

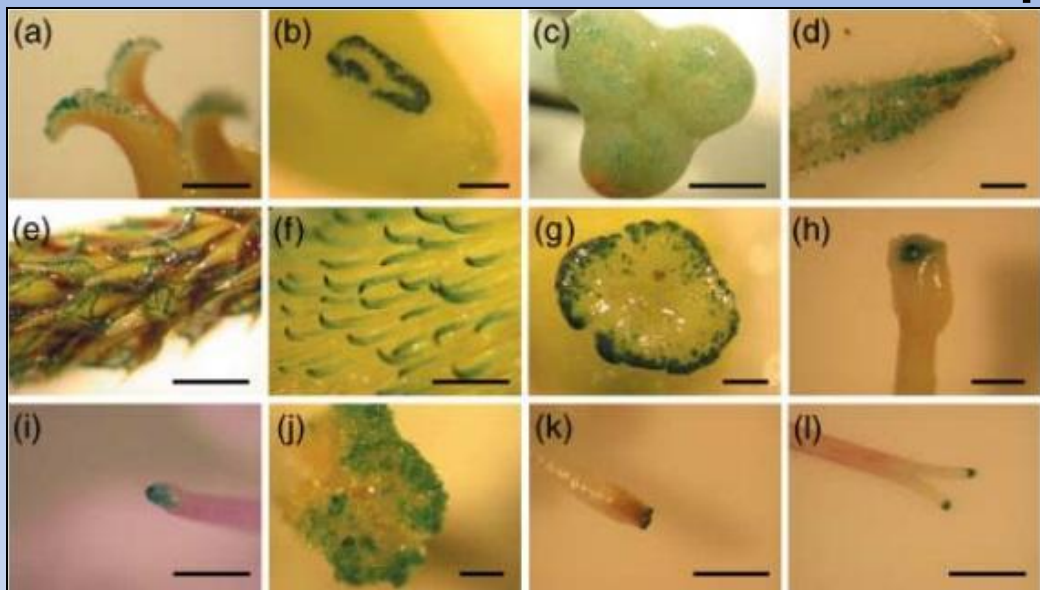
*Регуляция ионных токов в  
протопластах из пыльцевых зерен  
лилии пероксидом водорода*



Максимов Н.М.  
МГУ им. Ломоносова,  
Биологический факультет,  
Кафедра физиологии  
растений

Москва, 2015

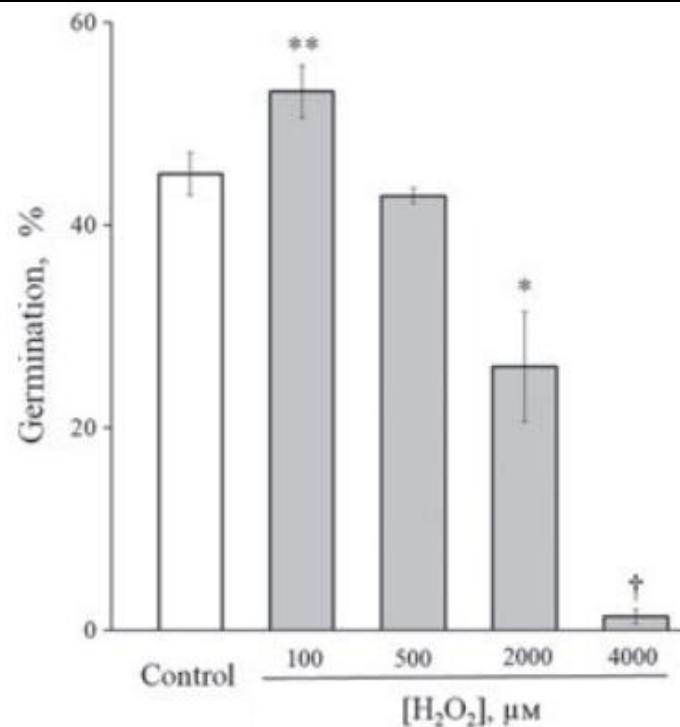
# $H_2O_2$ – один из регуляторов прогамной фазы оплодотворения



