

РЕГУЛЯЦИЯ ИОННОГО ТРАНСПОРТА НА ПЛАЗМАЛЕММЕ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

© Н. М. Максимов,^{1,*} М. А. Брейгина,^{1,2} И. П. Ермаков¹

¹ Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119991,

и ² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, 117997;

* электронный адрес: ntmaksimow@gmail.com

Полярный рост пыльцевой трубки — ключевой этап жизненного цикла семенных растений, от которого зависит успех половой репродукции. Одним из важнейших компонентов этого процесса является четко скоординированный во времени и пространстве транспорт ионов через плазматическую мембрану. В регуляции трансмембранного ионного транспорта участвуют различные классы сигнальных молекул, включая, по последним данным, активные формы кислорода (АФК). В настоящей работе, используя в качестве модельной системы субпротопласты, выделенные из пыльцевых трубок, мы показали, что пероксид водорода может быть регулятором двух мишеней на плазматической мембране — нифедипин-чувствительных Ca^{2+} -каналов и ион-транспортных систем, контролируемых мембранным потенциалом. В результате действия пероксида водорода на эти мишени происходили увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и гиперполяризация плазматической мембраны. Одним из следствий увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} было ускорение регенерации клеточной стенки.

Ключевые слова: полярный рост, пыльцевая трубка, протопласт, мембранный потенциал, Ca^{2+} , АФК, пероксид водорода.

Принятые сокращения: DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндолил, di-4-ANEPPS — пиридиний-4-(2-(6-(дибутиламино)-2-нафталил)этилен)-1-(3-сульфопропил)-гидроксид, DiBAC4(3) — бис-(1,3-дибутилбарбитуровая кислота) триметиноксанол, DPI — дифенилениодоний.

Пыльцевая трубка — широко используемый модельный объект для изучения механизмов полярного клеточного роста (Rounds, Bezanilla, 2013). Прорастание пыльцевого зерна на рыльце пестика и дальнейший направленный рост пыльцевой трубки обеспечивают доставку спермиев к женскому гаметофиту, контролируя успех полового размножения в целом. Важная роль ионного транспорта в поддержании полярного роста убедительно доказана (Herper et al., 2006). Трансмембранные токи ряда ионов (Ca^{2+} , H^+ , K^+ и Cl^-/NO_3^-) необходимы для поддержания полярности, мембранного потенциала, тургора, везикулярного транспорта, функционирования цитоскелета и полярного распределения органелл (Michard et al., 2009).

В последние годы накапливаются убедительные данные об участии активных форм кислорода (АФК) в полярном росте, однако их роль изучена недостаточно. Пероксид водорода (H_2O_2) является относительно стабильной нерадикальной и незаряженной формой, благодаря чему проникает через биологические мембраны. Это свойство определяет сложный характер субклеточного распределения H_2O_2 (Petrov, Breusegem, 2012). Одновременно с этим концентрация H_2O_2 может быстро меняться во времени благодаря изменению баланса его продукции и ликвидации (Demidchik, 2014). Предполагается, что эти

особенности делают H_2O_2 универсальной сигнальной молекулой, обеспечивающей передачу как внутриклеточных, так и межклеточных сигналов (Mittler et al., 2004).

На поверхности пыльцевого зерна и трубки НАДФН-оксидаза плазмалеммы генерирует $O_2^{\cdot -}$, который быстро дисмутирует с образованием H_2O_2 (Potocky et al., 2007). Также предполагается, что в продукции АФК участвуют митохондрии, однако их вклад изучен недостаточно (Rounds et al., 2011). Показано, что эндогенное образование АФК необходимо для успешного прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки *in vitro*. Высокие концентрации DPI (ингибитора НАДФН-оксидазы) и таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота и Mn-TMPP, подавляют прорастание пыльцевых зерен (Смирнова и др., 2009; Smirnova et al., 2013). Блокирование НАДФН-оксидазы с помощью DPI или антисмысловой олигонуклеотида существенно снижает скорость роста пыльцевых трубок, однако при добавлении H_2O_2 рост восстанавливается (Potocky et al., 2007).

В то же время показано накопление АФК в рыльцах многих видов из разных таксономических групп при подготовке к опылению, при этом основной формой является H_2O_2 (McInnis et al., 2006). Особенно высока концентрация H_2O_2 в папиллах рыльца, на которых происходит прорастание пыльцы *in vivo*. Одна из гипотез предполагает,

что внеклеточные АФК могут функционировать не только как эндогенный регулятор, но и в качестве межклеточного сигнала между женскими тканями и мужским гаметофитом. Подобный механизм был описан для завершающей стадии роста пыльцевой трубки: локальный максимум АФК в зародышевом мешке индуцирует разрыв трубки и высвобождение спермиев, а в его отсутствие трубка продолжает расти после входа в женский гаметофит (Duan et al., 2014). Таким образом, мы можем заключить, что H_2O_2 и другие АФК, продуцируемые женскими тканями или НАДФН-оксидазой мужского гаметофита, могут выступать в качестве регуляторов протамной фазы оплодотворения на различных стадиях.

