

УДК 581.162 + 576.54

ВНУТРИ- И МЕЖТКАНЕВЫЕ ЦИТОМИКТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИКРОСПОРОГЕНЕЗЕ ОДНО- И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

Е.А. КРАВЕЦ¹, Ю.В. СИДОРЧУК², И.И. ГОРЮНОВА¹, С.Г. ПЛОХОВСКАЯ¹,
С.Р. МУРСАЛИМОВ², Е.В. ДЕЙНЕКО², А.И. ЕМЕЦ¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: kravetshelen@gmail.com

² Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Проведен сравнительный цитологический анализ внутри- и межтканевых цитомиктических взаимодействий в микроспорогенезе одно- и двудольных растений на примере двух клеточных систем – микроспороцитов и тапетума. Установлено, что цитомиксис является элементом преимущественно внутритканевого взаимодействия. В тапетуме он отличается структурными и временными таксоноспецифическими особенностями. В микроспороцитах ядерные миграции приурочены в основном к зиготене – пахитене и характеризуются определенным синхронизмом с цитомиксисом в тапетуме. Межтканевые цитомиктические взаимодействия (тапетум – микроспороциты) обнаружены лишь в пыльниках однодольных. Межтканевые взаимодействия, вероятно, отражают обострение конкурентных отношений между тапетумом и микроспороцитами за пространство в процессе дифференциации тканей пыльника. Полиплоидные ядра тапетума и синцитии, будучи мощными акцепторами, способны конкурировать с микроспороцитами и направлять транслокацию хроматина в свою сторону. Отсутствие межтканевых взаимодействий у двудольных, вероятно, отражает лучшую сбалансированность процессов дифференциации соматических и генеративных тканей микроспорангия по сравнению с однодольными.

Ключевые слова: цитомиксис, микроспорогенез, микроспороциты, тапетум, межклеточные и межтканевые взаимодействия, ядерная миграция, цитомиктические каналы, клеточная конкуренция.

© Е.А. КРАВЕЦ, Ю.В. СИДОРЧУК, И.И. ГОРЮНОВА,
С.Г. ПЛОХОВСКАЯ, С.Р. МУРСАЛИМОВ,
Е.В. ДЕЙНЕКО, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2016

Введение. Цитомиксис – распространенный природный процесс межклеточного взаимодействия, присущий различным тканям растений. Структурную основу цитомиксиса составляют цитомиктические каналы – прямые межклеточные цитоплазматические контакты, через которые могут перемещаться ядро, хроматин, органеллы, трофические факторы и сигнальные молекулы [1–6].

Наиболее многочисленны публикации по цитомиксису в микроспорогенезе покрытосеменных, где он описан уже почти у 400 видов из 84 семейств [7, 8]. Интенсивность цитомиксиса варьирует в широких пределах и зависит от разных факторов. Наибольшее влияние на нее оказывают мутагенез, гибридизация, инбридинг и полиплоидия [9–18]. Хотя цитомиксис может иметь негативные генетические последствия, накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что он является естественным процессом межклеточного взаимодействия [1, 3, 5, 19–21]. Это подтверждают и самые последние исследования цитомиксиса на диплоидной линии табака, показывающие, что мигрирующий хроматин сохраняет не только структуру (бивалентную организацию, синаптоне-мальный комплекс), но и функциональную активность (по 14 типам модификации гистонов) [22, 23]. Эти данные свидетельствуют в пользу естественной и конструктивной приро-

ды цитомиксиса и соответственно служат аргументами против взгляда на цитомиксис как на деструктивный и хаотический феномен.

Анализ накопленных данных, а также факт приуроченности цитомиксиса к мужской генеративной сфере и к «male-driven evolution» [24] позволяют рассматривать цитомиксис как один из потенциальных механизмов видообразования [12, 14, 20, 25–31]. Учитывая широкую распространенность цитомиксиса среди наземных растений, можно ожидать, что он задействован в неких важных процессах межклеточного взаимодействия, позволяющих его носителям подпадать под положительный отбор. Несмотря на значительный прогресс в феноменологическом исследовании цитомиксиса, его молекулярные и клеточные механизмы, а также функциональное значение, в том числе при обеспечении межклеточных взаимодействий на внутри- и межтканевых уровнях, остаются недостаточно изученными и малоопытными. В настоящей работе нами проведен сравнительный цитологический анализ внутри- и межтканевых взаимодействий в пыльнике однодольных и двудольных растений на примере двух клеточных систем – микроспороцитах и тапетуме, позволяющий рассматривать цитомиксис в качестве маркера таких взаимодействий.

Материал и методы. Для исследований использовали три вида однодольных – лилию шафранную (*Lilium croceum* Chaix), лук батун (*Allium fistulosum* L.), лук репчатый (*Allium cepa* L.), а также один вид двудольных – табак виргинский (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) линия SR1.

