

АБСЦИЗОВАЯ КИСЛОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СИГНАЛ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У *PETUNIA HYBRIDA*

Л.В. Ковалева¹, А.С. Воронков^{1,2}, Е.В. Захарова^{3,4}, Ю.В. Минкина⁵

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, *kovaleva_l@mail.ru*

²Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Россия, *voronkov_as@mail.ru*

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁵Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия, *minkina_ylia@mail.ru*

Аннотация. Распределение абсцизовой кислоты (АБК) в пыльниках петунии фертильной и стерильной линий анализировали иммуногистохимическим методом. Развитие фертильного мужского гаметофита сопровождалось монотонным повышением уровня АБК в репродуктивных клетках. Абортация микроспороцитов в профазе мейоза у стерильной линии сопровождалась резким двукратным повышением уровня АБК. Результаты позволили заключить, что АБК включается в PCD микроспороцитов.

Ключевые слова: мужской гаметофит, тапетум, мужская стерильность, PCD, АВА

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-926-930

Мужской гаметофит развивается в пыльнике, в спорангиях которого на первой стадии происходит микроспорогенез, в то время как на второй стадии микроспоры развиваются в зрелые пыльцевые зерна. Во время развития пыльника ткани мужского гаметофита подвергаются уникальным процессам, включая клеточные деления (мейоз), дифференциацию клеток мужского гаметофита, межклеточные взаимодействия между тапетумом и микроспорами. Мейоз, развитие микроспор и созревание пыльцевых зерен обеспечивает полифункциональная ткань тапетума. Образование фертильного мужского гаметофита требует своевременной дегенерации тапетума. Этот процесс является частью программы созревания пыльника, которая приводит к последовательной деструкции тканей пыльника, скоординированной с процессами дифференциации пыльцы. Дезинтеграция тапетума вызывается процессом PCD [Wang et al., 1999]. Такой же эффект наблюдали, если пыльники подвергали гиперосмотическому шоку. Использование TUNEL-реакции, которая метит 3'-концы ДНК, показало, что фрагментация ДНК в основном происходит в клетках локулы стенки пыльника, тапетума и филамента.

В настоящее время молекулярные и гормональные аспекты регуляции микроспорогенеза активно исследуются [Hirano et al., 2008; Dobrovolskaya et al., 2009; De Storme and Geelen, 2014; Zhang and Yang, 2014; Sharma and Nayyar, 2016].

Цель данной работы – установить роль фитогормона абсцизовой кислоты (АБК) в регуляции мужского гаметофита петунии (*Petunia hybrida* L.). На двух линиях (фертильной и стерильной) с использованием иммуногистологического метода

проведен анализ распределения АБК в тканях пыльника, включая репродуктивные ткани (микроспороциты, микроспоры, пыльцевые зерна) и спорофитные ткани стенки пыльника (тапетум и средние слои) на 4 стадиях развития пыльника: материнские клетки микроспор, мейоз, тетрады микроспор и пыльцевые зерна.

Методика иммуногистологического определения АБК. Бутоны петунии фиксировали в смеси 4% параформальдегида, пропионовой кислоты и 70% этилового спирта в соотношении 5:5:90 (V/V) с добавлением 2% (m/V) 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимид гидрохлорида в течение 24 ч при 4 °С [Chen and Zhao, 2008]. Фиксированный материал проводили через серию спиртов (96% абсолютный спирт), парафинизировали, получали полутонкие гистологические срезы и проводили депарафинизацию. Препараты проводили через серию спиртов (70% – 50% – 30% – 15%), помещали в 10 мМ фосфатный буфер (PBS), содержащий 0,1% (V/V) Tween 20, 1,5% глицина и 5% БСА на 20 мин + на 40 мин при 22 °С, промывали в нормальном солевом буфере (НСБ) (10 мМ PBS, 0,8% NaCl, 0,1% (V/V) Tween 20 и 0,8% БСА), а затем три раза в том же буфере без NaCl и Tween 20.

Инкубация с анти-АБК антителами (поликлональные анти-АБК продуцируемые в кролике, AS09446, Agrisera; разведение 1:200) проводили в PBS + БСА (0,1%) в течение ночи при комнатной температуре во влажной камере в темноте. После инкубации образцы несколько раз тщательно промывали в концентрированном солевом буфере (КСБ), содержащем 10 мМ PBS, 2,9% NaCl, 0,1% (V/V) Tween 20 и 0,1% БСА с последующей промывкой в НСБ и буфере без NaCl и Tween 20. Затем проводили инкубацию образцов со вторичными антителами (анти-кроличьи продуцируемые в курице LGG DyLight 350-конъюгированные, 122564, Agrisera; разведение 1:200) проводили в PBS + 0,1% БСА в течение 4 ч, несколько раз тщательно промывали в КСБ, в НСБ и буфере без NaCl и Tween 20, промывали в НСБ и заключали в глицерин [Chen et al., 2010]. Препараты исследовали на флуоресцентном микроскопе (AxioImager Z2 с ApoTome, MRm камеры; набором фильтров №49 – 365 возбуждения, эмиссия 445/50; Carl Zeiss, Германия).