Изучение механизмов влияния АФК на репродуктивные процессы в растениях началось в самое последнее время (Wudick, Feijo, 2014), в основном с использованием мутантов *Arabidopsis* по генам НАДФН-оксидазы и выходящих регуляторных белков, таких как протеинкиназа ANXUR. Было показано, что у этих мутантов нарушается продукция АФК как *in vitro*, так и на рыльце (Boisson-Dernier et al., 2013; Kaya et al., 2014), изменяются динамика роста, везикулярного транспорта и отложения клеточной стенки (Boisson-Dernier et al., 2013; Lassig et al., 2014), а также внутриклеточная динамика Ca^{2+} и токи K^+ (Lassig et al., 2014). В совокупности эти данные указывают на важную роль эндогенных АФК в регуляции как ион-транспортных процессов на плазмалемме, так и цитоплазматических механизмов, обеспечивающих поддержание полярного роста пыльцевой трубки. Однако поскольку у пыльцевых трубок мутантов наблюдаются замедленный рост и многочисленные цитологические нарушения, не представляется возможным различить первичные эффекты АФК и их многочисленные последствия. Для выявления конкретных мишеней, ответственных за восприятие и передачу АФК-сигнала, требуется изучение действия H_2O_2 на плазматическую мембрану в более простой системе, чем интактные пыльцевые трубки.

В соответствии с этим в задачи настоящей работы входило выявление мембранных эффектов H_2O_2 , а также связанных с ними цитоплазматических эффектов. В качестве модельного объекта использовали субпротопласты, выделенные из пыльцевых трубок табака. Ключевым компонентом системы поддержания баланса АФК является клеточная стенка, поэтому использование протопластов позволило действовать H_2O_2 в низких концентрациях непосредственно на плазматическую мембрану.

Материал и методика

Растительный материал и выделение протопластов. Растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1 выращивали в климатической камере в контролируемых условиях (25 °С, 16-часовой световой день) в вермикулите, поливали раствором минеральных солей (Nitsch, 1965). Пыльники извлекали из цветков накануне раскрытия и высушивали в термостате (25 °С) в течение 3 сут. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при -20 °С. Навески сухой пыльцы инкубировали во влажной камере при 25 °С в течение 2 ч, после чего использовали для проращивания и последующего выделения протопластов.

Пыльцевые зерна проращивали в чашках Петри в стандартной среде при 25 °С в течение 1 ч. Пыльцевые трубки осаждали однократным центрифугированием

(1 мин, 3300 g), переносили в гипертоническую среду с ферментами и инкубировали в течение 1 ч при 29 °С. По окончании выделения суспензию протопластов отмывали от ферментов и фрагментов клеточной стенки (два цикла центрифугирования по 30 с при 600 g и ресуспендирование в гипертонической среде без ферментов). Полученную суспензию использовали для дальнейших исследований.

Реактивы. Целлюлаза *Trichoderma viride* (MP Bio-medicals, США), пектиназа *Aspergillus niger* (Sigma, США), Calcofluor White M2R или Tinopal (MP Biomedicals, США), пероксид водорода (Panreac, Испания), di-4-ANEPPS, DiBAC₄(3), Fluo-3-AM, Pluronic F-127 (Molecular probes, Нидерланды), нифедипин (Sigma, США).

Состав питательных сред. Стандартная среда: 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 MES-Tris-буфере, pH 5.8. Гипертоническая среда для выделения протопластов из пыльцевых трубок табака имела солевой состав, аналогичный стандартной среде, к которому добавляли 0.7 М сахарозы, 0.7 М маннитола, 2 % целлюлазы *T. viride* и 1 % пектиназы *A. niger*.

Цитологическая характеристика субпротопластов. Для контроля процедуры выделения протопластов использовали краситель Tinopal, связывающийся с целлюлозой и другими β-глюканами клеточной стенки. Окрашивание проводили в течение 5 мин, рабочая концентрация красителя составляла 10^{-2} мг/мл, после окрашивания проводили однократную отмывку. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI, связывающийся с АТ-обогащенными участками ДНК. Окрашивание проводили в течение 5 мин, конечная концентрация красителя составляла 10^{-3} мг/мл.