Для световой микроскопии бутоны или извлеченные из них пыльники исследуемых видов фиксировали в ацетоалкоголе, промывали и хранили в 70°-ном этаноле при 4 °С согласно общепринятой методике. Для изготовления временных препаратов пыльники надрезали или разрезали на несколько частей, содержащее осторожно выдавливали на предметное стекло. Пыльники лилии и луков окрашивали ацетогематоксилином (1 %) с железом-аммонийными квасцами (0,5 %) или ацетокармином (2 %), пыльники табака – ацетокармином (6 %).

Для флюоресцентной микроскопии пыльники исследуемых видов фиксировали в 2%-

ном глютаральдегиде («Serva», Германия) в течение 1 ч. Каллозные оболочки окрашивали анилиновым синим (2 %), ядра – DAPI (0,5 мкг/мл). По необходимости фиксированный материал перед окраской мацерировали в смеси целлюлазы и пектолиазы (2 % + 10 %). Препараты анализировали с помощью микроскопов AxioStar и Aksioskop 2 plus; фотоснимки сделаны с использованием камеры AxioCam HRc («Carl Zeiss», Германия).

Для электронной микроскопии пыльники табака фиксировали в 2,5%-ном глютаральдегиде на фосфатном буфере (рН 7,2) в течение 4 ч при комнатной температуре с постфиксацией в 1%-ном OsO₄ («Azurite», РФ) в течение 2 ч при комнатной температуре. Образцы обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации и в ацетоне, затем заключали в эпоксидную смолу Araldite («Fluka», Швейцария) по стандартной методике [32]. Ультратонкие срезы толщиной 80 нм получали с помощью ультрамикротомы Ultracut UCT («Leica», Швейцария). Срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом («Serva», Германия). Окрашенные срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100S («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Электронно-микроскопический анализ выполнен на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН

Результаты исследования. *Внутриклеточные цитомиктические взаимодействия: микроспороциты – микроспороциты.* У исследованных видов однодольных, как и у двудольного растения, микроспороциты (МСЦ) образуют единую ценочитную систему, или континуум (рис. 1, а, б, г), в котором протопласты физически взаимодействуют между собой посредством двух типов межклеточных контактов – плазмодесм и цитомиктических каналов.

Характерной особенностью формирования МСЦ является синтез каллозы, которая, откладываясь между плазмалеммой и клеточной стенкой, перекрывает часть межклеточных контактов, отделяет МСЦ друг от друга, а также от клеток тапетума. Каллоза формирует неравномерные утолщения, более мощные по углам клеток (рис. 1, б, д). В местах тесных контактов и коммуникаций МСЦ каллозная