*New Phytologist* (2006) 172: 221–228

Stephanie M. McInnis<sup>1</sup>, Radhika Desikan<sup>2</sup>, John T. Hancock<sup>2</sup> and Simon J. Hiscock<sup>1</sup>

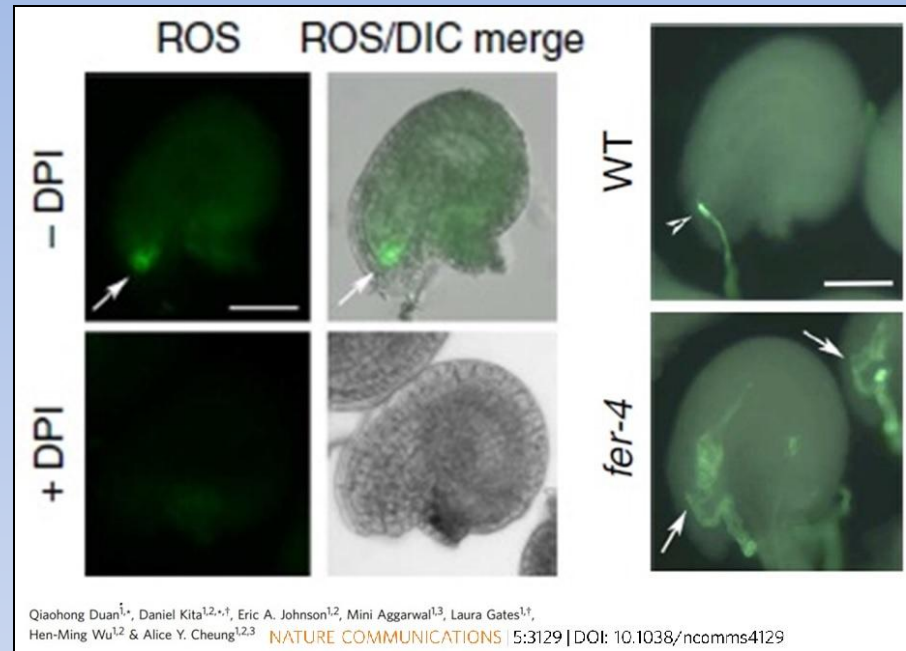
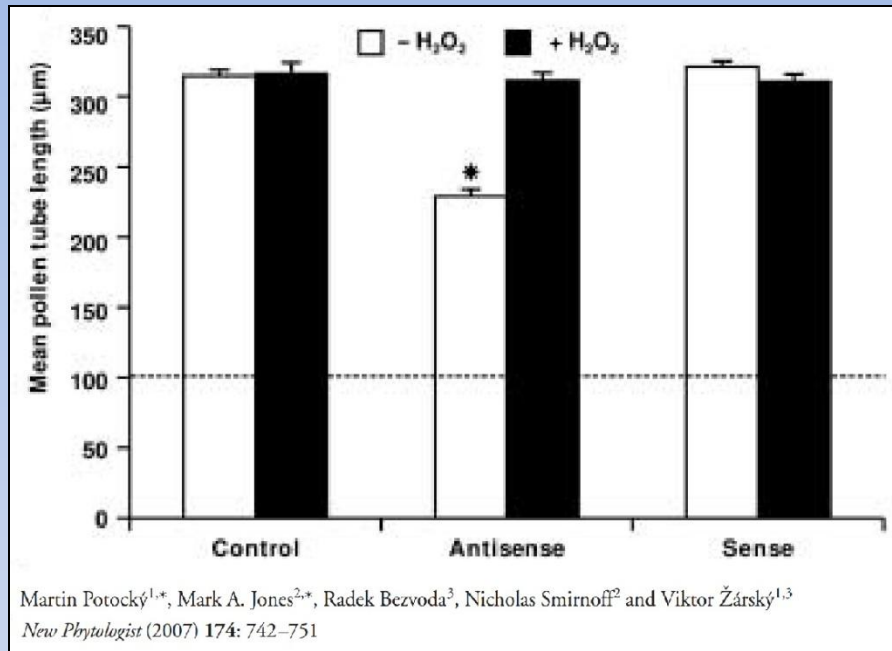
АФК, в основном  $H_2O_2$ , накапливается в тканях рыльца при подготовке к опылению. Предполагается, что АФК могут играть роль межклеточного сигнала и регулировать прорастание пыльцевого зерна и рост пыльцевой трубки *in vivo*.