Измерение мембранного потенциала. Для определения абсолютной величины мембранного потенциала в популяции протопластов использовали медленный краситель DiBAC₄(3) (Брейгина и др., 2009б). Для изучения динамики изменения мембранного потенциала в индивидуальных протопластах использовали быстрый краситель di-4-ANEPPS (Брейгина и др., 2009б). Для окрашивания di-4-ANEPPS протопласты ресуспендировали в гипертонической среде, содержащей 2 мкМ красителя. К окрашенной суспензии на предметном стекле добавляли гипертоническую среду (в контроле) или H_2O_2 (конечная концентрация в капле 10 мкМ) и немедленно микроскопировали в режиме покадровой съемки с интервалом 30 с. Окрашивание клеток (как живых, так и фиксированных) DiBAC₄(3) проводили при 25 °С в течение 10 мин одновременно с воздействием H_2O_2 . Конечная концентрация красителя составляла 5 мкМ. Расчет значений потенциала проводили стандартным методом с использованием деполяризованного контроля (Брейгина и др., 2009б).

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Субпротопласты инкубировали в гипертонической среде, содержащей 10 мкМ Fluo-3 AM и 0.1 % Pluronic F-127, в течение 30 мин при 37 °С (Qu et al., 2012). Затем субпротопласты отмывали от красителя (центрифугирование 30 с при 600 g и ресуспендирование в гипертонической среде без красителя) и проводили постинкубацию в течение 30 мин при 25 °С. К суспензии окрашенных субпротопластов в капле на предметном стекле добавляли гипертоническую среду (контроль) или H_2O_2 (конечная концентрация 10 мкМ) и немедленно микроскопировали в режиме покадровой съемки с интер-

валом 30 с. Для ингибирования Ca^{2+} -каналов окрашенные субпротопласты за 10 мин до действия H_2O_2 обрабатывали нифедипином в концентрации 100 мкМ.

Оценка регенерации клеточной стенки. Для регенерации клеточной стенки протопласты инкубировали в течение 20 ч в гипертонической среде без ферментов при 25 °С. По окончании инкубации окрашивали Tinopal (протокол окрашивания см. выше).

Микроскопия и компьютерный анализ изображений. Использовали микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, снабженный соответствующими блоками светофильтров, ртутной лампой и цифровой камерой AxioCam HRc (Zeiss, Германия). Применяли следующие блоки светофильтров: возбуждение флуоресценции в диапазоне длин волн 359—371 нм и регистрация эмиссии при длинах волн более 397 нм (Calcofluor White M2R и DAPI), возбуждение в диапазоне длин волн 475—495 нм и регистрация в диапазоне 515—565 нм (DiBAC₄(3)), возбуждение в интервалах 450—490 и 540—552 нм, а регистрация при длинах волн более 515 и 590 нм соответственно (di-4-ANEPPS).

Для количественной обработки изображений использовали пакет приложений AxioVision (Zeiss, Германия). Для оценки внутриклеточной концентрации Ca^{2+} измеряли среднее значение флуоресценции Fluo-3 на фиксированной площади в центре субпротопласта, избегая при мембранной области и участков, содержащих вакуоли. Измерение флуоресценции DiBAC₄(3) проводили аналогичным образом. Для изучения динамики мембранного потенциала с использованием di-4-ANEPPS измеряли флуоресценцию плазматической мембраны при возбуж-

дении в синей (Fb) и зеленой (Fg) областях, после чего находили отношение этих величин. Поскольку, как было показано ранее, значения потенциала варьируют на разных участках поверхности протопластов (Брейгина и др., 2009б), использовали отношение, усредненное по четырем точкам.

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

Результаты

Цитологическая характеристика субпротопластов. Выделенные из пыльцевых трубок табака субпротопласты были охарактеризованы с использованием ряда общепринятых методов. Средний диаметр субпротопластов составлял 24.9 ± 0.3 мкм ($n = 59$) (рис. 1, а). Для подтверждения успешного выделения протопластов материала клеточной стенки их окрашивали Tinopal (рис. 1, а, б). Окрашивание DAPI показало, что в выделенных субпротопластах отсутствуют ядро вегетативной клетки и генеративная клетка. Таким образом, выделенные субпротопласты представляют собой цитопласты (рис. 1, в, г).

Пероксид водорода вызывает гиперполяризацию плазмалеммы. Для измерения динамики мембранного потенциала использовали флуоресцентный краситель di-4-ANEPPS. При окрашивании субпротопластов di-4-ANEPPS четко выявлялась плазмалемма и не происходило интернализации красителя. Отношение Fb/Fg, являющееся показателем величины мембранного потенциала, совпадало с ранее измеренным отношением для пыльцевых трубок и составляло в среднем 1.8. После добавления H_2O_2 в конечной концентрации 10 мкМ происходило снижение отношения Fb/Fg, говорящее о гиперполяризации мембраны; в контроле величина Fb/Fg была стабильна во времени (рис. 2, а). Достоверное различие Fb/Fg в контроле и при действии H_2O_2 выявляется через 3 мин ($P < 0.01$), что указывает на установление более отрицательного потенциала.