Локализация АБК в развивающихся пыльниках петунии. Высокая интенсивность флуоресценции в пыльниках петунии фертильного клона на стадии материнских клеток микроспор характеризовала ткань тапетума, в то время как на последующих стадиях подобный эффект был характерен для репродуктивной ткани, а именно для микроспор и пыльцевых зерен. Мейотическое деление клеток репродуктивной ткани сопровождалось повышением уровня АБК в репродуктивной ткани на фоне почти постоянного уровня АБК в тапетуме. На стадии тетрад уровень АБК, по-видимому, одинаков в репродуктивных и тапетальных тканях. В зрелом мужском гаметофите наблюдали высокий уровень АБК, почти идентичный уровню на двух предыдущих стадиях развития. На стадии созревания пыльцевых зерен флуоресцентный сигнал АБК не наблюдали в тапетальной ткани, в то время как в средних слоях имело место его постепенное снижение.

Абортация мужского гаметофита петунии на стадии мейоза проходила на фоне преждевременной дегенерации тапетума при полной сохранности средних слоев стенки пыльника. В профазе мейоза наблюдали дезинтеграцию тапетума, которая сопровождалась дегенерацией материнских клеток микроспор и хорошей сохранностью стенки пыльника, которая, по-видимому, увеличивалась в размерах, благодаря повышению числа средних слоев. Как показали наши результаты, абортация материнских клеток микроспор в профазе мейоза вследствие разрушения тапетальной ткани сопровождалась резким повышением уровня АБК в клетках репродуктивной ткани и, напротив, постоянным низким уровнем АБК в тапетуме. В стерильных пыльниках на поздних стадиях наблюдали полное отсутствие репродуктивной ткани и

тапетума. Таким образом, процесс развития фертильного мужского гаметофита, очевидно, включает постоянный уровень АБК как в репродуктивной ткани, так и в тапетуме, в то время как стерильная пыльца на стадии мейоза, в отличие от фертильных пыльников, сопровождается двукратным повышением уровня АБК.

АБК как потенциальный сигнал мужской стерильности. АБК аккумулируется в растениях при нескольких типах абиотического стресса, включая холод, солевой стресс и водный дефицит. Вызываемые стрессом изменения касаются динамики цитоскелета, стабильности тапетума, метаболизма углеводов, накопления АФК, индукции ПКС и сигнальных компонентов [Zhu et al., 2010; Zhang and Yang, 2014]. АБК регулирует ответ на осмотический стресс и обеспечивает устойчивость растений к стрессу через регуляцию большого числа стресс-ответственных генов [Fujita et al., 2011].

Согласно данным [Nirano et al., 2008], хотя у риса гены АБК не показали синхронной экспрессии, однако сигналинг АБК функционировал в пыльниках на стадиях тетрад и трехклеточного пыльцевого зерна. Авторы полагают, что гены АБК также относительно хорошо экспрессируются и во время развития пыльника.

У злаковых АБК играет важную роль в контроле гомеостаза АБК пыльника и устойчивости репродуктивной стадии к абиотическому стрессу. Мужская стерильность чувствительных к засухе пыльников пшеницы связана с накоплением АБК, в то время как устойчивые к засухе пыльники содержат более низкие уровни АБК [Ji et al., 2011].

Как показали результаты, абортация материнских клеток микроспор в профазе мейоза вследствие разрушения тапетума сопровождается резким повышением уровня АБК в репродуктивной ткани и, напротив, его интенсивным снижением в тапетуме.

Растет количество данных о том, что АБК взаимодействует с сигналингом сахаров, активируя ответ растений на стресс [Eckardt, 2002]. У риса, например, аккумуляция АБК в пыльниках, подвергшихся холодовому стрессу (3 суток при 12 °C), совмещается с тапетальным апопластическим транспортом сахаров и индуцирует высокий уровень абортации пыльцы [Oliver et al., 2007]. Так как различия в накоплении АБК коррелируют с экспрессией генов АБК, полагают, что АБК действует как ответный сигнал на стресс, который индуцирует абортацию пыльцы, подавляя апопластический транспорт сахаров в пыльнике. В целом полученные данные поддерживают потенциальную роль АБК в контроле метаболизма сахаров, например, меняя активность инвертазы в мужских репродуктивных органах при стрессе [de Storme and Gleeson, 2014]. Инвертаза является критическим фактором для развития пыльника. Имеется достаточно доказательств, указывающих на то, что АБК может быть потенциальным сигналом регуляции апопластического транспорта сахаров в пыльниках. Экзогенная АБК подавляла в пыльнике ген инвертазы *TaIVR1* или *INV4* у пшеницы. С другой стороны, подавление гена инвертазы снижалось при повышении катаболизма АБК [Ji et al., 2011]. Есть данные, что повышение уровня АБК негативно регулирует экспрессию генов инвертазы [Albacete et al., 2015]. Полагают, что АБК является потенциальным сигналом стресс-индуцированной мужской стерильности и регуляции транспорта сахаров в апопласте пыльника. Приведенные выше данные подтверждают роль АБК в контроле метаболизма сахаров в мужских репродуктивных органах. Инвертаза независимо или в сочетании с фитогормонами регулирует множество процессов роста и развития растений от экспрессии генов до перераспределения питательных веществ [Roitsch and Gonzalez, 2004]. Полагают, что есть связь между проявлением мужской стерильности и изменением активности инвертазы в репродуктивных органах. Установлена ключевая роль инвертазы в транспорте сахарозы из тапетума в апопласт и создании градиента растворимых сахаров в пыльнике [De Storme, Geelen, 2014].

