

САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ РНКазного ТИПА И ПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ (PCD)

Л.В. Ковалева¹, Е.В. Захарова^{2,3}, Г.В. Тимофеева¹

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

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, zakharova_ekater@mail.ru

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

Аннотация. Для *Petunia hybrida* характерна самонесовместимость РНКазного типа. В системе пыльца-пестик петунии выявлены маркеры PCD. Использовали три метода: окрашивание трипановым синим, ДНК-электрофорез и Tunel-метод. Дополнительное окрашивание DAPI показало, что TUNEL-позитивный сигнал происходит от ядерной ДНК. Результаты позволили сделать вывод, что PCD является детерминантой самонесовместимости РНКазного типа у петунии.

Ключевые слова: петуния, самонесовместимость РНКазного типа, PCD, TUNEL

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-931-935

Самонесовместимость – генетически детерминируемый репродуктивный барьер, который во многих семействах покрытосеменных предотвращает самооплодотворение и поддерживает разнообразие вида. Отторжение «своей» пыльцы происходит в процессе узнавания пыльцы и пестика [Takayama, Isogai, 2005]. Это распознавание контролируется детерминантами мужской и женской специфичности (S-пыльцы, S-пестика), кодируемыми мультиаллельными генами на S-локусе. К настоящему времени интенсивные молекулярные исследования проведены на пяти семействах, представители которых обладают самонесовместимостью [Meng et al., 2011]. Три различных типа молекулярного контроля узнавания пыльцы и пестика охарактеризованы в трех семействах: *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *Solanaceae* [Iwano, Takayama, 2012]. У растений с самонесовместимостью *Solanaceae*-типа (семейства *Solanaceae*, *Rosaceae* и *Plantaginaceae*) поведение пыльцы определяется ее собственным S-генотипом (т.е. пыльца признается «своей» и отторгается пестиком только в том случае, если ее гаплотип идентичен одному из двух S-гаплотипов пестика). Установлено, что в механизм самонесовместимости *Solanaceae*-типа включены два тесно связанных гена на S-локусе: (1) ген *S-PHKазы*, контролирующей S-специфичность пестика [Murfett et al., 1994; Sassa et al., 1996]; (2) ген *S-локус F-box* (*SLF* или *SFB*), контролирующей S-специфичность пыльцы [Entani et al., 2003; Kubo et al., 2010, 2016; Williams et al., 2014]. Установлено, что в семействах *Solanaceae*, *Rosaceae* и *Plantaginaceae* – самонесовместимость S-РНКазного типа: S-РНКазы (S-пестика) ингибирует рост «своих» пыльцевых трубок, деградируя РНК [Takayama and Isogai, 2005; McClure et al., 2011; Iwano and Takayama, 2012]. S-РНКазы пестика и SLF-белки пыльцы в семействах *Solanaceae* и *Plantaginaceae*, SFB в семействе *Rosaceae* (у *Prunus*) или SFB в семействе *Rosaceae* (у *Maloideae*) взаимодействуют в цитоплазме пыльцевых трубок [Liu et al., 2014].

Механизм самонесовместимости S-РНКазного типа, функционирование которого приводит к ингибированию несовместимых пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика, является наименее изученным в отличие от более доступных для

исследования типов самонесовместимости, при которых несовместимая пыльца немедленно отторгается после ее попадания на поверхность рыльца. Данная работа посвящена одному из дискуссионных вопросов – функционированию программированной клеточной смерти (ПКС) в механизме самонесовместимости S-РНКазного типа в семействе *Solanaceae*, а именно у петунии (*Petunia hybrida* L.). Используя различные цитохимические техники окрашивания, включая TUNEL – окрашивание и анализ ДНК-деградации, выявлена ДНК-фрагментация (характерная черта ПКС растений) в пыльцевых трубках, растущих *in vivo* в тканях пестика после самонесовместимого опыления. Результаты позволили заключить, что у петунии ингибирование роста пыльцевых трубок при функционировании механизма самонесовместимости S-РНКазного типа в проводниковых тканях столбика протекает с участием ПКС.

Материалы и методы. На двух клонах петунии (самосовместимом и самонесовместимом) проводили самоопыление кастрированных накануне цветков. Через 2, 4, 6, 8, 24 ч после опыления пестики фиксировали, используя искусственный спирт (3:1), состоящий из трех частей 96% спирта и одной части ледяной уксусной кислоты.

Визуализация пыльцевых трубок, растущих *in vivo* в проводниковых тканях пестика, была осуществлена с использованием флуоресцентного красителя анилинового голубого. Метод основан на специфической способности флуорохрома соединяться с каллозой, которая входит в состав оболочки пыльцевой трубки и образует каллозные пробки. Мацерацию проводили в 20% спиртовом растворе щелочи (KOH) в течение 20-40 мин. После мацерации пестики дважды промывали дистиллированной водой и заливали 0,01% раствором анилинового голубого на 30-40 мин. Окрашенные пестики переносили на предметное стекло в каплю глицерина с водой (1:1), накрывали покровным стеклом, слегка раздавливали и наблюдали под микроскопом (Zeiss AxioPlan), оснащенным флуоресцентной насадкой.