A. V. Smirnova, N. P. Matveyeva & I. P. Yermakov  
*Plant Biology* 16 (2014) 252–257

$H_2O_2$  в низких концентрациях (100 μM) стимулирует прорастание пыльцевого зерна *in vitro*

# $H_2O_2$ – один из регуляторов прогамной фазы оплодотворения



Эндогенным источником АФК в пыльцевой трубке является НАДФН-оксидаза. При подавлении экспрессии НАДФН-оксидазы с помощью антисенс олигоДНК происходит ингибирование роста, при этом обработка  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M) восстанавливает скорость роста до контрольного уровня.

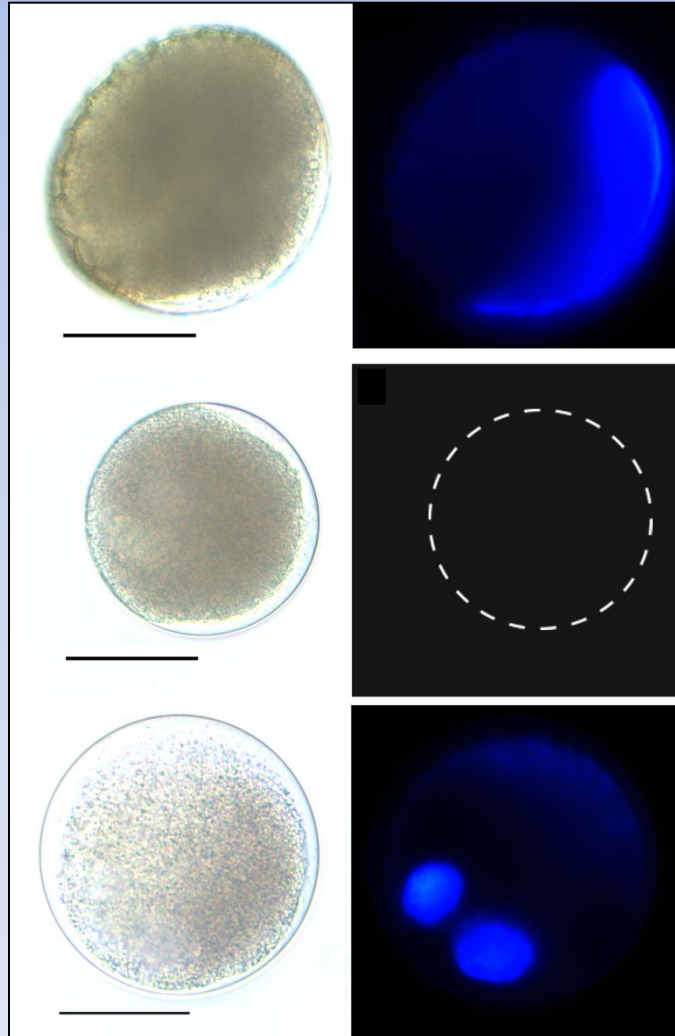
Регуляторная роль АФК на заключительном этапе прогамной фазы оплодотворения. Локальный максимум АФК вблизи синергид инициирует разрыв пыльцевой трубки и высвобождение спермиев в зародышевом мешке. У мутанта *fer-4*, локальный максимум отсутствует и пыльцевая трубка растет внутри

Цель работы: установления влияния  $H_2O_2$  на ионные токи  $Ca^{2+}$  и  $K^+$ , а также на мембранный потенциал, как интегральный показатель ионного транспорта.

Объект исследования: протопласты из пыльцевых зерен лилии



Процесс выделения протопластов из пыльцевых зёрен лилии (*Lilium logiflorum* Thumb.)

