение 2 ч при 30 °С, затем отмывали той же средой без ферментов и немедленно использовали для окрашивания либо фиксировали. Выделение протопластов контролировали общепринятым методом (Tanaka et al., 1987), окрашивая пробы флуоресцентным красителем Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma), который выявляет присутствие клеточной стенки.

Реактивы. DiBAC₄(3) — Bis(1,3-dibutylbarbituric acid(5)) trimethine oxonol и Di-4-ANEPPS — 3-(4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthyl)-trans-ethenyl)pyridinium)propane-sulfonate (Molecular probes, Нидерланды), фузикоцин (Serva, Германия), ортованадат натрия (ICN, США), Fluorescent Brightener, NPPB — (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino))benzoic acid, поли-L-лизин (Sigma, США), целлюлаза и пектиназа (ICN, США).

Состав питательных сред и добавляемые реагенты. Стандартная среда включала в себя 0.3 М сахарозы, 1.6 мМ H_3BO_3 , 3 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0.8 мМ $MgSO_4$ и 1 мМ KNO_3 в 25 мМ буфере MES-Tris, pH 5.9. Среда для выделения протопластов (Tanaka et al., 1987) отличалась от стандартной значением pH (5.8), концентрацией сахарозы (0.5 М) и присутствием целлюлазы и пектиназы (по 1 %). Фузикоцин, ортованадат натрия и NPPB добавляли к проросшим пыльцевым зернам после 75 мин инкубации в стандартной среде. Конечная концентрация фузикоцина составляла 1 мкМ, ортованадата — 1 мМ, NPPB — 40 мкМ. Время воздействия каждого из этих реагентов на пыльцевые трубки составляло 10 мин.

Изменения величины мембранного потенциала выявляли с использованием двух красителей — DiBAC₄(3) и Di-4-ANEPPS. DiBAC₄(3) относится к категории медленных красителей. Заряженные молекулы этих красителей распределяются между цитоплазмой клетки и окружающей средой в соответствии с уравнением Нернста (Plašek, Sigler, 1996). Измерив интенсивность флуоресценции живых и фиксированных (полностью деполяризованных) клеток, можно рассчитать значения мембранного потенциала в мВ (Emri et al., 1998). Определение величины мембранного потенциала вегетативной клетки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки проводили в соответствии с описанной ранее методикой (Брейгина и др., 2009). Для этого клетки окрашивали раствором DiBAC₄(3) в концентрации 5 мкМ в течение 10 мин. В качестве полностью деполяризованного контроля использова-

ли фиксированные клетки (Emri et al., 1998; Брейгина и др., 2009).

Di-4-ANEPPS относится к группе быстрых красителей, которые встраиваются в мембрану. В молекуле красителя при изменении потенциала происходит миграция заряда, приводящая к сдвигу спектров возбуждения и флуоресценции (Loew, 1996). Как правило, измеряют интенсивность флуоресценции, возбуждаемой в двух диапазонах (синей и зеленой областях спектра). Их соотношение (Fb/Fg) является мерой мембранного потенциала на данном участке мембраны. Таким образом, использование этого красителя позволяет выявлять локальные изменения мембранного потенциала в пределах одной клетки. Протопласты суспендировали в растворе Di-4-ANEPPS (10 мкМ) и после осаждения центрифугированием (250 g) немедленно микроскопировали. Пыльцевые трубки окрашивали в капле на предметном стекле, смешивая суспензию проросших пыльцевых зерен с раствором красителя (10 мкМ) в соотношении 1 : 1 и немедленно микроскопировали. В опытах с двойной окраской протопласты сначала окрашивали DiBAC₄(3), затем к суспензии добавляли раствор Di-4-ANEPPS (20 мкМ) в соотношении 1 : 1.

Микроскопия и компьютерный анализ изображений. В работе использовали микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, снабженный соответствующими светофильтрами, ртутной лампой и цифровой камерой AxioCam HRC (Zeiss, Германия). Флуоресценцию возбуждали в диапазоне длин волн 359—371 нм и регистрировали при длинах волн больше 397 нм (в случае Calcofluor White M2R), или возбуждали в диапазоне 475—495 нм и регистрировали при 515—565 нм (DiBAC₄(3)), либо возбуждали в синей (475—495 нм) или зеленой (540—552 нм) области спектра, а регистрировали при длинах волн больше 590 нм (Di-4-ANEPPS). Препараты фотографировали с использованием скоростной автоматической заслонки, которая позволяла освещать препарат только в момент съемки и делать серии фотографий с заданной выдержкой. Получение и анализ изображения проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.7 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка. Все опыты проводили не менее чем в пяти биологических повторностях. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 или 0.01. На рисунках и в таблице приведены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты

Для выявления изменений мембранного потенциала использовали два флуоресцентных красителя — Di-4-ANEPPS и DiBAC₄(3) (Haugland, 2005). DiBAC₄(3) ранее был использован для изучения пыльцевого зерна и пыльцевой трубки табака (Матвеева и др., 2004; Брейгина и др., 2009), Di-4-ANEPPS для изучения пыльцы ранее не применяли. Поэтому необходимо было в предварительном исследовании определить возможные ограничения метода, обусловленные особенностями объекта.