Для выявления действия H_2O_2 на абсолютные значения мембранного потенциала в популяции протопластов использовали флуоресцентный краситель DiBAC₄(3). Можно видеть физиологическую гетерогенность популяции по величине этого показателя как в контроле, так и под действием H_2O_2 . Однако после 10-минутной инкубации в среде, содержащей 10 мкМ H_2O_2 , происходит смещение потенциала в сторону более отрицательных значений (рис. 2, б). Таким образом, сдвиг потенциала в сторону отрицательных значений обнаружен двумя независимыми методами.

H_2O_2 активирует нифедипин-чувствительные Ca^{2+} каналы и увеличивает $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ (внутриклеточную концентрацию кальция). С применением количественной флуоресцентной микроскопии было выявлено увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при действии 10 мкМ H_2O_2 (рис. 3). Подъем $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ был достаточно быстрым, достоверное повышение регистрировалось уже через 3 мин. Максимум достигался через 7.5 мин. При этом ингибитор Ca^{2+} -каналов нифедипин полностью блокировал наблюдаемую динамику: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ оставалась на уровне контроля.

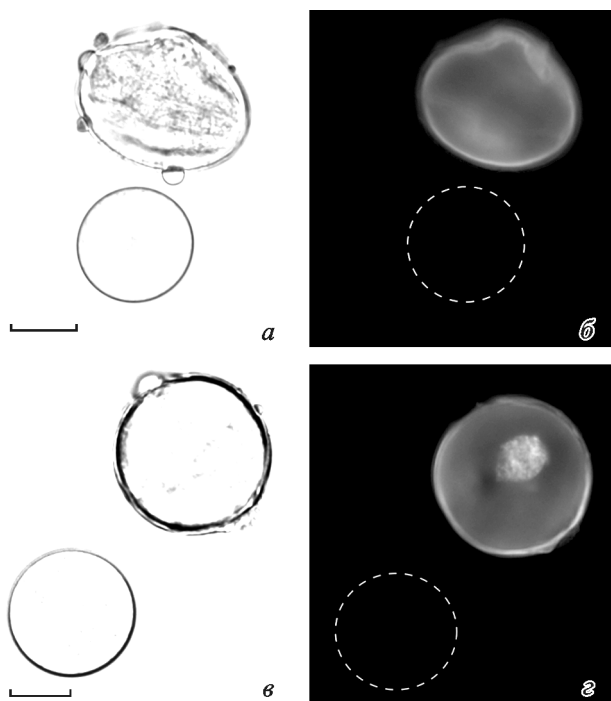


Рис. 1. Цитологическая характеристика субпротопластов из пыльцевых трубок табака.

а — субпротопласт лежит рядом с экзиной; б — тот же кадр в свете флуоресценции, окрашивание Tinopal: видно отсутствие клеточной стенки у протопласта, экзина флуоресцирует; в — субпротопласт лежит рядом с пыльцевым зерном; г — тот же кадр в свете флуоресценции, окрашивание DAPI: субпротопласт лишен ядер, в пыльцевом зерне виден ядерный материал. Масштабные отрезки — 10 мкм.

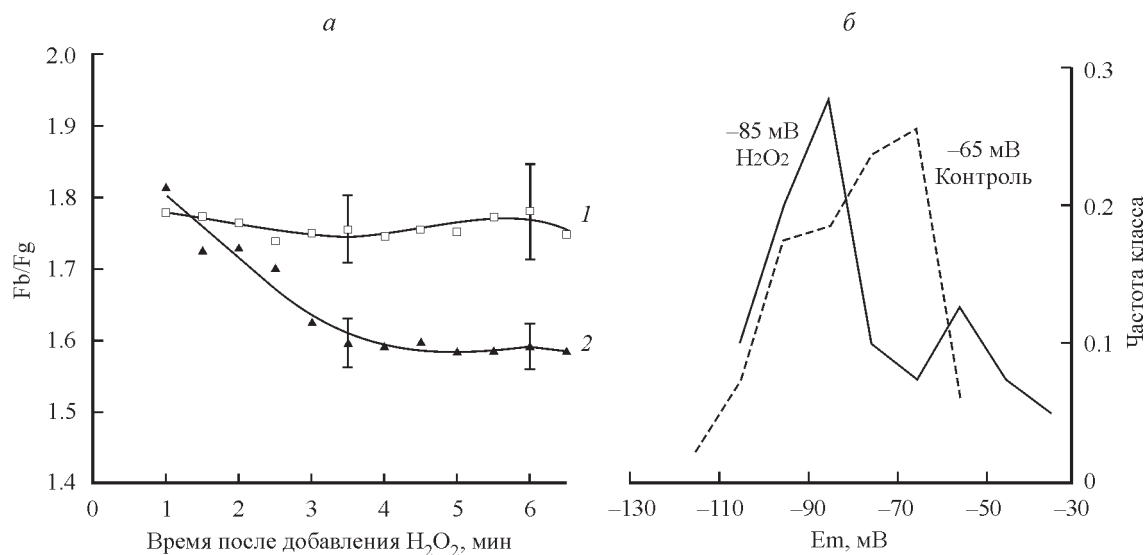


Рис. 2. Изменение мембранного потенциала субпротопластов под действием пероксида водорода.

