

КОВАЛЕВА Л.В., ЗАХАРОВА Е.В., МИНКИНА Ю.В., ТИМОФЕЕВА Г.В.

*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук,
Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru*

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ И РОСТА МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА *IN VITRO*

Прорастание и рост мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения требуют пространственной и временной координации многих событий, включая организацию элементов цитоскелета, ионные потоки, траффик везикул, экзоцитоз, эндоцитоз и др. Регуляторные механизмы гаметофитно-спрофитных взаимодействий, контролирующих эту сложную цепь событий в системе пыльца-пестик, пока не установлены, хотя и активно исследуются (Franklin-Tong, 1999; Lord and Russell, 2002). К настоящему времени установлено, что прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в значительной степени регулируется транспортом ионов K^+ и Ca^{2+} через их плазматическую мембрану (Feijo et al., 2001; Dearnaley et al., 1997; Geitmann, Cresti, 1998; Fan et al., 2001). Результаты, полученные в ходе таких исследований, демонстрируют важную роль транспорта основных физиологически важных ионов через плазмалемму клеток пыльцевого зерна в регуляции прорастания мужского гаметофита. Кроме того, получены данные об участии фитогормонов (этилена, АБК, гиббереллинов и цитокининов) в регуляции межклеточных взаимодействий при прорастании пыльцы на поверхности рыльца и росте пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика петунии (Kovaleva & Zakharova, 2003; Ковалева и др., 2005). Показано, что прорастание пыльцевых зерен на поверхности рыльца и рост пыльцевых трубок в тканях столбика после самосовместимого и самонесовместимого опыления протекают в условиях, которые характеризуются различным уровнем эндогенных фитогормонов в спорофитных тканях пестика и сопровождаются сложными перестройками в гормональной системе двух его частей, рыльца и столбика.

Возможность изучения функций и механизмов действия отдельных фитогормонов в регуляции гаметофитно - спорофитных взаимодействий *in vivo* сильно ограничена из-за сложности самой системы пыльца-пестик и предусматривает использование более простых, модельных систем. На модельной системе, *in vitro* прорастающих пыльцевых зернах петунии (*Petunia hybrida* L.), мы исследовали динамику эндогенного содержания фитогормонов и влияние экзогенных фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок, а также провели ряд экспериментов для проверки гипотезы о том, что механизмы трансдукции гормональных сигналов в данной системе могут базироваться на транзиторных сдвигах параметров ионного гомеостаза пыльцевых зерен.

Материалы и методы

Исследования проводили на пыльце, собранной со зрелых цветков петунии (*Petunia hybrida* L.). Растения выращивали в почвенной культуре при естественном освещении (16-часовой фотопериод) в оранжерее. Для прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок их культивировали в термостатируемых условиях при 25-26⁰С на среде, содержащей 15% сахарозы и 0.01 % борной кислоты. По количеству проросших пыльцевых зерен из двухсот, произвольно отобранных и визуально наблюдаемых в четырех полях микроскопа, судили о степени их прорастания. Длину пыльцевых трубок измеряли с помощью микроскопа с окуляр-микрометром при 150-кратном увеличении. В каждом варианте опыта оценивали длину 100 проросших пыльцевых трубок в шести повторностях.

Содержание свободных форм эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК и цитокининов (сумма зеатина, зеатинрибозида и дигидрозеатина)) в прорастающих *in vitro* пыльцевых трубках петунии определяли в течение 8 ч их культивирования. Образцы фиксировали жидким азотом, лиофильно высушивали и анализировали методом ВЭЖХ в одной навеске (Скоробогатова и др., 1999).

В экспериментах по тестированию действия экзогенных аналогов фитогормонов (ИУК, ГКЗ, АБК и 6-БАП) на прорастание и рост мужского гаметофита *in vitro* указанные соединения вносили в среду культивирования пыльцевых трубок перед началом опыта.