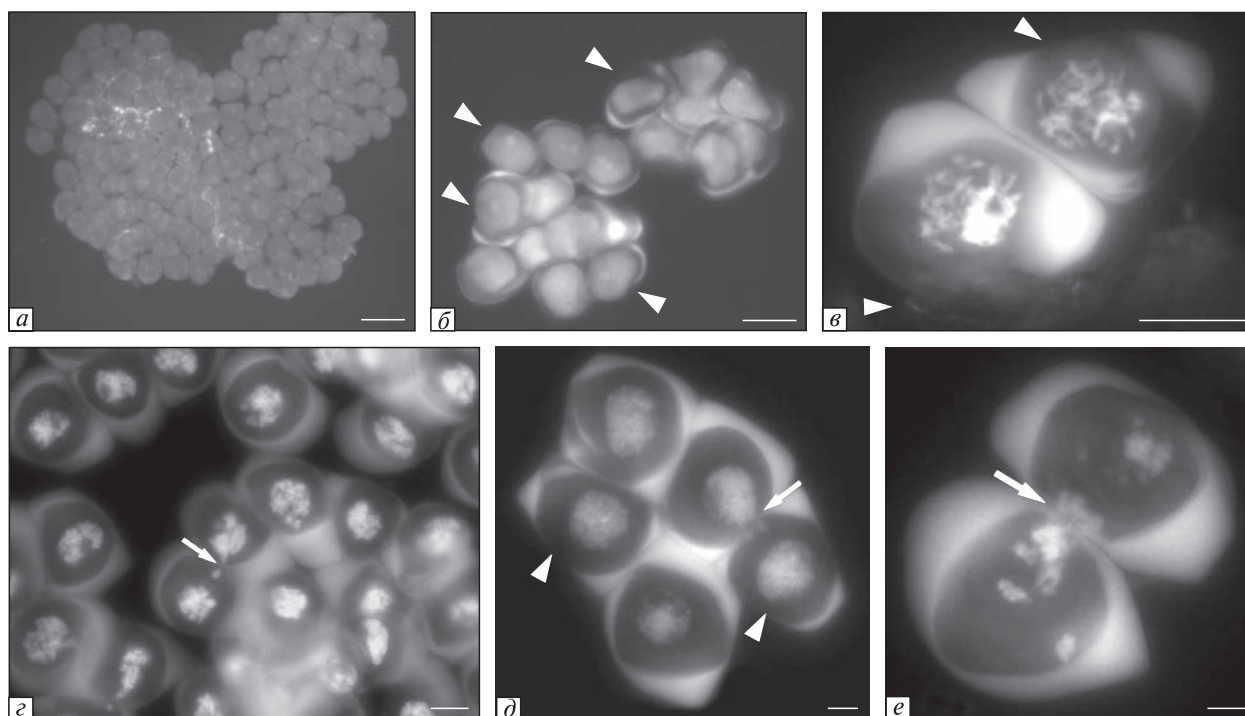


Рис. 1. Сегрегация микроспороцитов и структура каллозных оболочек МСЦ в профазе мейоза у *A. fistulosum* L. (a–e) и *N. tabacum* L. (z–e): a, z – объединение МСЦ в единый континуум; б, в, д, e – неравномерные отложения каллозы вдоль оболочки МСЦ и цепочечные соединения микроспороцитов. Короткими стрелками указаны соединения МСЦ по месту отсутствия или истончения каллозы, длинными – перемещение ядер. Окрашивание анилиновым синим (каллоза) и DAPI (ядра). Масштаб: a – 50 мкм; б – 20 мкм, в–e – 10 мкм

стенка утончается либо подвергается локальному гидролизу (рис. 1, б, в, д, e). Цитомиктические каналы во многих случаях прокладываются и сквозь каллозную стенку МСЦ (рис. 3, a, z и рис. 7, з). Следовательно, данный тип изоляции микроспороцитов является относительным. Каллозные отложения не препятствуют, а скорее регулируют межклеточный транзит, о чем свидетельствуют цитомиктические перемещения ядер на стадии зиготены – пахитены (рис. 1, a, z–e).

Активные цитомиктические миграции в микроспорогенезе у однодольных видов приурочены к зиготене профазы. Перемещениям предшествовала поляризация клеток, а именно смещение ядра с центра на периферию и его плотное прилегание к клеточной стенке (рис. 2, a). Как правило, в цитомиксис вовлекалась лишь часть клеточной популяции МСЦ. В зависимости от числа взаимодействующих между собой МСЦ различали слабые и сильные вза-

имодействия. В первом случае ядра МСЦ сближались и взаимодействовали попарно (рис. 2, a, в). Во втором случае с усилением цитомиксиса и вовлечением в процесс все большего количества клеток парные взаимодействия преобразовывались в цепочечные (рис. 2, б–z). Число участвующих в цитомиксисе МСЦ обычно регулируется каллозными отложениями (рис. 1, б, z, д).

Исследование цитологической картины микроспорогенеза у представителей однодольных позволило выделить два типа цитомиктических взаимодействий между МСЦ – «петельный» и «капельный» (или «микроядерный»). При «петельном» типе взаимодействия ядра МСЦ сближаются и взаимодействуют преимущественно попарно с помощью перемещения отдельных петель хроматина через один или несколько цитомиктических каналов одновременно (рис. 2, б, в). Взаимодействия между МСЦ достаточно быстротечны. По завершении зиготены кон-