a — динамика мембранного потенциала в контроле (1) и после добавления 10 мкМ H_2O_2 (2), окрашивание di-4-ANEPPS. Снижение значения F_b/F_g говорит о гиперполяризации плазмалеммы после добавления H_2O_2 . *б* — распределение субпротопластов по величине мембранного потенциала (E_m) в контроле (штриховая линия) и после 10-минутной инкубации субпротопластов с 10 мкМ H_2O_2 , окрашивание DiBAC₄(3) (сплошная линия). H_2O_2 вызывает смещение потенциала в сторону более отрицательных значений.

Это показывает, что H_2O_2 -индуцированный вход Ca^{2+} происходит через нифедипин-чувствительные Ca^{2+} -каналы плазмалеммы.

Пероксид водорода стимулирует регенерацию клеточной стенки. В качестве теста на физиологическую активность протопластов использовали окрашивание Tinopal, маркирующее отложение материала клеточной стенки. Протопласты регенерируют клеточную стенку примерно за 1 сут. На рис. 4 представлены различные паттерны отложения стенки: регенерировавшие стенку по всей поверхности (*a*), имеющие отдельные пэтки клеточной стенки (*б*) и не имеющие клеточной стенки (*в*). В контрольной суспензии через 20 ч инкубации встречались все варианты, причем третья категория составляла в среднем 20 %. В присутствии H_2O_2 отложение полимеров происходило быстрее: через 20 ч все протопласты, которые инкубировались в присутствии H_2O_2 , построили стенку, а третья категория составляла не более 2 %.

Чтобы проверить, опосредован ли этот эффект действием H_2O_2 на Ca^{2+} -каналы, мы наблюдали регенерацию в присутствии блокатора каналов нифедипина. Оказалось, что нифедипин снижает скорость регенерации практически до контрольного уровня (рис. 4, *з*). Таким образом, влияние H_2O_2 на синтез клеточной стенки опосредовано входом Ca^{2+} через нифедипин-чувствительные каналы.

Обсуждение

Субпротопласты из пыльцевых трубок представляют собой фрагменты вегетативной клетки, не содержащие ядер, и генеративные клетки, изолированные на стадии полярного роста. При ферментативной обработке они отщипываются преимущественно от апикальной части трубки. Таким образом, этот объект может служить моделью для изучения действия экзогенных веществ на плазмалемму пыльцевой трубки без посредничества кле-

точной стенки. В реализации ответа могут участвовать как компоненты плазмалеммы (например, транспортные белки), так и компоненты цитоплазмы (везикулярный транспорт, цитоскелет, митохондрии), однако система является упрощенной за счет отсутствия ядерного аппарата и внеклеточного матрикса.

С использованием этой модели мы обнаружили два мембранных эффекта H_2O_2 — активацию кальциевых каналов, обеспечивающую вход Ca^{2+} в цитоплазму, и гиперполяризацию плазмалеммы. Следует отметить, что мы использовали низкую концентрацию H_2O_2 — 10 мкМ, ко-

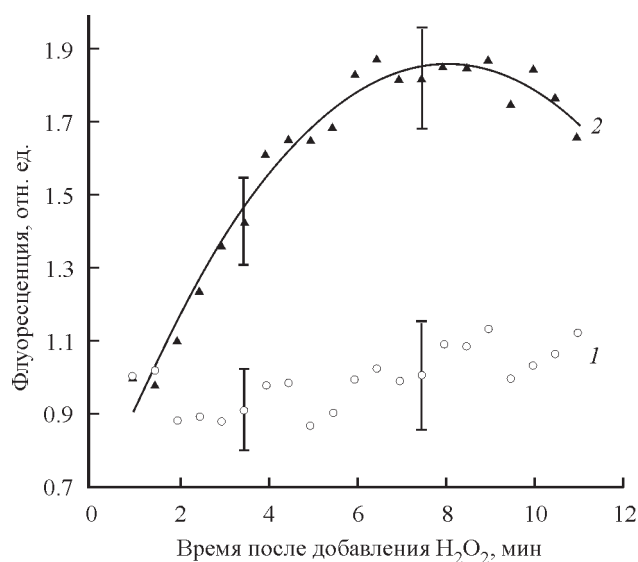


Рис. 3. Динамика интенсивности флуоресценции Fluo-3, отражающая изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_{in}$).