Индикатором рН_c служили флуоресцеин диацетат и *бис*-карбоксифлуоресцеин диацетат. Как липид-растворимые эфиры эти соединения способны проникать через плазматическую мембрану внутрь клеток и превращаться в цитозоле в результате отщепления от них ацетильных групп под действием цитозольной эстеразы соответственно во флуоресцеин и *бис*-карбоксифлуоресцеин. Как заряженные флуорофоры они остаются локализованными в цитозоле и характеризуются выраженной рН-зависимостью спектров возбуждения и флуоресценции. На основании измерений интенсивности флуоресценции образцов при 530 нм, возбуждаемой при 440 (F₄₄₀) и 490 (F₄₉₀) нм, рассчитывали величину F₄₉₀/F₄₄₀ как меру рН_c. Пыльцевые зерна инкубировали в течение 15 мин в среде загрузки, содержащей 0, 3 М сахарозу, 25 мМ MES-Трис (рН 6, 9) и 5 мкМ рН-индикатора, отмывали их от нее и помещали в 1 мл буферной среды того же состава. Измерения флуоресценции образцов проводили на спектрофотометре Hitachi-850 (Япония) в стандартных 1 см-кюветах и без перемешивания суспензии пыльцевых зерен в ходе экспериментов.

Результаты и обсуждение

Пыльцевые зерна петунии содержат большую часть классических фитогормонов (ИУК, АБК, гиббереллины, цитокинины), а их прорастание в условиях *in vitro* сопровождается изменением их эндогенного уровня. Динамика содержания каждого из гормонов, присутствующих в зрелом и прорастающем *in vitro* мужском гаметофите, характеризуется индивидуальной специфичностью. Наиболее резкие изменения протерпевал уровень АБК: очень высокий исходный уровень падал практически до нуля уже через 2 ч культивирования. Содержание гиббереллинов, наоборот, постоянно возрастало на протяжении 6 ч культивирования пыльцевых трубок. Уровни ИУК и цитокининов достигали максимума к концу второго часа их прорастания и падали к четвертому часу до уровня, который далее не менялся.

В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что экзогенные фитогормоны влияют на прорастание и рост мужского гаметофита. Прорастающие *in vitro* пыльцевые трубки проявляли различную чувствительность к экзогенным фитогормонам (от 10⁻¹² М до 10⁻³ М). Наиболее заметно стимулировали прорастание пыльцевых зерен АБК и гиббереллин А₃, причем наиболее выраженное действие гормонов наблюдали при их относительно низких концентрациях (10⁻¹² М). Стимуляцию прорастания мужского гаметофита в присутствии ИУК наблюдали только при использовании достаточно низких концентрациях гормона (10⁻¹²- 10⁻¹⁰ М), тогда как ее высокие концентрации ингибировали этот процесс. Синтетический цитокинин 6-БАП, напротив, вызывал только подавление исследуемого процесса, причем характер его действия не зависел от концентрации препарата в среде культивирования. Максимальный стимуляторный эффект на рост пыльцевых трубок оказал гиббереллин А³. В присутствии 10⁻¹² М гиббереллина длина пыльцевых трубок через 6 ч их культивирования возрастала в 2 раза по сравнению с контролем (пыльцевые трубки, растущие при отсутствии гормона в среде культивирования). Меньший эффект оказывала АБК в той же концентрации: в этом случае длина пыльцевых трубок возрастала только в 1.5 раза. ИУК слабо стимулировала рост пыльцевых трубок, в то время как 6-БАП, напротив, существенно подавлял его.