При окрашивании пыльцевых зерен Di-4-ANEPPS было выявлено интенсивное неспецифическое связывание красителя с гидрофобным наружным слоем оболочки пыльцы — эскиной (данные не показаны). Это препятствует выявлению флуоресценции плазматической мембраны и делает Di-4-ANEPPS непригодным для работы с непроросшим пыльцевым зерном. Поэтому для окрашивания использовали свежeweделенные пыльцевые протопласты лилии. По прошествии 1 сут они уже интенсивно регенерировали клеточную стенку, которая в некоторых случаях выявлялась в виде пэччей (рис. 1, а, б). В протопластах, окрашенных Di-4-ANEPPS, четко выявлялся контур клетки (рис. 2, а). Неповрежденный протопласт не включал краситель в цитоплазму по крайней мере на протяжении 15 мин после добавления красителя. В пыльцевой трубке также был виден четкий контур (рис. 3, а). Однако в апикальной области (на протяжении первых 3 мкм по длине трубки) краситель сравнительно быстро появлялся в цитоплазме. Поэтому данную часть трубки исключали из рассмотрения. Контрольные эксперименты с плазмолизом пыльцевой трубки показали (рис. 3, б, в), что в плазмолизированном районе видна ярко окрашенная плазматическая мембрана, боковые стенки пыльцевой трубки не окрашены, а в периплазматическом пространстве, разделяющем стенку и плазматическую мембрану, появляются компоненты, связывающие краситель, предположительно мембраны везикул (Kroh, Knuiman, 1985). Эти данные демонстрируют связывание красителя с плазматической мембраной и свидетельствуют о том, что стенка пыльцевой трубки не является препятствием для анализа изменений мембранного потенциала.

Для того чтобы установить, в какой мере согласуются результаты, получаемые при использовании двух указанных красителей, изолированные протопласты окрашивали одновременно DiBAC₄(3) и Di-4-ANEPPS. Для каждо-

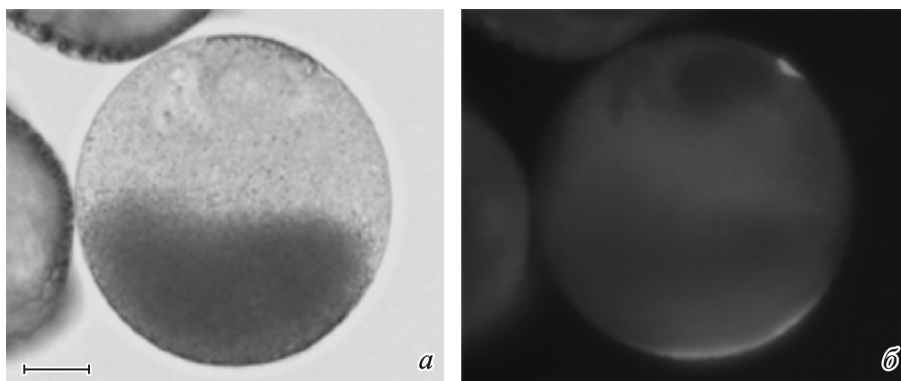


Рис. 1. Протопласт, выделенный из пыльцевого зерна лилии, после 1 сут инкубации в среде для выделения протопластов без ферментов.

а — в светлом поле; б — флуоресценция, видны пэччи стеночного материала, окрашенного Calcofluor White M2R. Масштабная линейка — 20 мкм.

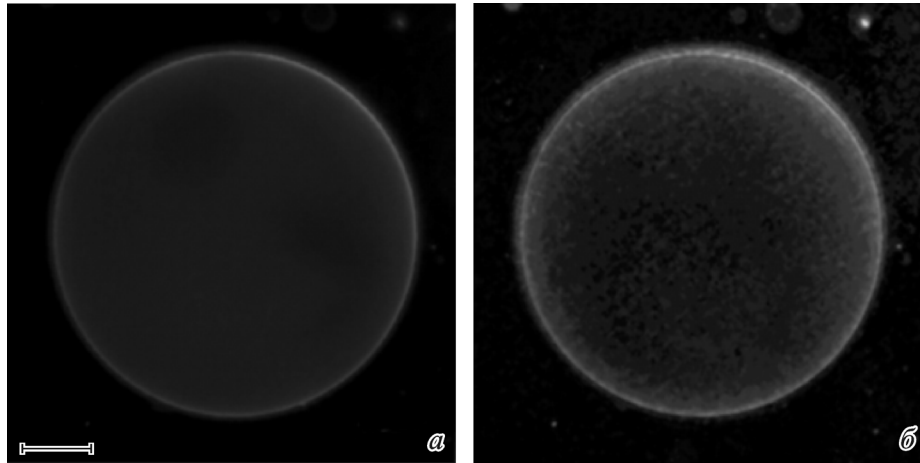


Рис. 2. Протопласт, выделенный из пыльцевого зерна лилии и окрашенный Di-4-ANEPPS.

a — возбуждение флуоресценции в синей области спектра; *б* — результат компьютерной операции попиксельного деления этого изображения на другое, полученное при возбуждении флуоресценции в зеленой области. Масштабная линейка — 20 мкм.