Под действием 10 мкМ H_2O_2 (кривая 2) происходит значительное повышение $[Ca^{2+}]_{in}$; в присутствии блокатора кальциевых каналов нифедипина его содержание не изменяется (кривая 1). Представленные значения интенсивности флуоресценции нормированы к контрольным значениям.

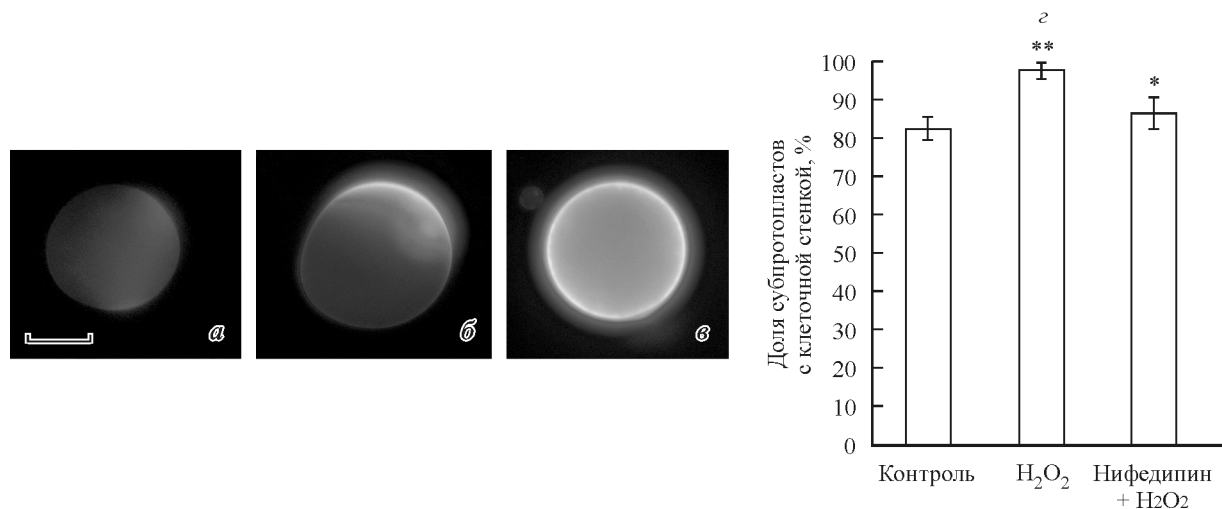


Рис. 4. Регенерация клеточной стенки субпротопластов после 20-часовой инкубации с H₂O₂.

Различные паттерны отложения клеточной стенки, представленные в суспензии: а — отложения отсутствуют, б — отдельные пэтки клеточной стенки, в — полная стенка, г — активация регенерации под действием 10 мкМ H₂O₂ и снятие этого эффекта в присутствии ингибитора кальциевых каналов нифедипина. Масштабный отрезок — 10 мкм.

торая не вызывает окислительного стресса. Для сравнения скажем, что в другой работе с пыльцевыми трубками для сдвига АФК-баланса использовали концентрации H₂O₂ на 3 порядка выше той, которая оказалась эффективной в наших экспериментах (Lassig et al., 2014).

Связь между Ca²⁺ и H₂O₂ в пыльцевых трубках ранее была установлена косвенным методом: при изучении внутриклеточной динамики Ca²⁺ у мутантов *Arabidopsis* с нарушением функции НАДФН-оксидазы (*rboh-1* и *rboh-2*) обнаруживаются ярко выраженные осцилляции роста, приводящие к разрыву мембраны у значительной части трубок, и коррелирующие с ними всплески концентрации Ca²⁺ в цитозоле (Lassig et al., 2014). С другой стороны, известно, что Ca²⁺ регулирует активность НАДФН-оксидазы плазмалеммы (Potocky et al., 2012) и продукцию АФК в пыльцевых трубках (Potocky et al., 2007). Такая система обратной связи является весьма типичной для спорофитных клеток растений (Demidchik, 2003; Gilroy et al., 2014). В замыкающих клетках устьиц и в корневых волосках быстрый ответ на H₂O₂ и гидроксильный радикал активирует входной ток Ca²⁺ и повышение его внутриклеточной концентрации (Pei et al., 2000; Foreman et al., 2003). В корневых волосках у мутанта по НАДФН-оксидазе (*rhd-2*) слабо выражен градиент Ca²⁺ в цитоплазме, характерный для клеток с полярным ростом (Foreman et al., 2003).