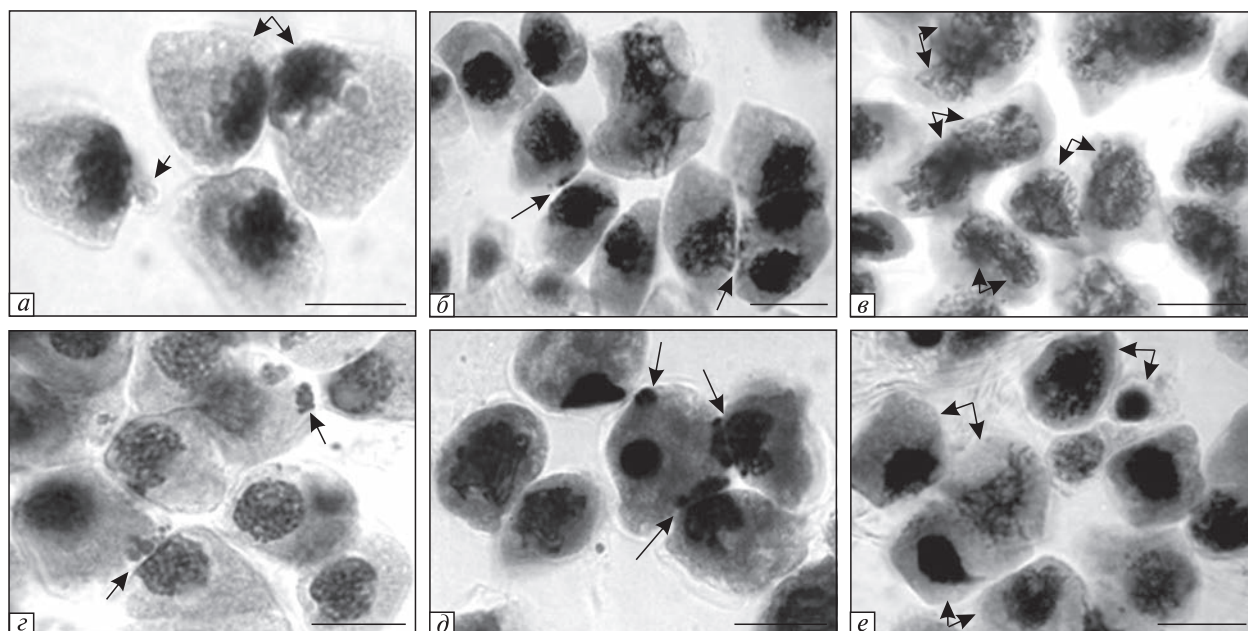


Рис. 2. Взаимодействия между микроспорами в зиготе, *A. fistulosum* (а, в, з), *A. cepa* (б, е) и *L. croceum* (д): а – поляризация МСЦ; б–з – типы «петельного» и «микроядерного» взаимодействия; в – парные и цепочечные петельные взаимодействия; е – дифференциация МСЦ на «доноров» и «акцепторов». Стрелками указаны локализация транзитного хроматина (б, з, д), парные взаимодействия (а, в), доноры и акцепторы (е). Окрашивание а–в, д, е – ацетогематоксилином, з – ацетокармином. Масштаб – 10 мкм

тактирующие ядра обычно расходятся, и микроспоры продолжают мейотическое деление. «Капельный» тип взаимодействий МСЦ осуществляется посредством транслокации микроядер, в которые зачастую вовлекаются многие клетки, образуя цепочечные контакты (рис. 2, з). При этом хроматин в составе ядра перемещается из донорской клетки в клетку-реципиент, формируя микроядра вдоль клеточной стенки напротив цитомиктических каналов, а собственное ядро последней обычно дистанцируется от чужеродного генетического материала, возможно, вследствие возросшего тургора цитоплазмы (рис. 2, з, д). Цепочечные взаимодействия, по-видимому, выравнивают возникающее тургорное неравновесие между МСЦ. При «капельном» типе взаимодействия хроматин ядра клетки-донора и микроядер часто имеет пикнотический вид. Эти изменения, как и миграция хроматина, могут быть и обратимыми, и необратимыми. С интенсификацией цитомиксиса среди МСЦ исследованных видов наблюдается дифференциация на клетки-доноры и клетки-реципиенты. Доноры в большинстве

случаев имеют более плотную структуру хроматина ядра и меньшие размеры как самой клетки, так и ее ядра (рис. 2, е). Возможно клетки-доноры, перемещая часть своего хроматина в клетку-реципиент, в дальнейшем подвергались клеточной гибели. Среди мигрирующего хроматина встречались и ядрышки. Примечательно, что активность цитомиксиса возрастала в редуцированных цветках лилии и лука, где цитолитическими процессами охватывалась большая часть популяции микроспоры, тапетум и средние слои стенки пыльника.

Цитологическая картина цитомиктических взаимодействий между МСЦ в профазе первого деления мейоза у табака (рис. 3) в целом была идентична той, что наблюдалась в мейозе у однодольных. Начало ядерных миграций происходило в зиготе первого деления мейоза, хотя наибольшая активность этого процесса выявлялась в пахитене (рис. 3, а, б). Как и в мейозе у лука и лилии, у табака ядро перед миграцией смещалось к периферии МСЦ и прилегал к клеточной стенке в месте расположения цитомиктического канала (или каналов), причем