го протопласта определяли интенсивность флуоресценции DiBAC₄(3) в цитоплазме и среднюю интенсивность флуоресценции Di-4-ANEPPS, связанного с мембраной. Интенсивность флуоресценции Di-4-ANEPPS регистрировали при возбуждении в синей (Fb) и зеленой (Fg) областях спектра и рассчитывали их соотношение Fb/Fg (Montana et al., 1989). Диаметр протопластов, выбранных для анализа, варьировал от 111 до 153 мкм, различались они и по интенсивности измеряемой флуоресценции. Мы не выявили корреляцию флуоресценции с диаметром про-

топласта в указанных пределах: коэффициент корреляции r для DiBAC₄(3) составлял 0.09, а для Fb/Fg Di-4-ANEPPS -0.23 . В то же время обнаружена высокая корреляция ($r = 0.93$) между интенсивностью флуоресценции DiBAC₄(3) и соотношением Fb/Fg для Di-4-ANEPPS (рис. 4). Это хорошо согласуется с данными литературы о том, что при деполяризации в клетке увеличивается содержание DiBAC₄(3) и возрастает величина Fb/Fg, а при гиперполяризации соответственно обе величины снижаются (Brauner et al., 1984; Zhang et al., 1998).

Дальнейший анализ протопластов, окрашенных Di-4-ANEPPS, включал в себя визуализацию и анализ распределения на их поверхности мембранного потенциала (величины Fb/Fg). С этой целью, используя возможности программы AxioVision, производили попиксельное деление одного изображения на другое. Первое изображение было получено при возбуждении флуоресценции в синей области спектра, второе — в зеленой. Результат деления изображений представлен на рис. 2, *б*, а результат измерений величины Fb/Fg в разных точках окрашенной мембраны — на рис. 5. Максимальное значение этой величины достигалось в точке пересечения оси 1 с поверхностью протопласта (рис. 2, *б*; 5), минимальное — на оси 6. Аналогичный обсчет выборки протопластов показал, что максимальные и минимальные значения различаются в среднем в 1.5 раза и отличаются от значения Fb/Fg, усредненного по окружности ($P < 0.01$). Тем самым выявлены зоны мембраны, которые различаются по величине Fb/Fg, что указывает на неравномерное распределение мембранного потенциала по поверхности протопласта.

Величина мембранного потенциала протопласта и пыльцевых зерен в мВ была определена с помощью DiBAC₄(3). В живых пыльцевых зернах лилии (рис. 6, *а*, верхняя клетка) видна окрашенная цитоплазма. Погибшее пыльцевое зерно (рис. 6, *а*, нижняя клетка) деполяризовано и интенсивно окрашено, сходным образом выглядят фиксированные клетки (не показано). Изолированный протопласт (рис. 6, *б*) очень слабо связывает краситель. На рис. 6, *в* представлен тот же протопласт, снятый в проходящем свете. Фиксированный протопласт, представленный на рис. 6, *г* и *д*, снят при той же экспозиции, что и живой (рис. 6, *б*), но ярко окрашен. Проведен-

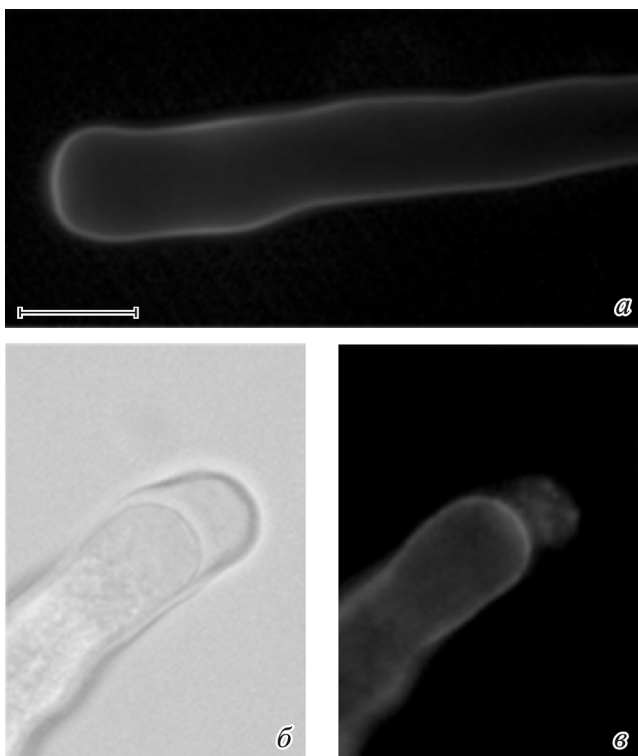


Рис. 3. Пыльцевые трубки табака, окрашенные Di-4-ANEPPS.

a — трубка находится в стандартной изотонической среде; *б*, *в* — трубка в условиях плазмолиза (0.9 М маннит). *а*, *в* — в свете флуоресценции; *б* — в светлом поле. Масштабная линейка — 10 мкм.

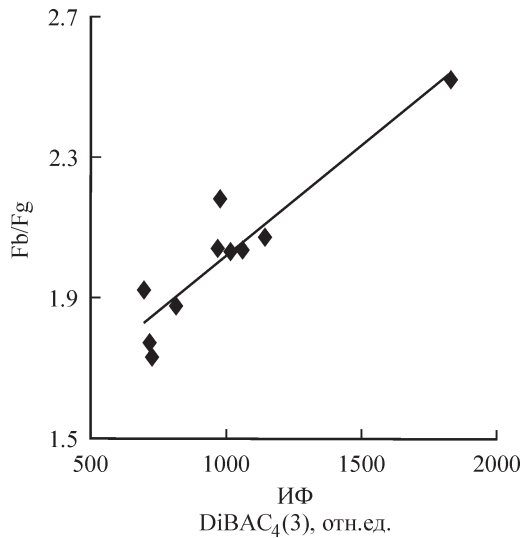


Рис. 4. Корреляция показателей, характеризующих величину мембранного потенциала отдельных протопластов при двух способах его определения.