Гиперполяризация плазматической мембраны под действием H₂O₂ — новый эффект, ранее связи между АФК и регуляцией потенциала установлено не было. В пыльцевой трубке за поддержание потенциала, по нашим данным, отвечают анионные каналы и H⁺-АТФаза плазмалеммы (Брейгина и др., 2009а), а также K⁺-каналы (Becker et al., 2004). Недавно было установлено, что K⁺-каналы в пыльце *Arabidopsis* проявляют чувствительность к пероксиду водорода, а также реагируют на ингибитор НАДФН-оксидазы DPI (Lassig et al., 2014). Изменение мембранного потенциала может происходить в результате модуляции входного или выходного K⁺-тока, а также активности анионных каналов или H⁺-АТФазы. Мы можем предположить, что наблюдаемый сдвиг потенциала является элементом сигнальной цепочки, изме-

няя в свою очередь активность потенциалзависимых ион-транспортных систем.

Одним из эффектов, являющихся следствием H₂O₂-индуцированных событий на плазмалемме, по всей видимости, является ускорение регенерации клеточной стенки. Этот эффект является еще одним примером тесной взаимосвязи АФК и полимерного матрикса клеточной оболочки. Такая связь ранее была убедительно показана для эскины пыльцевого зерна (Smirnova et al., 2013). В этой работе было обнаружено, что локальный баланс продукции (ликвидации) АФК определяет механические свойства клеточной стенки и как следствие — возможность пыльцевого зерна сохранять целостность и способность к прорастанию. Однако протопласт — принципиально более простая система. Общая схема регенерации клеточной стенки субпротопластами была подробно изучена на пыльце оливы (Majewska-Sawka et al., 2002): в первые часы инкубации откладываются β-глюканы, через 12 ч — пектины. β-глюканы откладываются на поверхности клетки с участием ферментов, локализованных на плазмалемме: каллозосинтазы и (или) целлюлозосинтазы.

Полученные данные указывают на то, что H₂O₂ воздействует на ферменты, синтезирующие клеточную стенку, не прямо, а опосредованно, за счет активации Ca²⁺-каналов. Активация каллозосинтазного комплекса в присутствии Ca²⁺ была показана для соматических клеток растений (Bhuja et al., 2004; Aidemark et al., 2009). Влияние Ca²⁺ на активность целлюлозосинтазного комплекса пока не изучена (Li et al., 2014). Мы можем предположить, что, вызывая вход Ca²⁺ в цитозоль, H₂O₂ влияет на целый спектр физиологических процессов, поскольку Ca²⁺ является универсальным вторичным мессенджером.

Таким образом, мы наблюдали два ключевых мембранных эффекта H₂O₂ — вход Ca²⁺ в цитозоль через нифедипин-чувствительные каналы и гиперполяризацию плазматической мембраны. Это означает, что на плазматической мембране есть мишени для H₂O₂, которые делают возможной передачу сигнала АФК. Следствием обнаруженных мембранных эффектов может быть целый спектр физиологических процессов. Одним из них является ускорение синтеза экстраклеточных полимеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31431).