Для обнаружения ПКС были использованы три метода: окрашивание красителем трипановым синим, ДНК-электрофорез и TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Окрашивание трипановым синим является специальной техникой для определения ПКС [Waspi et al., 2001]. Краситель связывается с внутриклеточными белками поврежденной клетки и используется для селективного окрашивания мертвых клеток и тканей. Метод окрашивания трипановым синим помогает определить повреждение плазматической мембраны клетки. Пестики фиксировали в искусственном спирте, окрашивали в кипящем спиртовом растворе лактофенола (96% этанол + лактофенол, 1:1), содержащем 0,1 мг мл⁻¹ трипанового синего (Sigma), 1 мин, любой избыток удаляли раствором хлоралгидрата (2,5 мг мл⁻¹) при комнатной температуре. Пестики исследовали под микроскопом (Zeiss AxioPlan).

ДНК-электрофорез – аналитический метод разделения фрагментов ДНК. Геномную ДНК выделяли из опыленных пестиков, замороженных в жидком азоте. Пестики растирали в ступке в мелкий порошок и выделяли ДНК по стандартной методике [Bernatsky, 1986]. ДНК пыльников использовали как позитивный контроль. Электрофорез ДНК проводили в трис-боратном буфере.

TUNEL – метод обнаружения фрагментации ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), маркируя концевую область нуклеиновых кислот. TUNEL метод является основным методом диагностирования ПКС. Методика визуализации места локализации ПКС в системе пыльца-пестик по TUNEL-методу (деградация ядерной ДНК, а именно, связывание специфических флуоресцентно-меченных антител со свободными 3'-концами полипептидной цепи, образующимися

вследствие ее разрушения) была нами адаптирована с использованием работы [Wang et al., 2009] с модификациями. Через 8-9 ч после самоопыления предварительно кастрированных цветков петунии двух клонов (самосовместимого и самонесовместимого) пестики собирали, фиксировали в растворе: 37% раствор формальдегида:ледяная уксусная кислота:50% этанол (5:5:9) и хранили при 4 °С до использования. Промывали и инкубировали в 1М NaOH 2 ч (для размягчения тканей), дважды промывали дистиллированной водой, инкубировали в 0,01% растворе водорастворимого анилинового голубого в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Затем промывали цитратным буфером (pH 4,1) и окрашивали по TUNEL-методу с использованием КИТа (APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit). Эксперимент был повторен трижды в трехкратной повторности. Дополнительное окрашивание ядерным красителем DAPI показало, что TUNEL-позитивный сигнал соответствует ядерной ДНК.

Результаты. Визуализация с помощью анилинового голубого пыльцевых трубок, растущих в проводниковых тканях пестика, показала, что как после совместимого, так и самонесовместимого опылений почти все пыльцевые зерна проросли, и пыльцевые трубки росли по тканям рыльца и столбика. При этом в случае совместимого опыления пыльцевые трубки через 30 ч достигали завязи, где происходило оплодотворение, в то время как после самонесовместимого опыления рост пыльцевых трубок прекращался через 8-9 ч на расстоянии $8 \pm 0,3$ мм от поверхности рыльца вследствие функционирования реакции самонесовместимости S-РНКазного типа.

Эксперименты с трипановым синим показали гибель папиллярных клеток рыльца после всех типов опыления, тогда как в рыльцах, собранных из развивающихся бутонов, окрашивание отсутствовало. В неопыленных рыльцах, собранных из изолированных, предварительно кастрированных цветков, не было найдено ни одного случая ПКС. Различия между окрашенными пыльцевыми трубками при совместимом и несовместимом опылениях были значительными. Так, при самонесовместимом опылении трипановым синим окрашивались 70% видимых пыльцевых трубок и только 17% – при совместимом опылении.

Признаки ПКС (фрагментация ДНК) выявлены с помощью электрофоретического анализа деградации ДНК, аналитического метода разделения фрагментов ДНК. Результаты показали, что деградация ДНК выявлялась в тканях рылец и столбиков петунии самонесовместимого клона через 8 ч после самоопыления, т.е. во время прохождения реакции самонесовместимости. Наложение TUNEL-окрашивания на окрашенные анилиновым голубым пыльцевые трубки позволило визуализировать ядра пыльцевых трубок от ядер клеток пестика (в частности, от ядер папиллярных клеток рыльца, которые тоже претерпевают деградацию в процессе роста пыльцевых трубок). Дополнительное окрашивание специфическим ядерным красителем DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол) (0,05 г/мл) (метод окраски ядерной ДНК) показало, что TUNEL-позитивный сигнал соответствует ядерной ДНК, процент положительных TUNEL-окрашенных ядер от всех видимых ядер был посчитан в каждом опыте (10 пестиков в трехкратном эксперименте). При несовместимом опылении 68,5 % видимых ядер показывали положительное TUNEL-окрашивание, в то время как при совместимом опылении – только 16,5 %. Полученные данные коррелируют с данными о том, что S-РНКазы, детерминанта самонесовместимости в пестике у *Pyrus pyrifolia* (сем. *Rosaceae*), участвует в отторжении своей пыльцы, запуская деградацию ДНК в несовместимых пыльцевых трубках [Wang et al., 2010]. Они установили, что после несовместимого опыления TUNEL-позитивный сигнал в пыльцевых трубках достигал $62,7 \pm 8,1\%$ от всех ядер, а после совместимого опыления этот сигнал обнаруживался только в $8,8 \pm 2,7\%$ ядер [Wang et al., 2010].