В условиях двойной окраски для каждого протопласта измеряли интенсивность флуоресценции (ИФ) DiBAC₄(3), включенного в цитоплазму, и среднее отношение Fb/Fg плазматической мембраны, связавшей Di-4-ANEPPS; Fb — ИФ, измеренная в красной области при возбуждении в синей, Fg — то же при возбуждении в зеленой области.

ные измерения и расчеты выявили значительную гиперполяризацию протопластов по отношению к пыльцевым зернам, из которых они были выделены (см. таблицу).

Для изучения мембранного потенциала в процессе активации пыльцевого зерна на начальном этапе прорастания была использована пыльца табака, которая прорастает быстрее, чем пыльца лилии.

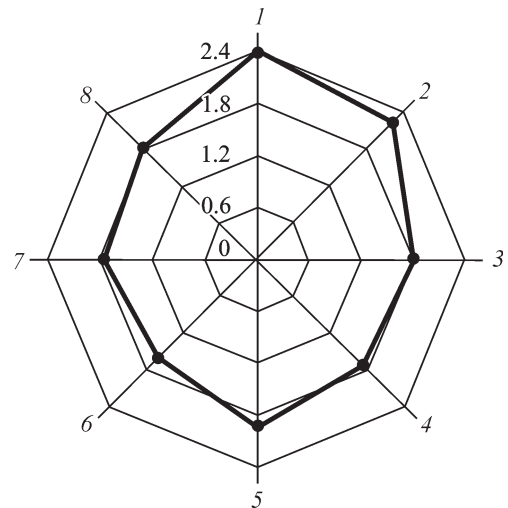


Рис. 5. Распределение величины отношения Fb/Fg по окружности протопласта, представленного на рис. 2.

Интенсивность флуоресценции, возбуждаемой в синей (Fb) и зеленой (Fg) областях спектра, измерена в 8 местах, равномерно распределенных по окружности протопласта (1—8). Отношение Fb/Fg отложено на соответствующих радиальных осях.

трубки у табака появлялись спустя 35 мин после начала гидратации в жидкой среде *in vitro*, у лилии трубки обнаруживались в течение 1 ч после начала инкубации. В процессе активации пыльцы табака (30 мин) происходила гиперполяризация плазмалеммы (см. таблицу), которая, однако, не достигала уровня, характерного для протопласта. Отметим, что значения мембранного потенциала для

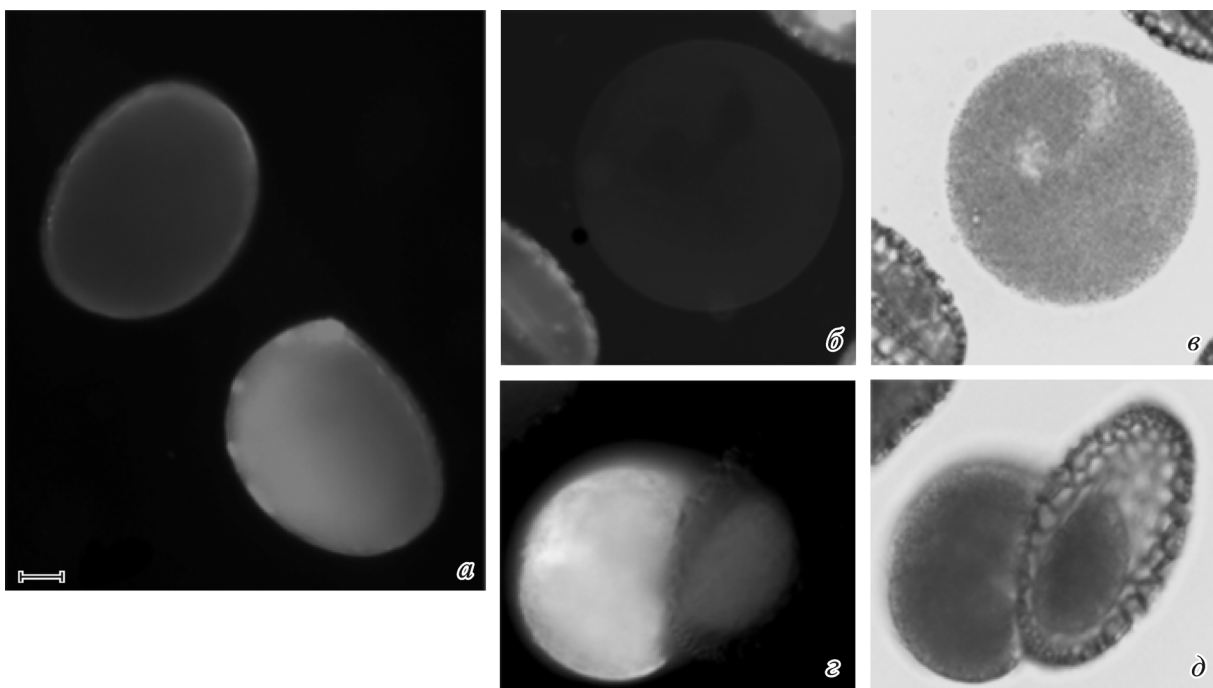


Рис. 6. Пыльцевые зерна лилии (а) и выделенные из них протопласты (б—д), окрашенные DiBAC₄(3) витально (а, б) и после фиксации (в, д).