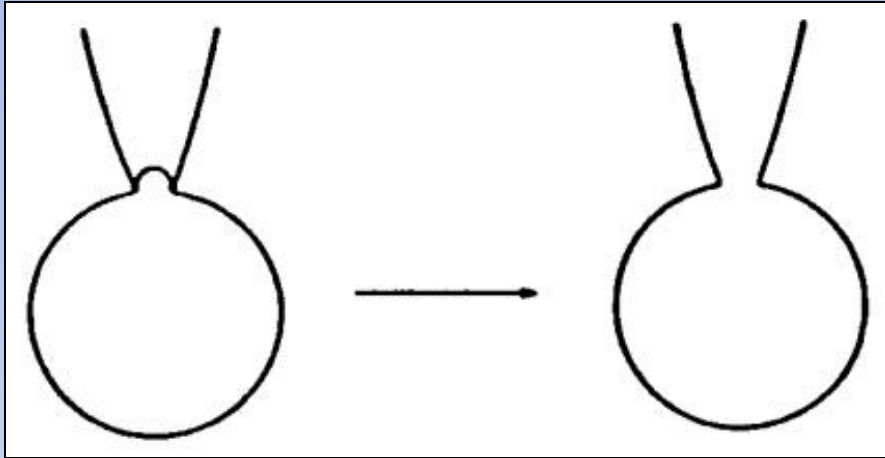


Окрашивание пыльцевого зерна лилии Tinopal (связывается с целлюлозой).

Протопласт не окрашивается Tinopal, клеточная стенка полностью отсутствует.

Окрашивание ядер с использованием DAPI.