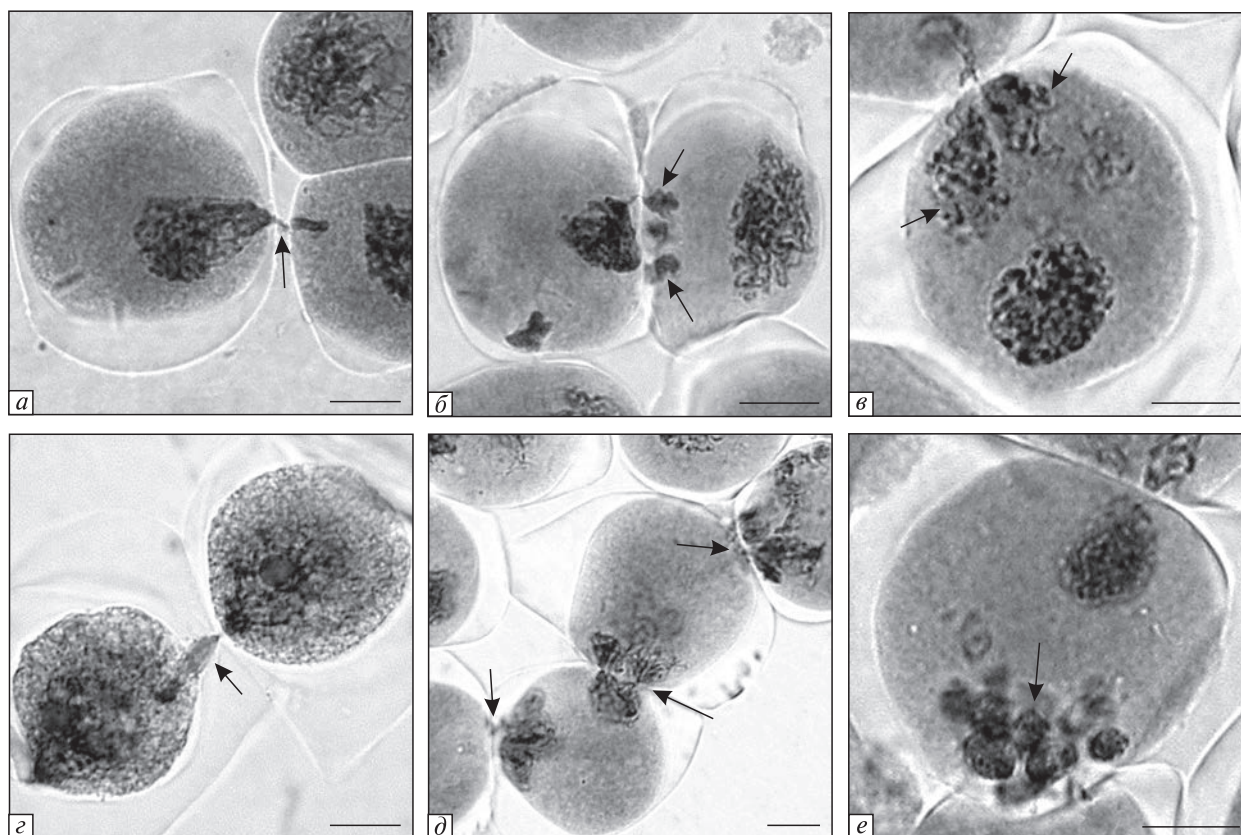


Рис. 3. Взаимодействия между микроспороцитами в профазе первого деления мейоза у табака (*N. tabacum* L.): *a* – поляризация МСЦ, «вытягивание» ядра и его миграция в реципиентную клетку по единичному цитомиктическому каналу; *б* – миграция ядра по нескольким цитомиктическим каналам; *в* – восстановление структуры хроматина в ядре реципиентной клетки; *г* – цитоплазматический мост между двумя МСЦ; *д* – цепочечные взаимодействия, группа МСЦ, объединенных ядрами, мигрирующими в одном направлении; *е* – множественные микроядра в реципиентной клетке. Стрелками указан транзитный хроматин (*a–в*, *д*, *е*) и цитоплазматический мост (*г*). Окрашивание ацетокармином. Масштаб – 10 мкм

довольно часто мигрирующее ядро уплотнялось и вытягивалось в направлении перемещения (рис. 3, *a*). Перемещение хроматина из клетки в клетку в составе ядра происходило по одному (рис. 3, *a*) или сразу нескольким (рис. 3, *б*) цитомиктическим каналам.

Несмотря на сильную компрессию по месту перехода (в цитомиктическом канале), хроматин чаще всего восстанавливал свою структуру (рис. 3, *в*). В некоторых случаях в ходе цитомиктических взаимодействий ядро клетки-реципиента уплотнялось так же, как и ядро клетки-донора (рис. 3, *в*). Часть МСЦ объединялись между собой цитоплазматическими мостами, не имеющими в своем составе перемещающегося хроматина (рис. 3, *г*).

У табака доля МСЦ, участвующих в цитомиктических перемещениях, была невелика и, как правило, ограничивалась парными клеточными взаимодействиями (рис. 3, *a–г*). Однако при интенсификации цитомиксиса парные взаимодействия могли преобразовываться в цепочечные (рис. 3, *д*). Учитывая тот факт, что в межклеточные перемещения вовлекалось любое количество хроматина, вплоть до целого ядра, в цитомиктическом процессе участвовали и ядрышки. Из мигрировавшего хроматина в цитоплазме клетки-реципиента формировались микроядра (рис. 3, *е*), количество которых зависело как от числа каналов, задействованных в перемещениях, так и от числа взаимодействующих клеток.