в, д — те же протопласты в светлом поле. Масштабная линейка — 20 мкм.

Величина мембранного потенциала протопластов и пыльцевых зерен (ПЗ), определенная с помощью потенциалзависимого красителя DiBAC₄(3)

Объект	Потенциал, мВ
Протопласт лилии, выделенный из ПЗ	-108.0 ± 3.0
ПЗ лилии, гидратированное (10 мин)	-23.0 ± 1.0
ПЗ табака, гидратированное (10 мин)	-37.0 ± 1.5
ПЗ табака, активированное (30 мин)	-45.0 ± 1.9

пыльцы табака и лилии, которую инкубировали *in vitro* в течение 10 мин, существенно различались: для табака они были более отрицательными (см. таблицу).

Для того чтобы составить картину распределения мембранного потенциала в пыльцевой трубке, измеряли интенсивность флуоресценции ее плазматической мембраны после окрашивания Di-4-ANEPPS на отрезке 3—35 мкм от кончика трубки. На основании этих данных рассчитывали соотношение Fb/Fg. На отрезке 3—20 мкм наблюдали снижение этой величины по мере удаления от кончика с последующим выходом на плато (рис. 7), что свидетельствует о существовании градиента мембранного потенциала вдоль трубки. Можно было предположить, что в его создании участвует H⁺-АТФаза плазмалеммы. Для проверки этого предположения изучали влияние на распределение мембранного потенциала фузикокина (1 мкМ), стимулирующего работу H⁺-АТФазы, и ее ингибитора ортованадата (1 мМ). Оба воздействия изменяли форму кривой (рис. 7). Фузикокин вызывал гиперполяризацию в районах, близких к апексу ($P < 0.05$), ванадат — деполяризацию в субапикальной части трубки ($P < 0.05$). Однако в обоих случаях присутствовал градиент потенциала. Эти данные подтверждают участие протонной помпы в регуляции мембранного потенциала в

пыльцевой трубке. В то же время они указывают на наличие альтернативных регуляторных механизмов, которые обеспечиваются работой других ионтранспортирующих систем. Можно было предположить участие в этих процессах трансмембранного переноса анионов. Ингибирование анионных каналов с помощью специфического блокатора NPPB (40 мкМ) полностью ликвидировало градиент потенциала вдоль трубки (рис. 7).

Обсуждение

Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и в растущей трубке в настоящей работе изучали оптическими методами с использованием двух красителей, которые широко применяются для оценки мембранного потенциала клеток животных, — DiBAC₄(3) и Di-4-ANEPPS (Гамалей и др., 1998; Gamaley et al., 1998; Johnson, 1998). В доступной литературе данные об использовании Di-4-ANEPPS для изучения мембранного потенциала растительных клеток очень немногочисленны. Визуальный анализ пыльцевых зерен, выделенных из них протопластов и пыльцевых трубок, окрашенных этим красителем (рис. 2, 3), показал, что клеточная стенка пыльцевой трубки не является препятствием для окрашивания плазмалеммы. Поскольку стенка трубки по своим свойствам сходна с первичной стенкой соматических клеток, можно предположить, что данный краситель может быть использован в исследованиях клеток растений, исключая те случаи, когда на поверхности клетки в больших количествах присутствуют липофильные соединения, способные неспецифически связывать краситель, подобно тому как это делает спорополленин эскины. Вторым возможным ограничением для использования Di-4-ANEPPS является его интернализация в цитоплазму, как это происходит, например, в кончике пыльцевой трубки. Следует отметить, что трубка — это один из наиболее быстро растущих растительных объектов, и ее кончик отличается необычно высокой интенсивностью эндоцитоза (Cheung, Wu, 2008).

С использованием медленного красителя DiBAC₄(3) нам удалось выявить изменения мембранного потенциала в процессе активации пыльцевого зерна (см. таблицу). Гиперполяризация плазматической мембраны хорошо согласуется с данными об интенсификации дыхания и сдвиге внутриклеточного pH (Матвеева и др., 2002), а также с представлениями об интенсификации биосинтетических процессов и транспорта метаболитов через плазматическую мембрану в этот период (Heslop-Harrison, 1987). Более низкий по абсолютной величине потенциал пыльцевого зерна у лилии по сравнению с табаком можно объяснить большей продолжительностью у нее периода активации. Значения мембранного потенциала, полученные нами для протопласта лилии (см. таблицу), хорошо согласуются с данными микроэлектродных исследований этого объекта (Dutta, Robinson, 2004). Гиперполяризация плазмалеммы изолированного протопласта по отношению к пыльцевому зерну (рис. 6; см. таблицу) — вполне ожидаемый факт, поскольку протопласт интенсивно синтезирует клеточную стенку, которая вначале может откладываться в виде пэтчей (рис. 1). В отсутствие ферментов такие пэтчи выявляются в пыльцевых протопластах лилии уже через 1—2 ч инкубации (Zhao et al., 2004). В то же время величины мембранного потенциала пыльцевого зерна лилии, измеренные оптическим методом (-23 мВ;