# Метод исследования: пэтч-кламп в конфигурации «whole cell»

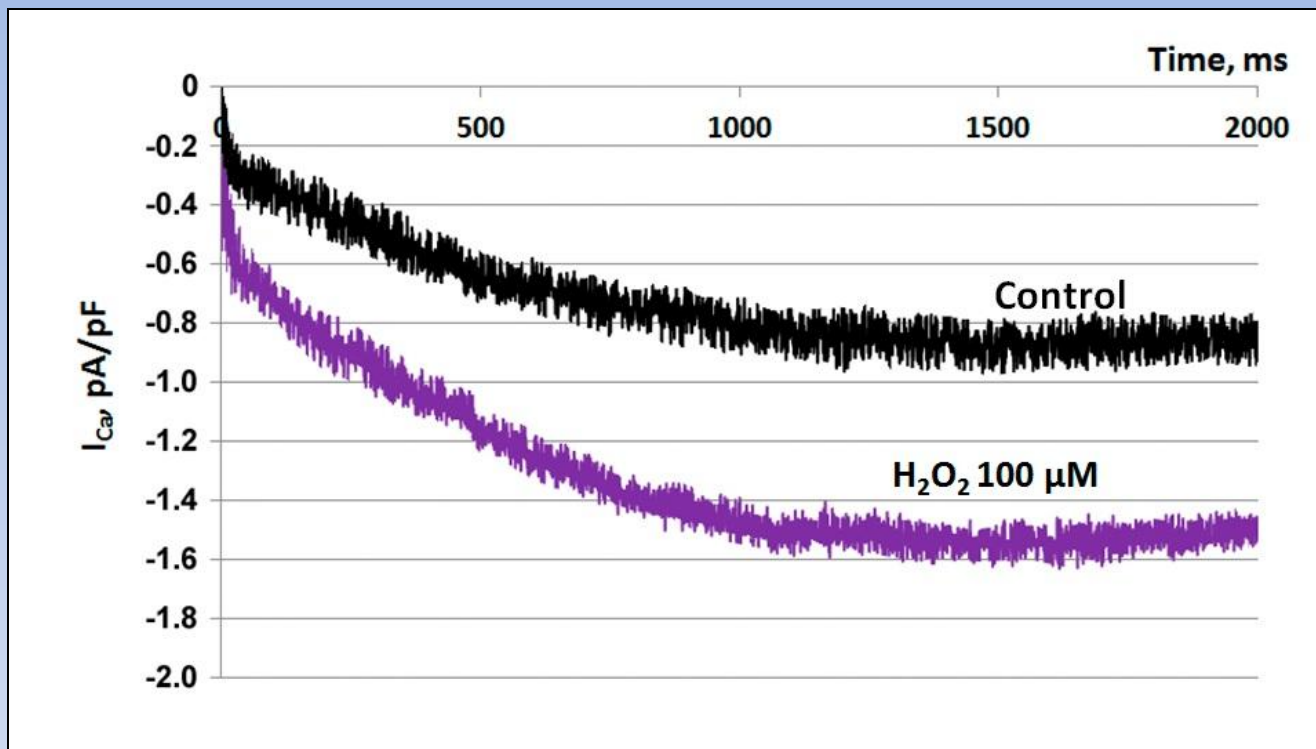


1. Закрепление тонкого кончика стеклянной пипетки на протопласте и формирование гигаомного контакта;
2. К пипетке прикладывается отрицательное давление, мембрана перфорируется. Среда из пипетки объединяется с цитоплазмой клетки.

- Низкомолекулярные компоненты из среды в пипетке постепенно диффундируют в клетку, однако внутриклеточные регуляторные системы в основном сохраняются в цитоплазме.
- Записывается суммарный ток через плазмалемму всей клетки.
- Дифференциация отдельных ионных токов достигается за счет действия селективных ингибиторов и подбора ионного состава внешней среды и раствора в пипетке.