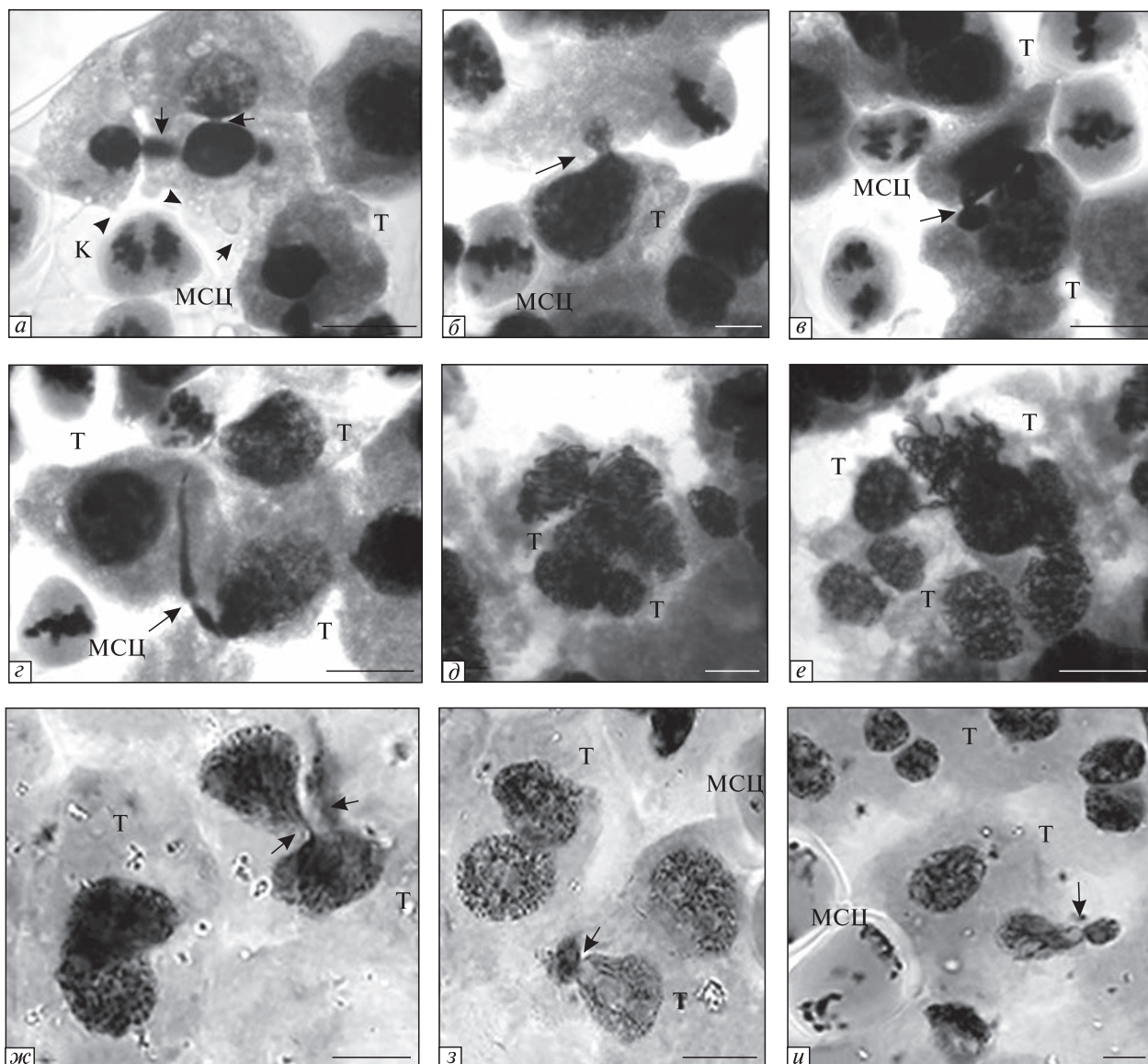


Рис. 4. Межклеточные цитомиктические взаимодействия в тапетуме в ходе микроспорогенеза: *а* – цепочечные взаимодействия тапетальных клеток в мета-телофазе первого деления у *A. fistulosum*, растворение каллозной оболочки МСЦ (указано короткими стрелками); *б–г* – разнообразие форм транслокации хроматина в тапетуме; *д, е* – митозы, образование многоядерных скоплений и синцитиев в тапетуме на стадии профазы I у *L. croceum*; *ж–и* – цитомиктические перемещения ядер в тапетуме в ходе микроспорогенеза у *N. tabacum*: *ж* – двухъядерная клетка и цитомиктическая пара ядер; *з* – ядерная миграция в тапетуме на стадии, соответствующей зиготене – пахитене мейоза; *и* – ядерная миграция в тапетуме на стадии, соответствующей анафазе первого деления мейоза; МСЦ – микроспороциты, Т – тапетальные клетки, К – каллозная оболочка МСЦ, стрелками указано перетекание хроматина. Окрашивание ацетогематоксилином (*а–е*) и ацетокармином (*ж–и*). Масштаб – 10 мкм