Список литературы

- Брейгина М. А., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009а. Роль Cl⁻ в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Онтогенез. 40 (3) : 199—207. (Breygina M. A., Matveeva N. P., Yermakov I. P. 2009. The role of Cl⁻ in pollen germination and tube growth. Russ. J. Develop. Biol. 40 : 157—164.)
- Брейгина М. А., Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009б. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. Цитология. 51(10) : 815—823. (Breygina M. A., Smirnova A. V., Matveeva N. P., Yermakov I. P. 2009. Membrane potential changes during pollen germination and tube growth. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 : 573—582.)
- Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Полесская О. Г., Ермаков И. П. 2009. Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна. Онтогенез. 40 (6) : 425—435. (Smirnova A. V., Matveeva N. P., Polesskaya O. G., Yermakov I. P. 2009. Generation of reactive oxygen species during pollen grain germination. Russ. J. Develop. Biol. 40 : 345—353.)
- Aidemark M., Andersson C.-J., Rasmusson A. G., Widell S. 2009. Regulation of callose synthase activity *in situ* in alamethicin-permeabilized *Arabidopsis* and tobacco suspension cells. BMC Plant Biol. 9 : 27—35.
- Becker D., Geiger D., Dunkel M., Roller A., Bertl A., Latz A., Carpaneto A., Dietrich P., Roelfsema M. R. G., Voelker C., Schmidt D., Nueller-Roeber B., Czempinski K., Hedrich R. 2004. AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. PNAS. 101 : 15 621—15 626.
- Bhujra P., McLachlan K., Stephens J., Taylor G. 2004. Accumulation of 1,3-beta-D-glucans, in response to aluminum cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. Plant and Cell Physiol. 45 : 543—549.
- Boisson-Dernier A., Lituiev D. S., Nestorova A., Franck C. M., Thirugnanarajah S., Grossniklaus U. 2013. ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. PLoS Biol. 11 : e1001719; doi: 10.1371/journal.pbio.1001719.
- Demidchik V. 2014. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. Environ. Exp. Bot. 109 : 212—228.
- Demidchik V., Shabala S. N., Coutts K. B., Tester M. A., Davies J. M. 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. J. Cell Sci. 116 : 81—88.
- Duan Q., Kita D., Johnson E. A., Aggarwal M., Gates L., Wu H.-M., Cheung A. Y. 2014. Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. Nature Commun. 5 : 3129—3139.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature. 422 : 442—446.
- Gilroy S., Suzuki N., Miller G., Choi W.-G., Toyota M., Devireddy A. R., Mittler R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. Trends Plant Sci. 19 : 1—8.
- Hepler P. K., Lovy-Wheeler A., McKenna S. T., Kunkel J. G. 2006. Ions and pollen tube growth. In: The pollen tube: a cellular and molecular perspective. Berlin: Springer-Verlag. 47—69.
- 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. 2014. Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. Plant cell. 26 : 1069—1080.
- Lassig R., Gutermuth T., Bey T. D., Konrad K. R., Romeis T. 2014. Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. Plant J. 78 (1) : 94—106.
- Li S., Bashline L., Lei L., Gu Y. 2014. Cellulose synthesis and its regulation. The *Arabidopsis* book. American society of plant biologists. Danvers. 12 : e0169.
- Majewska-Sawka A., Fernandez M. C., M'rani-Alaoui M., Munster A., Rodriguez-Garcia M. I. 2002. Cell wall reformation by pollen tube protoplasts of olive (*Olea europaea* L.) : structural comparison with the pollen tube wall. Sexual Plant Reproduction. 15 : 21—29.
- McInnis S. M., Desikan R., Hancock J. T., Hiscock S. J. 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? New Phytologist. 172 : 221—228.
- 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. 53 : 1609—1622.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9 : 490—498.
- Nitsch J. P. 1965. Deux espaces photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. Bull. Bot. France. 112 : 517—522.
- Pei Z. M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G. J., Grill E., Schroeder J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature. 406 : 731—734.
- Petrov V. D., van Breusegem F. 2012. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. AoB Plants. 14 : 1—13.
- Potocky M., Jones M. A., Bezvoda R., Smirnov N., Zarsky V. 2007. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. New Phytologist. 174 : 742—751.
- Potocky M., Pejchar P., Gutkowska M., Jimenez-Quesada M. J., Potocka A., Alche J. de D., Kost B., Zarsky V. 2012. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. J. Plant Physiol. 169 : 1654—1663.
- Qu H., Jiang X., Sho Z., Liu L., Zhang S. 2012. Fast loading ester fluorescent Ca²⁺ and pH indicators into pollen of *Pyrus pyrifolia*. J. Plant Res. 125 : 185—195.
- Rounds C. M., Bezanilla M., 2013. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. Ann. Rev. Plant Biol. 64 : 243—265.
- Rounds C. M., Winship L. J., Hepler P. K. 2011. Pollen tube energetics: respiration, fermentation and the race to the ovule. AoB Plants. 19 : 1—14.
- Smirnova A. V., Matveyeva N. P., Yermakov I. P. 2013. Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cyto-mechanics. Plant Biol. 16 : 252—257.
- Wudick M. M., Feijo J. A. 2014. At the intersection: merging Ca²⁺ and ROS signaling pathways in pollen. Mol. Plant. 7 : 1595—1597.

PLASMALEMMA ION TRANSPORT IN POLLEN TUBES IS REGULATED
BY HYDROGEN PEROXIDE*N. M. Maksimov*^{1,*} *M. A. Breygina*^{1,2} *I. P. Yermakov*¹¹ Moscow State University, School of Biology, Moscow, 119991,
and ² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997;
* e-mail: nmmaksimow@gmail.com

Pollen tube growth is a key step in the life cycle of seed plants, which defines the success of sexual reproduction. One of the most important contributions to this process is made by ion transport through plasmalemma, which is tightly coordinated in time and space. Different classes of signaling molecules are involved in the regulation of transmembrane ion transport including reactive oxygen species as it has been recently demonstrated. Here, using subprotoplasts isolated from pollen tubes, we have demonstrated a connection between hydrogen peroxide, on one side, and two groups of targets on the plasma membrane, on the other side: nifedipine-sensitive Ca²⁺-permeable channels and transport systems controlling membrane potential. H₂O₂ interaction with these targets causes the increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration and plasmalemma hyperpolarization. One of the consequences of target modification was acceleration of cell wall regeneration.

Key words: Ca²⁺ signalling, hydrogen peroxide (H₂O₂), membrane potential, polarized cell growth, pollen, protoplast, reactive oxygen species (ROS).