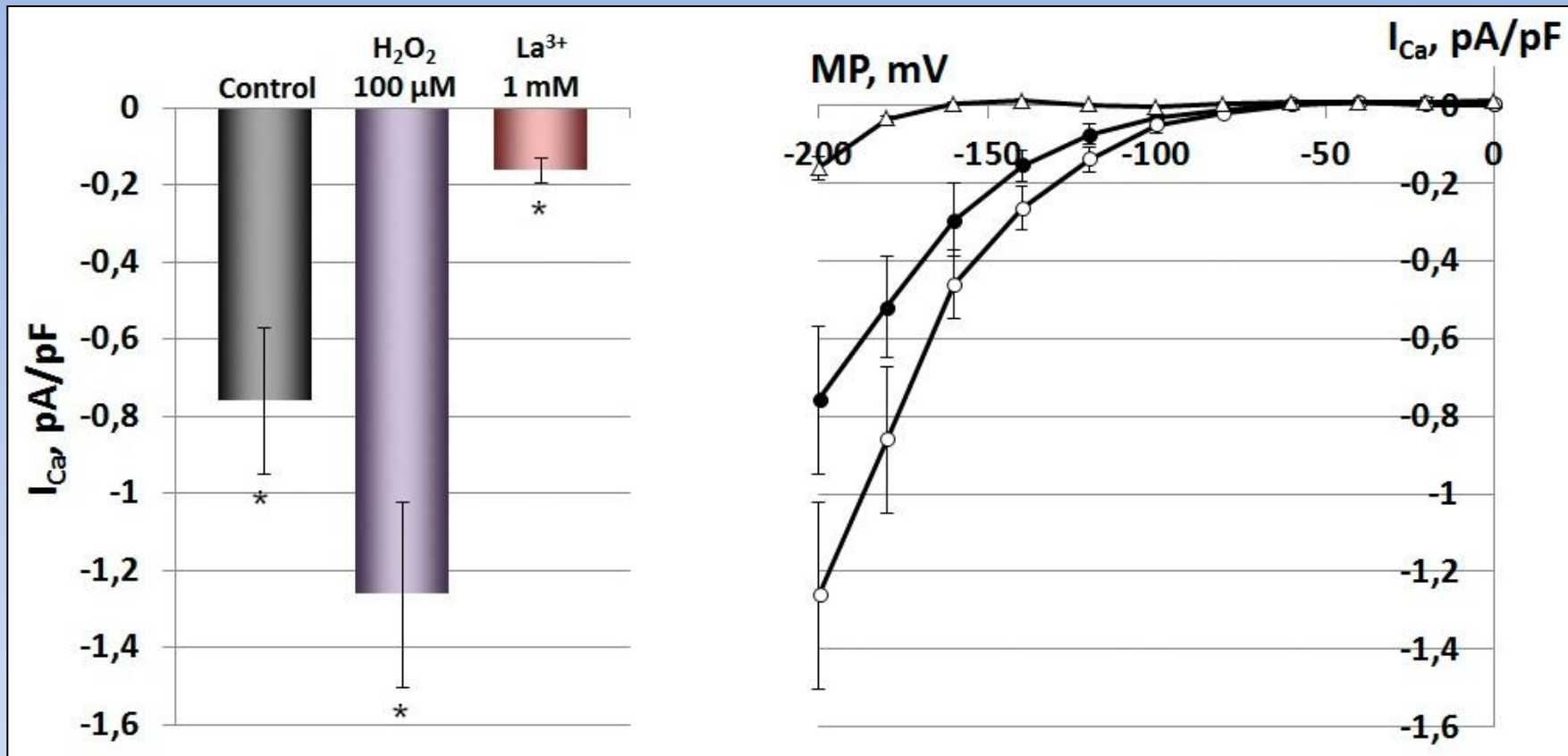


# $\text{H}_2\text{O}_2$ активирует $\text{Ca}^{2+}$ ток в протопластах лилии



Оригинальная репрезентативная запись входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока, индуцированного гиперполяризацией (от 0 до -200 мВ, интервал 20 мВ) в контроле и после инкубации протопластов с  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активирует Ca<sup>2+</sup> ток в протопластах лилии