Внутриканальные взаимодействия: тапетум – тапетум. Тапетум – ткань, которая непосредственно контактирует с МСЦ и может состо-

ять к началу мейоза из одноядерных, часто полиплоидных, двухъядерных или многоядерных клеток у лилии и лука, и преимуществен-

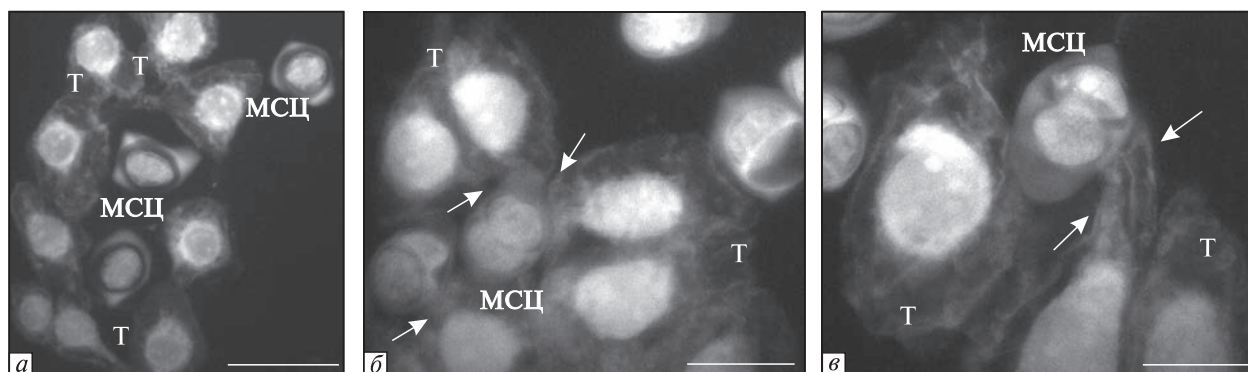


Рис. 5. Межклеточные и межклеточные (микроспороциты – тапетум) взаимодействия в микроспорогенезе у *A. serra*: *a* – микроспороциты в окружении тапетального периплазмодия, *б, в* – образование выпячиваний клетками тапетума, МСЦ в телофазе 2; МСЦ – микроспороциты, Т – тапетальные клетки. Стрелками указаны выпячивания клеток тапетума. Окрасивание анилиновым синим + DAPI. Масштаб – 10 мкм

но из двухъядерных клеток у табака (рис. 4). Для клеток тапетума свойственны свои особенности внутритканевого взаимодействия, основанные на генезисе, метаболизме и собственной ядерной мобильности его клеток. Эти взаимодействия имеют таксонспецифический характер. Клетки тапетума у лилии и лука характеризуются извилистым контуром оболочки, часто формируют выпячивания и межклеточные мосты в сторону микроспороцитов (рис. 5, *a–в*). Первая волна литической активности в тапетуме и его «периплазмодизация» у однодольных разворачивались рано, в зиготене профазы, достигая наибольшей активности к завершению первого деления мейоза МСЦ (рис. 4, *a–г*). При этом наблюдались неупорядоченные митозы, сложные формы перетекания хроматина и ядерных сливаний, образование гантелевидных, высокоплоидных ядер, многоядерных конгломератов и синцитиев (рис. 4, *a–г*). Прямые миграции хроматина иногда охватывали по несколько клеток (рис. 4, *a, г*). В миграцию вовлекались и множественные ядрышки полиплоидных ядер. Примечательно, что в мета-анафазе первого деления мейоза МСЦ оказываются изолированными друг от друга утолщенными каллозными стенками и гребнями, однако у них может сохраняться связь с клетками тапетума, которые внедряются в пространство МСЦ и локально растворяют каллозу по месту контакта с ними (рис. 4, *a*). Это свидетельствует о каллазной гидролитической

активности тапетальных клеток еще в начале микроспорогенеза.