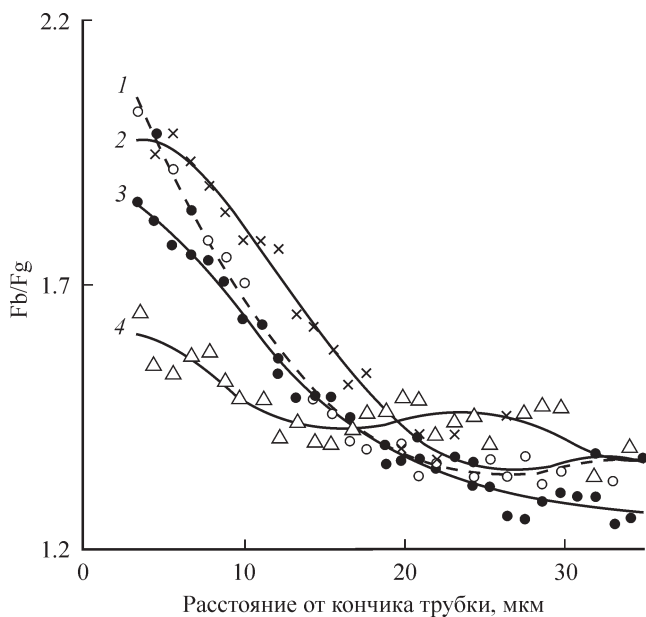


Рис. 7. Продольный градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке табака, выявляемый по изменению отношения Fb/Fg в контроле (1) и при действии 1 мМ ортованадата натрия (2), 1 мкМ фузикокина (3) или 40 мкМ NPPB (4).

Объяснения Fb и Fg см. в подписи к рис. 4.

см. таблицу) и с помощью микроэлектродов (от -90 до -150 мВ) (Obermeyer, Blatt, 1995; Weisenseel, Wenisch, 1980), существенно различаются. Можно предположить, что в экспериментах с использованием микроэлектродов пыльцевое зерно реагировало на механические воздействия и (или) продолжительную инкубацию в питательной среде. Исключение из этой среды бората с целью остановки прорастания пыльцы (Obermeyer, Blatt, 1995), возможно, не препятствовало активации пыльцевого зерна.

Как и следовало ожидать, количественный анализ окрашенных протопластов выявил корреляцию между их способностью включать в цитоплазму DiBAC₄(3) и величиной соотношения Fb/Fg (рис. 4).

Использование Di-4-ANEPPS позволило выявить неоднородность распределения мембранного потенциала по поверхности пыльцевого протопласта и пыльцевой трубки (рис. 2, 3, 5, 7). В протопласте обнаружено полярное распределение потенциала (рис. 2, 5). Можно предположить, что это каким-то образом связано с локализацией будущего стеночного пэчча (рис. 1), однако данный феномен нуждается в дальнейшем изучении. Ранее с помощью этого же красителя наблюдали полярное распределение потенциала на поверхности клетки нейробластомы, помещенной в электрическое поле (Gross et al., 1986). В более поздней работе установлена пространственная и временная корреляция процессов морфогенеза, индуцированного полем, с локальным включением в клетки нейробластомы кальция в месте деполаризации мембраны (Bedlack et al., 1992). Неоднородность в распределении мембранного потенциала на поверхности клеток нейробластомы была показана также в исследовании, включавшем в себя как микроэлектродные, так и оптические методы с использованием красителя Di-8-ANEPPS, подобного Di-4-ANEPPS (Zhang et al., 1998).

В пыльцевой трубке табака в диапазоне расстояний 3—20 мкм от кончика обнаружено постепенное увеличение абсолютной величины мембранного потенциала по мере удаления от кончика (рис. 7). Тем самым подтверждено высказанное ранее (Robinson, Messerli, 2003) предположение о наличии градиента потенциала в пыльцевой трубке, которое не удавалось проверить экспериментально из-за ограничений микроэлектродных методов. Зона расположения градиента потенциала примерно соответствует той области, в которой, по данным литературы, происходит возрастание интенсивности выхода из трубки протонов (Cortal et al., 2008). Поэтому можно было ожидать, что градиент потенциала в основном обусловлен неравномерной активностью H⁺-АТФазы. Активация или подавление работы этого фермента фузикокином или ванадатом влияли на распределение потенциала, вызывая локальную гипер- или деполаризацию соответственно (рис. 7). Но эти воздействия не снимали градиента. Это означает, что важную роль в его поддержании играют другие ионтранспортирующие системы плазмалеммы. Представлялось целесообразным проверить участие в этом процессе анионных каналов, поскольку ранее мы обнаружили, что блок трансмембранного выхода Cl⁻ существенно влияет на величину мембранного потенциала пыльцевого зерна и трубки, а также на прорастание пыльцевого зерна и рост трубки (Матвеева и др., 2003; Брейгина и др., 2009). Эксперименты с использованием NPPB, специфичного блокатора анионных каналов (Roberts, 2006), показали, что ингибирование активности этих каналов полностью снимает градиент потенциала (рис. 7). Таким образом, анионные каналы выступают в качестве

ключевого фактора поддержания градиента мембранного потенциала в пыльцевой трубке. Важно отметить, что нарушение градиента потенциала под действием NPPB (рис. 7) сочетается с нарушением компартиментализации цитоплазмы (Брейгина и др., 2009), которая лежит в основе полярного роста (Cheung, Wu, 2007). Однако нужны дополнительные исследования для установления причинно-следственных связей между этими явлениями и выяснения последовательности событий, итогом которой является остановка роста.