Таким образом, тестирование гипотезы об участии ПКС в механизме S-РНКазной самонесовместимости у петунии (*Petunia hybrida*) с использованием четырех методов выявило наличие маркеров ПКС в пыльцевых трубках петунии после самонесовместимого опыления. Положительную реакцию и деградацию ДНК (по фрагментации ДНК) наблюдали в пестиках петунии самонесовместимого клона через 8-9 ч после самоопыления. Следовательно, признаки ПКС, в том числе деградация ДНК, были выявлены в тканях столбика петунии во время прохождения реакции самонесовместимости. Результаты позволяют полагать, что ПКС является детерминантой механизма самонесовместимости S-РНКазного типа у петунии.

Литература

- Bernatsky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences // *Genetics*. – 1986. – V. 112. – P. 887–898.
- Bosch M., Franklin-Tong V. E. Self-incompatibility in Papaver: signaling to trigger PCD in incompatible pollen // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 481–490.
- Entani T., Iwano M., Shiba H., Che F. S., Isogai A., Takayama S. Comparative analysis of the self-incompatibility (S) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity // *Genes Cells*. – 2003. – V. 8. – P. 203–213.
- Iwano, M., and Takayama, S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15. – P. 78–83.
- Kubo, K. I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z. Collaborative non-self-recognition system in S-RNase-based self-incompatibility // *Science*. – 2010. – V. 330. – P. 796–799.
- Kubo K.I., Tsukahara M., Fujii S., Murase K., Wada Y., Entani T., Iwano M., Takayama S. Cullin1-P is an essential component of non-self-recognition system in self-incompatibility in *Petunia* // *Plant Cell Physiol.* – 2016. – V. 57. – P. 2403–2416.
- Liu W., Fan J., Li J., Song Y., Li Q., Shang Y., Hue Y. SCF(SLF)-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida* // *Front. Genet.* – 2014. – V. 5. – article 228.
- McClure B., Cruz-Garcia F., Romero C. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems // *Annals of Botany*. – 2011. – V. 108. – P. 647–658.
- Meng X., Sun P., Kao T.H. S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata* // *Annals of Botany*. – 2011. – V. 108. – P. 637–646.
- Murfett J., Atherton T. L., Mou B., Gasser C. S., McClure B. A. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection // 1994. – *Nature*. – V. 367. – P. 563–566.
- Sassa H., Nishio T., Kowiyama Y., Hirano H., Koba T., Ikehashi H. Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S-ribonuclease superfamily // *Molecular and General Genetics*. – 1996. – V. 250. – P. 547–557.
- Takayama S., Isogai A. Self-incompatibility in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2005. – V. 56. – P. 467–489.
- Thomas S.Q. and Franklin-Tong V.E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen // *Nature*. – 2004. – V. 429. – P. 305–309.
- Wang C.L., Wu J., Xu G.H., Gao Y.B., Chen G., Wu J.Y., Wu H.Q., Zhang S.L. S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia* // *Cell Sci.* – 2010. – V. 123. – P. 4301–4309.
- Waspi U., Schweizer P., Dulder R. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew // *Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 153–161.

Williams J.S., Natale C.A., Wang N., Brubaker T.R., Sun P., Kao T.H. Four previously identified *Petunia inflata* *S*-locus *F*-box genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility // Mol. Plant. – 2014. – V.7. – P. 567–569.

S-RNase-BASED SELF-INCOMPATIBILITY AND PROGRAMMED CELL DEATH

L.V. Kovaleva¹, E.V. Zakharova^{2,3}, G.V. Timofeeva¹

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

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, *zakharova_ekater@mail.ru*

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

Abstract. PCD markers were revealed in the pollen-pistil system of petunia characterized by S-RNase-based self-incompatibility. Three methods were used: trypan blue, DNA-electrophoresis and TUNEL method. Additional staining with DAPI showed that TUNEL-positive signal originates from nuclear DNA. The results reliably prove that PCD is a determinant of S-RNase-based self-incompatibility in petunia.

Keywords: *Petunia*, self-incompatibility of S-RNase-type, PCD, TUNEL