В целом, полученные в данной работе результаты мы рассматриваем как доказательство того, что гормональный статус мужского гаметофита является, наряду с гормональным статусом спорофита, фактором, контролирующим его прорастание и рост. Очевидно, пыльцевое зерно несет полный набор фитогормонов, необходимых для его гидратации и прорастания на рыльце пестика, а далее его рост по проводниковой ткани столбика и завязи проходит под контролем гормонального статуса спорофита. Выявленное в настоящей работе стимулирующее действие некоторых из испытанных экзогенных синтетических аналогов фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок может говорить о том, что эндогенного уровня фитогормонов недостаточно для полной активации

данного процесса. Последний, очевидно, включает в себя запуск межклеточных взаимодействий мужского гаметофита со спорофитными тканями пестика, обеспечивающих его последующий рост (в случае совместимого опыления) или ингибирование (в случае самонесовместимого опыления).

Исходя из гипотезы о том, что механизмы трансдукции сигналов могут базироваться на транзиторных сдвигах тех или иных параметров ионного гомеостаза клеток пыльцевого зерна, мы поставили задачу выяснить, способны ли экзогенные фитогормоны вызывать временное нарушение ионного гомеостаза пыльцевых зерен, а именно гомеостатической регуляции их цитоплазматического рН. При этом мы исходили из того, что гормон-индуцированный сдвиг внутриклеточного рН в принципе может быть вовлечен в каскад событий, обуславливающих трансдукцию гормональных сигналов в системе пыльца-пестик как *in vivo*, так и *in vitro*. рН_c гидратированных пыльцевых зерен относительно быстро снижался под действием всех выбранных соединений, а затем постепенно возвращался к своему исходному значению. Прорастающие пыльцевые зерна в присутствии ИУК и АБК претерпевали относительно быстрое защелачивание цитозоля, которое в испытанном временном интервале практически не обращалось со временем. Вместе с тем ГК₃ вызывал закисление цитозоля, то есть эффект, подобный тому, что наблюдался в гидратированных пыльцевых зернах. Гормон-индуцированный щелочной сдвиг рН_c прорастающих пыльцевых зерен полностью подавлялся в присутствии ванадата, тогда как в отсутствие фитогормонов этот ингибитор не влиял на величину рН_c. Ванадат также заметно замедлял кинетику восстановления рН_c гидратированных пыльцевых зерен после гормон-индуцированного закисления цитозоля, приводил к значительному снижению рН_c тех же пыльцевых зерен в контроле и сильно ослаблял в них эффекты всех испытанных фитогормонов. На основании этих результатов предполагается, что физиологическое действие фитогормонов в данной системе включает в себя модуляцию рН_c, то есть временное нарушение гомеостатической регуляции рН цитозоля клеток пыльцевого зерна, которое может играть сигнальную роль в инициации дальнейших клеточных ответных реакций, запускаемых фитогормонами.

В целом полученные в работе результаты позволяют заключить, что внутриклеточный рН_c клеток пыльцевого зерна петунии чувствителен к действию фитогормонов, причем характер их влияния на рН_c существенным образом зависит как от их природы, так и от физиологического состояния этих растительных объектов. Представленные здесь данные дают основание предполагать, что гормон-индуцированный сдвиг рН_c пыльцевых зерен вовлекается в каскад событий, запускающих и обуславливающих процессы прогамной фазы оплодотворения.

Работа поддержана грантом РФФИ (06-04-48870).

Литература

1. *Franklin-Tong V.E.* Signalling and the Modulation of Pollen Tube Growth // *Plant Cell*. -1999. - vol.11.- P. 727-738.
2. *Lord E.M., Russell S.D.* The Mechanism of Pollination and Fertilization in Plant // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2002. - vol.18. - P. 81-105.
3. *Feijo J.A., Malho R., Obermeyer G.* Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth // *Protoplasma*. -1995. - vol.187.- P.155-167.
4. *Dearnaley J.D., Levina N.N., Lew R.R., Heath I.B., Göring D.R.* Interrelationships between cytoplasmic Ca²⁺ Peaks, Pollen Hydration and Plasma Membrane Conductance during Compatible and Incompatible Pollination of *Brassica napus* Papillae // *Plant Cell Physiol*. -1997.-vol. 38.- P. 985-999.
5. *Geitmann A., Cresti M.* Ca²⁺ Channels Control the Rapid Expansion in Pulsating Growth of *Petunia hybrida* Pollen Tube // *J. Plant Physiol.* -1998. -vol. 152.- P. 439-447.
6. *Fan L.-M., Wang Y.-F., Wang H., Wu W.-H.* *In Vitro Arabidopsis* Pollen Germination and Characterization of the Inward Potassium Current in *Arabidopsis* Pollen Grain Protoplast // *J. Exp. Bot.* -2001. vol. 52.- P. 1603-1614.
7. *Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Куранов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н.* Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в

онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост. *Агрехимия*.-1999.-№ 8.-С. 49-53.

8. *Kovaleva L., Zakharova E.* Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progamic Phase of Fertilisation after Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia hybrida* L. // *Sex Plant Reprod.* -2003. -vol. 16.- P. 191-196.

9. *Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Минкина Ю.В., Тимофеева Г.В., Андреев И.М.* Прорастание и рост *in vitro* мужского гаметофита петунии чувствительны к действию экзогенных гормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // *Физиология растений*.2005. -том .52.- С.584-590.

Резюме

Прорастание мужского гаметофита в условиях *in vitro* сопровождается изменением эндогенного уровня гормонов и чувствительно к действию экзогенных гормонов. Физиологическое действие гормонов включает временное нарушение ионного гомеостаза пыльцевых зерен, а именно гомеостатической регуляции их цитоплазматического рН.

In vitro pollen grain germination is accompanied by changes in the levels of endogenous phytohormones and is sensitive to the treatment with exogenous phytohormones. The mechanisms of signal transduction in this system involve transient change in some parameters of ionic homeostasis in pollen grain cells, such as cytosolic pH.

Проростання чоловічого гаметофита в умовах *in vitro* супроводжується зміною ендогенного рівня гормонів і чутливо до дії екзогенних гормонів. Фізіологічна дія гормонів включає тимчасове порушення іонного гомеостазу пыльцевых зерен, а саме гомеостатичної регуляції їх цитоплазматичного рН.

КОВБАСЕНКО Р.В., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРИЄВ О.П.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Київ, 03143 вул. акад. Заболотного, 148, e-mail: dmyt@voliacable.com*

ІНДУКЦІЯ СОМАКЛОНАЛЬНОЇ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ У РОСЛИН ТОМАТУ

Мікроклональне розмноження рослин через калюсогенез дає унікальну можливість широко використовувати різноманітні селективні агенти для індукції соматоклональної варіабельності. Це дозволяє значно прискорити відбір та розмноження необхідних ліній рослин з бажаними ознаками, зокрема стійких до збудників хвороб та шкідників з підвищеним фітоімунним потенціалом.

Хімічний метод захисту рослин у наш час став основним. Рентабельне землеробство без нього в сучасних умовах практично неможливе. Проте широке використання пестицидів забруднює навколишнє середовище. Їхня ефективність нерідко зменшується внаслідок виникнення нових вірулентних рас паразитів [1].

Ніякі пестициди неможливо замінити імунну систему рослин, а в певних випадках, навпаки, здатні її пригнічувати. Іншими словами, імунна система рослин сама потребує надійного захисту. Одним з найбільш перспективних і екологічно безпечних методів захисту рослин є індукування їх природної стійкості. Метод базується не на пригніченні фітопатогенів, що це має місце у випадку використання пестицидів, а на індукуванні імунного потенціалу рослин за тим зразком, як це має місце у природі [2].

Хоча традиційний селекційний процес, який включає гібридологічне схрещування і відбір елітних рослин в поколіннях, залишається основним, але одним з важливих напрямків селекційно-генетичної роботи є широке застосування біотехнологічних методів з використанням культури *in vitro* для створення вихідних форм рослин.