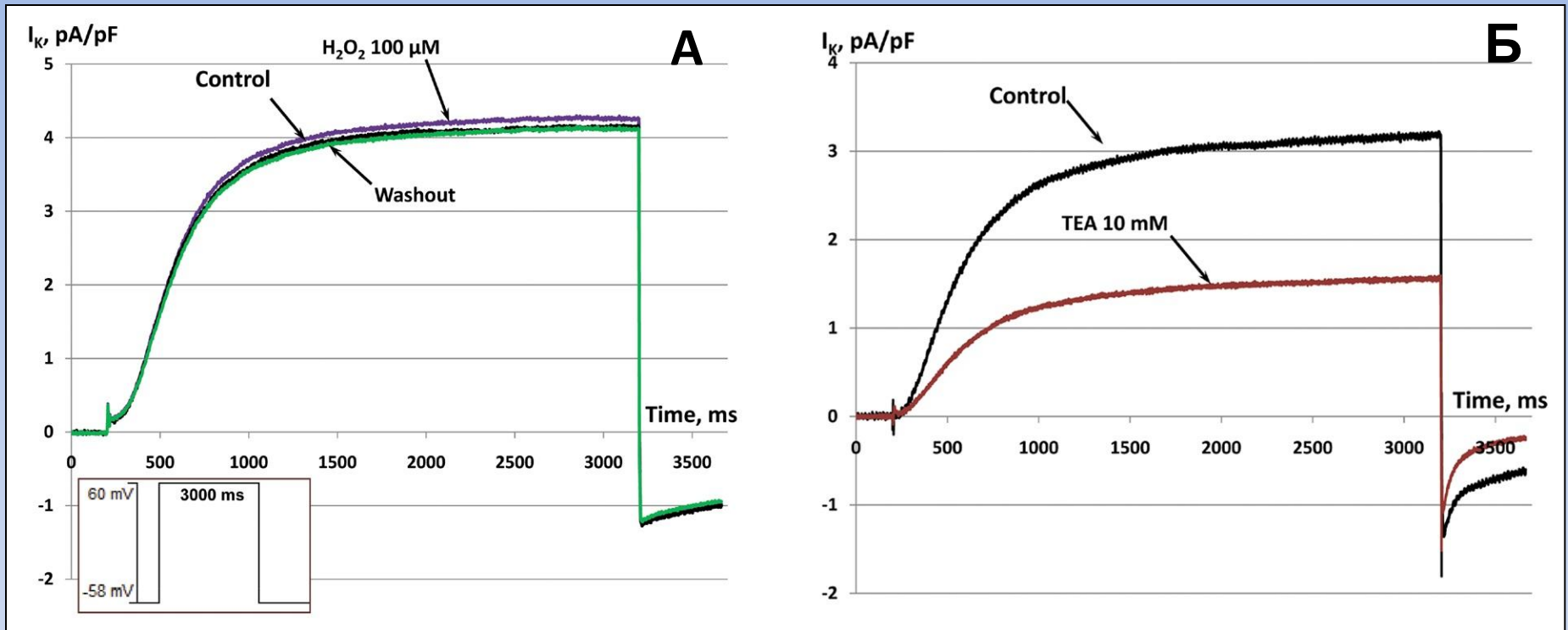


Сравнение средней плотности тока при -200 мВ (n = 8).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – активирует Ca<sup>2+</sup> ток; La<sup>3+</sup> – ингибитор Ca<sup>2+</sup> каналов, блокирует ток. \* p < 0.05 критерий Манна-Уитни

Средние вольт-амперные характеристики исследуемого тока в контроле (•), при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (◦) и при ингибировании тока La<sup>3+</sup> 100 μM (Δ). Ток активируется при гиперполяризации плазмалеммы.

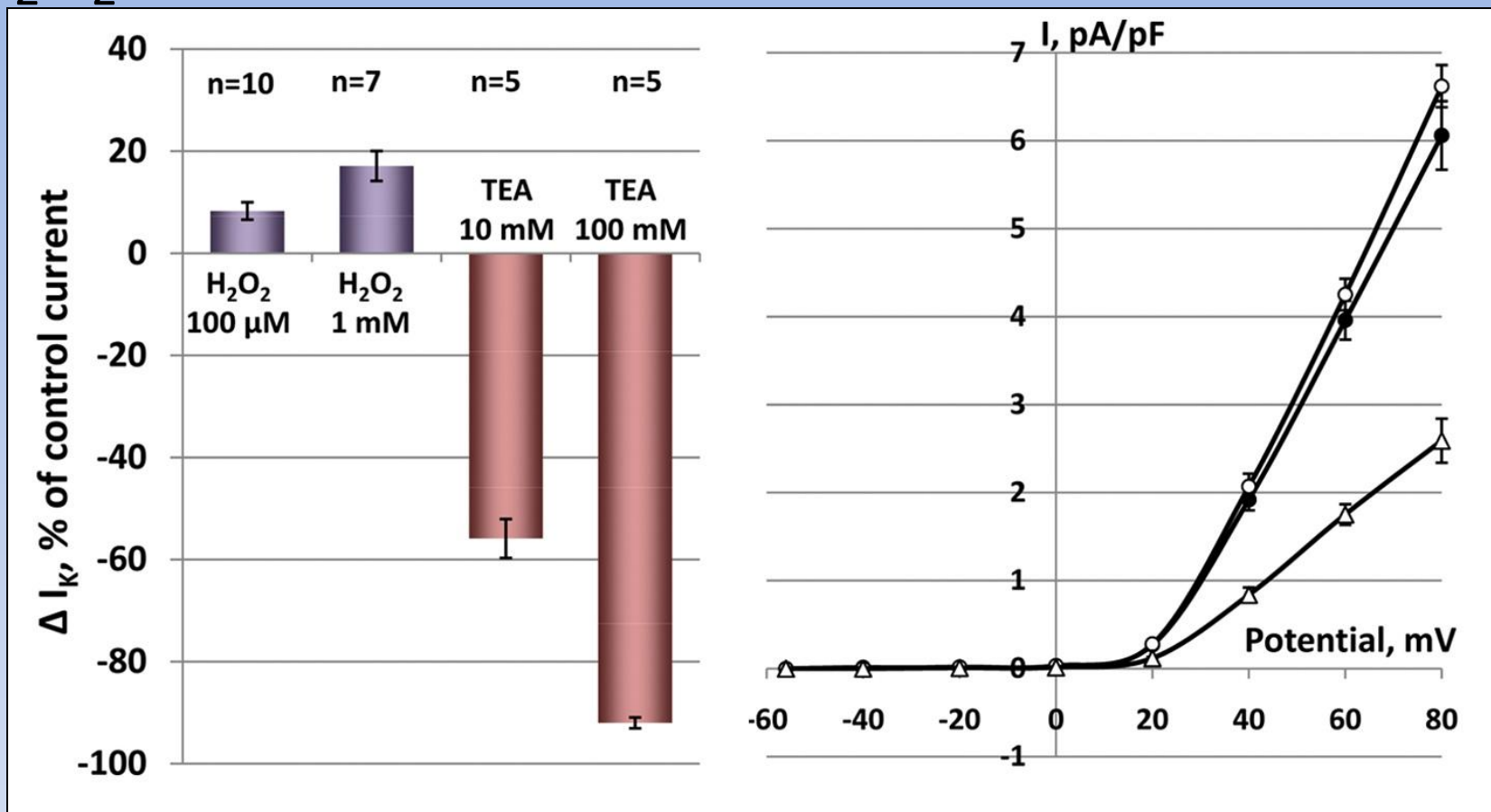
# $H_2O_2$ активирует $K^+$ ток в протопластах лилии