В пыльнике фертильной петунии активность инвертазы была выявлена на стадии мейоза, в то время как на стадии тетрад ее наблюдали на поверхности всего среза пыльника [Dobrovolskaya et al., 2009]. В стерильном пыльнике активность инвертазы выявлялась только после смерти микроспороцитов и возрастала к моменту созревания пыльников, т.е. очевидно, что в этом случае инвертаза участвует в перераспределении неиспользованной сахарозы. Выявленное в данной работе двукратное повышение уровня АБК на стадии мейоза в стерильных пыльниках, по сравнению с фертильными пыльниками, предполагает, что АБК является потенциальным сигналом мужской стерильности и регуляции транспорта сахаров в апопласте пыльника.

Таким образом, развитие фертильного мужского гаметофита петунии сопровождается монотонным повышением уровня АБК в репродуктивных органах и, напротив, их постепенным снижением в клетках тапетума и средних слоев. Абортация микроспороцитов в профазе мейоза, обусловленная преждевременной дегенерацией тапетума при полной сохранности средних слоев, сопровождалась двукратным повышением уровня АБК в репродуктивных клетках. Полученные данные позволяют рассматривать АБК в качестве потенциального сигнала мужской стерильности.

Литература

Albacete A., Cantero-Navarro E., Großkinsky D.K., Arias C.L. Ectopic overexpression of the cell wall invertase gene *CINI* leads to dehydration avoidance in tomato // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66. – P. 863–878.

Chen D. Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum* // *Physiologia Plantarum.* – 2008. – V. 134. – P. 202–215.

De Storme N. & Geelen D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms // *Plant Cell Environ.* – 2014. – V. 37. – P. 1–18.

Dobrovolskaya A.A., Rodionova G.B., Voronkov A.S., Kovaleva L.V. Sporophyte-gametophyte interactions between anther and male gametophyte in petunia // *Rus. J. Plant Physiology.* – 2009. – V. 56. – P. 394–401.

Eckardt N.A. Abscisic acid biosynthesis gene underscores the complexity of sugar, stress, and hormone interactions // *Plant Cell.* – 2002. – V. 14. – P. 2645–2649.

Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants // *J. Plant Res.* – 2011. – V. 124. – P. 509–525.

Hirano K., Aya K., Hobo T., Sakakibara H. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – V. 49. – P. 1429–1450.

Ji X., Dong B., Shiran B., Talbot M.J. Control of ABA catabolism and ABA homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 156. – P. 647–662.

Oliver S.N., Dennis E.S., Dolferus R. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V. 48. – P. 1319–1330.

Roitsch T. & González M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9. – P. 606–613.

Sharma K.D. & Nayyar H. Regulatory networks in pollen development under cold stress // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – P. 1–13.

Wang M., Hoekstra S., van Bergen S., Lamers G.E., Oppedijk B.J., van der Heijden M.W., de Priester Schilperoort R.A. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 39. – P. 489–501.

Zhang D. & Yang L. Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2014. – V. 17. – P. 49–55.

ABSCISIC ACID AS POTENTIAL SIGNAL OF MALE STERILITY IN *PETUNIA HYBRIDA*

L.V. Kovaleva¹, A.S. Voronkov^{1,2}, E.V. Zakharova^{3,4}, Yu.V. Minkina⁵

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *kovaleva_l@mail.ru*

²Moscow Regional Institution of Higher Education "University for Humanities and Technologies", Orekhovo-Zuyevo, Russia, *voronkov_as@mail.ru*

³All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁴Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian Timiryazev State Agrarian University", Moscow, Russia, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁵Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia, *minkina_ylia@mail.ru*

Abstract. Distribution of abscisic acid (ABA) in anthers of male-fertile and male-sterile lines of petunia was analyzed by immunohistochemical method. Development of fertile male gametophyte was accompanied by monotonous elevation of ABA level in reproductive cells. Abortion of microsporocytes in the meiosis prophase in the sterile line accompanied by two-fold elevation in ABA level in reproductive cells. We conclude that at the meiosis stage ABA is involved in the PCD of microsporocytes.

Keywords: *male gametophyte, tapetum, male sterility, PCD, ABA*