Использование оптических методов анализа изменений мембранного потенциала в настоящей работе позволило установить, что активация пыльцевого зерна (при подготовке к прорастанию или после удаления клеточной стенки) сопровождается гиперполяризацией плазмалеммы. Наряду с этим выявлено полярное распределение величины мембранного потенциала на поверхности пыльцевого протопласта и трубки. Тем самым дополнены данные микроэлектродных исследований о неоднородном распределении трансмембранных ионных токов и подтверждены представления о биоэлектрической регуляции прорастания пыльцевого зерна и роста трубки (Holdaway-Clarke, Hepler, 2003; Hepler et al., 2006; Michard et al., 2009). В то же время мы показали, что анионные каналы играют важную роль в поддержании градиента мембранного потенциала в растущей трубке. Это хорошо согласуется с данными о существовании в ней локальных входных и выходных потоков Cl⁻ (Zonia et al., 2002). Однако согласно нашим данным, функции этих потоков не ограничиваются регуляцией клеточного объема (Zonia et al., 2002), на первый план выходит участие Cl⁻ в регуляции мембранного потенциала.

Сопоставление прорастающего пыльцевого зерна с другими объектами исследований ионной регуляции роста и развития клеток позволяет выявить некоторые общие закономерности. Примеры гиперполяризации плазматической мембраны в процессе клеточной дифференцировки и морфогенеза можно найти в исследованиях как растительных (Kropf, 1992), так и животных (Zhang et al., 1998) клеток. Недавно на примере ствольных клеток было установлено, что гиперполяризация плазмалеммы предшествует клеточной дифференцировке и запускает ее (Sundelacruz et al., 2008). Неоднородность в распределении трансмембранных ионных токов, наличие внутриклеточных ионных градиентов и их связь с морфогенезом к концу 1980-х годов были показаны для самых разных клеток, включая растущие гифы грибов, ооциты лягушек и рыб, яйцеклетки бурых водорослей и дрозофилы и др. (Nuccitelli, 1988). Однако лишь для некоторых объектов, в числе которых клетки нейробластомы и яйцеклетка дрозофилы, удалось выявить полярное распределение мембранного потенциала (Zhang et al., 1998; Robinson, Messerli, 2003). Наши данные о распределении потенциала на поверхности протопласта дополняют результаты, полученные на других объектах с центральной симметрией, в то время как обнаружение продольного градиента потенциала в пыльцевой трубке вскрывает особенности ионной регуляции протяженных объектов в условиях полярного роста.

Участие М. А. Брейгиной и А. В. Смирновой в подготовке статьи равноценно.

Авторы выражают благодарность Д. В. Абрамочкину за помощь в решении методических вопросов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00746).