Оригинальные репрезентативные записи  $K^+$  тока, индуцированного деполяризацией (от -58 до 60 мВ) в контроле, после 5 минут инкубации в среде с 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  и с последующей отмывкой (А).  $H_2O_2$  активирует выходящий  $K^+$  ток. После отмывки ток возвращается к уровню контроля. Запись  $K^+$  тока в контроле и при действии ингибитора  $K^+$ -каналов тетраэтиламмония (ТЕА) (Б). ТЕА эффективно блокирует  $K^+$  ток.



# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активирует K<sup>+</sup> ток в протопластах лилии

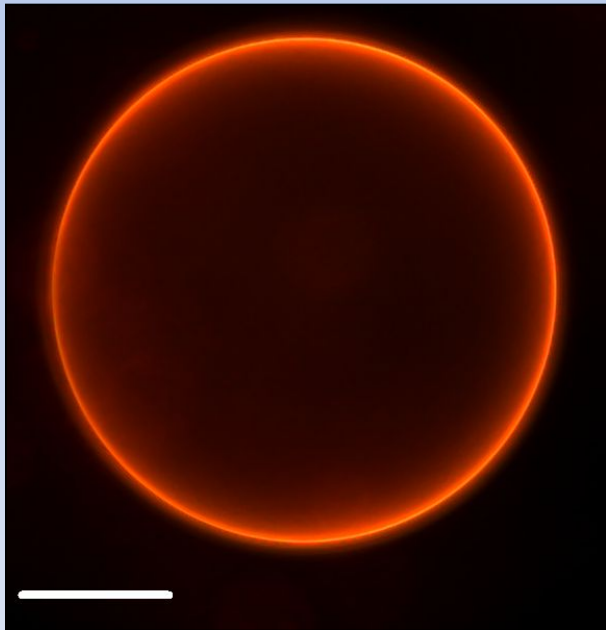


Сравнение средней плотности тока при (в % от контроля).  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – активирует K<sup>+</sup> ток; TEA – ингибитор K<sup>+</sup> каналов, блокирует ток. Все отличия достоверны ( $p < 0.05$  критерий Уилкоксона).

Средние вольт-амперные характеристики выходного K<sup>+</sup> тока.  
В контроле (•), при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M (◦) и при ингибировании тока TEA 100  $\mu$ M ( $\Delta$ ).

# $H_2O_2$ не оказывает действия на мембранный потенциал протопластов лилии

Для измерения потенциала использовали флуоресцентный краситель Di-4-ANNEPS.



t, s	Control	$H_2O_2$ 10 $\mu M$	$H_2O_2$ 100 $\mu M$
60	2,4 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1
360	2,6 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1

Отношение флуоресценции Di-4-ANNEPS в двух каналах – параметр пропорциональный величине мембранного потенциала после добавления  $H_2O_2$  (среднее  $\pm$  стандартная ошибка).

*Спасибо за внимание!*