

Баланс активных форм кислорода на влажных рыльцах однодольных и двудольных растений

Брейгина М. А.^{А*}, Бабушкина К. О.^А, Лунёва О. Г.^Б

^А Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия. *E-mail: pollen-ions@yandex.ru

^Б Московский государственный университет, Биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, Россия.

Эффективное взаимодействие между мужским гаплоидным поколением – пыльцой - и рыльцем пестика, приводящее к стимуляции прорастания совместимой пыльцы – одно из ключевых условий образования семян у цветковых растений. Возможность такого взаимодействия – важное эволюционное приобретение, которое обеспечило покрытосеменным растениям репродуктивный успех. Из низкомолекулярных сигнальных агентов наиболее универсальными считаются активные формы кислорода (АФК), которые, как было показано для ряда цветковых растений, продуцируются женскими тканями перед опылением (McInnis *et al.* 2006; Zafra *et al.* 2016) и могут восприниматься пыльцой как сигнал. Для некоторых наиболее изученных видов, таких как лилия и табак, было показано, что АФК влияют на эффективность прорастания пыльцы и скорость роста пыльцевой трубки, а также ионный гомеостаз. Чувствительными к экзогенным АФК оказались ионные токи и мембранный потенциал вегетативной клетки пыльцевого зерна табака и лилии (Максимов *et al.* 2015; Breygina *et al.* 2016; Podolyan *et al.* 2019). Однако, данные о продукции АФК на рыльцах были весьма ограниченными в связи с отсутствием методических подходов: ранее исследования проводили методом окрашивания рыльца, что не позволяло дифференцировать различные АФК и количественно их оценивать.

У покрытосеменных растений с влажным рыльцем пыльца выходит из состояния физиологического покоя и прорастает в вязкой жидкости, которую называют рыльцевым экссудатом, и которая содержит неорганические ионы, углеводы, белки и жирные кислоты. Сбор экссудата и анализ содержания в нем АФК с помощью высокоточных методов, а также воздействие на редокс-гомеостаз рыльца в интактных цветках позволили нам изучить различные аспекты продукции, взаимопревращения и накопления АФК, а также значение этих процессов для прорастания пыльцы *in vivo*.

Исследование проводилось в двух направлениях: (1) видовой скрининг, в рамках которого изучалась продукция АФК на рыльцах представителей различных отдаленных в систематическом отношении семейств;

и (2) углубленное исследование взаимопревращения АФК на рыльце с помощью модельных растений – представителей однодольных и двудольных растений.

В ходе исследования применялся метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Он основан на способности парамагнитного вещества, помещенного в постоянное магнитное поле, резонансно поглощать электромагнитное излучение (Haywood 2013; Menezes *et al.* 2024). Для обнаружения АФК и оценки их количества в среде используют спиновые ловушки и спиновые зонды: первые реагируют со свободными радикалами и образуют аддукты, обладающие уникальными ЭПР-спектрами; вторые окисляются практически любыми АФК, образуя неспецифические аддукты, однако эти соединения более стабильны и обладают высокой чувствительностью.

В видовом скрининге на данный момент участвовали представители следующих семейств: Кирказоновые, Бромелиевые, Орхидные, Лилейные, Спаржевые, Пионовые, Барбарисовые, Пасленовые, Геснериевые. Скрининг проводился по следующему плану: оптимизация метода сбора интактного свежего экссудата рыльца, измерение суммарного уровня АФК с помощью ЭПР спектроскопии и неспецифического спинового зонда САТ-1Н (Dikalov *et al.* 2018), измерение концентрации пероксида водорода колориметрическим методом FOX-1, измерение уровня генерации супероксид радикала методом ЭПР спектроскопии с помощью специфичной спиновой ловушки DEPMPO (для представителей ряда семейств) (Zhu 2016), изучение влияния выявленных в экссудате АФК на прорастание пыльцевых зёрен *in vitro*. Полученные данные вошли в ряд публикаций (Breygina *et al.* 2022, 2023), однако значительная часть данных получена недавно и будет представлена впервые.

Суммарные АФК были обнаружены в рецептивных жидкостях всех видов, однако их количество, а также соотношение между супероксид-радикалом и пероксидом водорода различались у представителей разных систематических групп. Так, для представителей семейства Орхидных был характерен низкий уровень АФК, а для представителей Бромелиевых – высокий, причем у первых преобладал пероксид водорода, а у вторых – супероксид радикал. Значимость той или иной АФК в качестве регуляторного фактора для пыльцы соответствующих видов была проверена в системе *in vitro* и также сильно различалась у представителей разных таксонов.

Полученные данные демонстрируют как универсальность роли АФК в качестве регуляторных агентов в репродуктивных взаимодействиях у цветковых растений, так и разнообразие паттернов их генерации. Мы установили, что одна из двух АФК всегда преобладает в экссудате рыльца,

она же, как правило, оказывает на пыльцу более значимый эффект и, по-видимому, является «ведущей» в регуляторных процессах. Для представителей разных систематических групп это может быть как супероксид-радикал, так и пероксид водорода.

Библиографические ссылки

1. Breygina MA, Abramochkin DV, Maksimov NM, Yermakov IP (2016) Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. *Plant Biology* 18, 761–767. doi:10.1111/plb.12470.

2. Breygina M, Luneva O, Schekaleva O, Lazareva N, Babushkina K, Kirilyuk IA (2023) Pattern of ROS generation and interconversion on wet stigmas in basal and divergent angiosperms. *Plant Growth Regulation*. doi:10.1007/s10725-023-01033-w.

3. Breygina M, Schekaleva O, Klimenko E, Luneva O (2022) The balance between different ROS on tobacco stigma during flowering and its role in pollen germination. *Plants* 11, 993.

Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I (2018) Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxidants and Redox Signaling* 28, 1433–1443. doi:10.1089/ars.2017.7396.

Haywood R (2013) Spin-Trapping: Theory and Applications. ‘Encycl. Biophys.’ pp. 2447–2453. (Springer Berlin Heidelberg) doi:10.1007/978-3-642-16712-6_579.

McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk? *New Phytologist* 172, 221–228. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01875.x.

Menezes FAF, Oliveira JG, Guimarães AO (2024) Electron Paramagnetic Resonance Applied to Free Radicals and Reactive Oxygen Species Detection in Plant Systems. *Applied Magnetic Resonance* 55, 335–355. doi:10.1007/S00723-023-01625-9.

Podolyan A, Maksimov N, Breygina M (2019) Redox-regulation of ion homeostasis in growing lily pollen tubes. *Journal of Plant Physiology* 243, 153050. doi:https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153050.

Zafra A, Rejón JD, Hiscock SJ, Alché JDD (2016) Patterns of ROS accumulation in the stigmas of angiosperms and visions into their multi-functionality in plant reproduction. *Frontiers in Plant Science* 7, 1112–1119. doi:10.3389/fpls.2016.01112.

Zhu H (2016) Assays for Detecting Biological Superoxide. *Reactive Oxygen Species* 1, 65–80. doi:10.20455/ros.2016.813.

Максимов Н, Брейгина М, Ермаков И (2015) Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода. *Цитология* 57, 720–726.