Список литературы

- Брейгина М. А., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009. Роль СГ в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Онтогенез. 40(3) : 199—207.
- Гамалей И. А., Кирпичникова К. М., Ищенко А. М., Жахов И. В., Клубин И. В. 1998. Механизм гиперполяризации плазматической мембраны макрофагов и астроцитов при активации. Цитология. 40(8/9) : 773—778.
- Матвеева Н. П., Андреюк Д. С., Ермаков И. П. 2003. Трансмембранный перенос СГ при прорастании пыльцевого зерна табака. Биохимия. 68(11) : 1550—1555.
- Матвеева Н. П., Андреюк Д. С., Лазарева Е. А., Ермаков И. П. 2004. Влияние конканавалина А на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН в процессе активации пыльцевого зерна табака *in vitro*. Физиол. раст. 51(4) : 549—554.
- Матвеева Н. П., Войцех О. О., Андреюк Д. С., Ермаков И. П. 2002. Роль Н⁺-АТФазы и альтернативной оксидазы в регуляции величины внутриклеточного рН на разных стадиях развития мужского гаметофита табака. Онтогенез. 33(6) : 436—443.
- Bedlack R. S., Wei M., Loew L. M. 1992. Localized membrane depolarizations and localized calcium influx during electric field-guided neurite growth. Neuron. 9 : 393—403.
- Brauner T., Hulser D. F., Strasser R. J. 1984. Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. Biochim. biophys. acta 771 : 208—216.
- Certal A. C., Almeida R. B., Carvalho L. M., Wong E., Moreno N., Michard E., Carneiro J., Rodriguez-Leon J., Wu H.-M., Cheung A. Y., Feijó J. A. 2008. Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. Plant Cell. 20 : 614—634.
- Cheung A. Y., Wu H.-M. 2007. Structural and functional compartmentalization in pollen tubes. J. Exp. Bot. 58 : 75—82.
- Cheung A. Y., Wu H.-M. 2008. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. Annu. Rev. Plant Biol. 59 : 547—572.
- Dutta R., Robinson K. R. 2004. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts. Plant Physiol. 135 : 1398—1406.
- Emri M., Balkay L., Krasznai Z., Trón L., Márián T. 1998. Wide applicability of a flow cytometric assay to measure absolute membrane potentials on the millivolt scale. Eur. Biophys. J. 28 : 78—83.
- Fan L.-M., Wang Y.-F., Wu W.-H. 2003. Outward K⁺ channels in *Brassica chinensis* pollen protoplasts are regulated by external and internal pH. Protoplasma. 220 : 143—152.
- Feijó J. A., Malhó R., Obermeyer G. 1995. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth. Protoplasma. 187 : 155—167.
- Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Klyubin I. V. 1998. Superoxide release is involved in membrane potential changes in mouse peritoneal macrophages. Free Rad. Biol. Med. 24 : 168—174.
- Gross D., Loew L. M., Webb W. W. 1986. Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electrical fields. Biophys. J. 50 : 339—348.
- Haugland R. P. 2005. The handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Eugene: OR, Molecular Probes Inc. 1126 p.
- Hepler P. K., Lovy-Wheeler A., McKenna S., Kunkel J. G. 2006. Ions and pollen tube growth. In: The pollen tube. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 47—69.
- Heslop-Harrison J. 1987. Pollen germination and pollen tube growth. Int. Rev. Cytol. 107 : 1—78.
- Holdaway-Clarke T. L., Hepler P. K. 2003. Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. New Phytologist. 159 : 539—556.
- Iwano M., Shiba H., Miwa T., Che F.-S., Takayama S., Nagai T., Miyawaki A., Isogai A. 2004. Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 136 : 3562—3571.
- Johnson I. 1998. Fluorescent probes for living cells. Histochem. J. 30 : 123—140.
- Kroh M., Knuiman B. 1985. Exocytosis in non-plasmolyzed and plasmolyzed tobacco pollen tubes. A freeze-fracture study. Planta. 166 : 287—299.
- Kropf D. L. 1992. Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. Microbiol. Rev. 56 : 316—339.
- Loew L. M. 1996. Potentiometric dyes: imaging electrical activity of cell membranes. Pure & Appl. Chem. 68 : 1405—1409.
- Malhó R., Read N. D., Trewavas A. J., Pais M. S. 1995. Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. The Plant Cell. 7 : 1173—1184.
- Messerli M. A., Smith P. J. S., Lewis R. C., Robinson K. R. 2004. Chloride fluxes in lily pollen tubes: a critical reevaluation. Plant J. 40 : 799—812.
- Michard E., Alves F., Feijó J. A. 2009. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. Int. J. Develop. Biol. 52 : 2296.
- Montana V., Farkas D. L., Loew L. M. 1989. Dual wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. Biochemistry. 28 : 4536—4539.
- Mouline K., Very A.-A., Gaymard F., Boucherez J., Pilot G., Devic M., Bouchez D., Thibaud K.-B., Sentenac H. 2002. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. Genes & Develop. 16 : 339—350.
- Nuccitelli R. 1988. Ionic currents in morphogenesis. Experientia. 44 : 657—666.
- Obermeyer G., Blatt M. R. 1995. Electrical properties of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*: characteristics of the non-germinating pollen grain. J. Exp. Bot. 46 : 803—813.
- Plašek J., Sigler K. 1996. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 33 : 101—124.
- Roberts S. K. 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. New Phytol. 169 : 647—666.
- Robinson K. R., Messerli M. A. 2003. Left/right, up/down: the role of endogenous electrical fields as directional signals in development, repair and invasion. BioEssays. 25 : 759—766.
- Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D. L. 2008. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PLoS ONE. 3 (11) : e3737.
- Tanaka I., Kitazume C., Ito M. 1987. Isolation and culture of lily pollen protoplasts. Plant Sci. 50 : 205—211.
- Taylor L. P., Hepler P. K. 1997. Pollen germination and tube growth. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48 : 461—491.
- Weisenseel M. H., Nuccitelli R., Jaffe L. F. 1975. Large electrical currents traverse growing pollen tubes. J. Cell Biol. 9 : 556—567.
- Weisenseel M. H., Wenisch H. H. 1980. The membrane potential of growing lily pollen. J. Plant Physiol. 99 : 313—323.
- Zhang J., Davidson R. M., de Wei M., Loew L. M. 1998. Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. Biophys. J. 74 : 48—53.
- Zhao J., Mollet J.-C., Lord E. M. 2004. Lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen protoplast adhesion is increased in the presence of the peptide SCA. Sex Plant Reprod. 16 : 227—233.
- Zonia L., Cordeiro S., Tupy J., Feijó J. A. 2002. Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3, 4, 5, 6-tetrakisphosphate. Plant Cell. 14 : 2233—2249.

MEMBRANE POTENTIAL CHANGES DURING POLLEN GERMINATION AND TUBE GROWTH

*M. A. Breygina,¹ A. V. Smirnova, N. P. Matveeva, I. P. Yermakov*Moscow State University, School of Biology, Moscow;
¹e-mail: pollen-ions@rambler.ru

We applied quantitative fluorescent microscopy to study membrane potential alterations during pollen germination and in growing pollen tube. Two voltage-sensitive dyes were applied: DiBAC₄(3) was used to detect average membrane potential values in pollen grains and isolated protoplasts; Di-4-ANEPPS gave an option of membrane potential mapping on pollen protoplast and pollen tube surfaces. We have found out that tobacco pollen grain activation is accompanied by hyperpolarization of the vegetative cell plasma membrane by about 8 mV. Lily pollen protoplasts were significantly hyperpolarized (–108 mV) with respect to the pollen grains (–23 mV) from which they were isolated. We found polar distribution of the membrane potential along the protoplast surface, and longitudinal potential gradient along the pollen tube. In the presence of plasma membrane H⁺-ATPase inhibitor, sodium orthovanadate (1 mM) or its activator fusicoccin (1 μM), the longitudinal voltage gradient altered but did not disappear. Anion channel blocker, NPPB (40 μM), fully discarded the gradient in pollen tubes. Obtained results give evidence of the plasma membrane hyperpolarization during pollen germination and uneven potential distribution on pollen grain and tube surfaces. Inhibitory analysis showed involvement of the plasma membrane H⁺-ATPase and anion channels in membrane potential regulation.

K e y w o r d s: membrane potential, pollen germination, polar growth.