В микроспорогенезе у линии SR1 табака цитомиктические взаимодействия обычно проявлялись на фоновом уровне и характеризовались как слабый цитомиксис. Тем не менее в некоторых случаях при спонтанном усилении цитомиксиса можно было наблюдать ядерные миграции между клетками тапетума на стадии, соответствующей профазе, а также на мобильных стадиях мейоза (рис. 4, *ж–и*). Цитомиктическим перемещениям могли подвергаться как оба ядра в двухъядерной тапетальной клетке (рис. 4, *ж*), так и одно из двух ядер (рис. 4, *з, и*). Очевидно, что в цитомиксисе участвовали и ядрышки. Довольно часто на давленных препаратах границы клеток тапетума установить сложно (рис. 4, *д–ж*), поэтому весьма проблематично говорить о том, разрушаются ли хотя бы частично стенки тапетальных клеток при цитомиксисе. Тот факт, что мигрирующие ядра имеют весьма характерную форму (с перетяжкой) (рис. 4, *a–г, ж–и*), свидетельствует о том, что в процессе перемещения в цитомиктическом канале они испытывают компрессию так же, как и в случае с МСЦ (рис. 3, *a, д*).

Межклеточные взаимодействия: тапетум – микроспороциты. У лилии и лука инициация межклеточных взаимодействий в клеточной системе тапетум – МСЦ коррелировала с активизацией цитомиксиса между микроспороцитами. Однако тесные взаимодействия между МСЦ и тапетумом существуют в течение все-

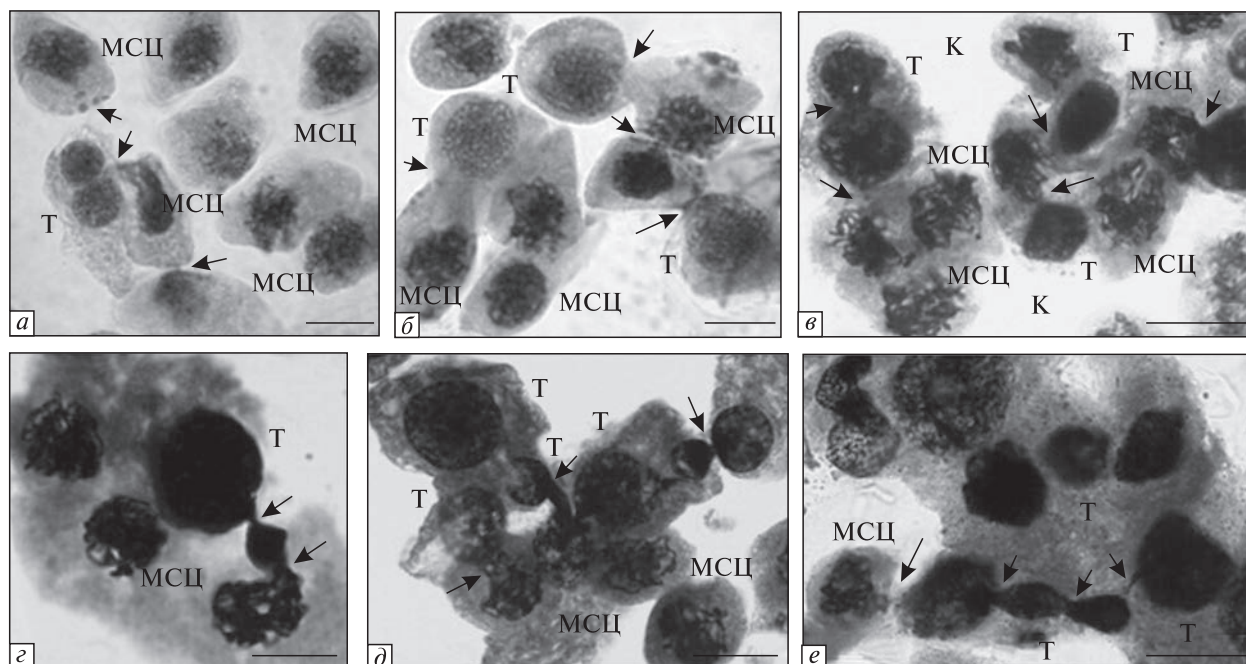


Рис. 6. Межклеточные (микроспороциты – тапетум) взаимодействия в микроспорогенезе у *A. sera* (а–в) и *L. croceum* (г–е): а – цепочечные взаимодействия и транслокация хроматина в двухъядерную тапетальную клетку; б–д – взаимодействия между тапетальными клетками и МСЦ в зиготене; г–е – сложные каскадные формы межклеточной транслокации хроматина в зиготене; МСЦ – микроспороциты, Т – тапетальные клетки, К – каллозная оболочка МСЦ, стрелками указаны клеточные контакты и перемещение хроматина. Окрашивание ацетокармином (а, б) и ацетогематоксилином (г–е). Масштаб – 10 мкм

го микроспорогенеза (рис. 5 и 6). Эти взаимодействия сопровождались формированием клеточных выростов и ядерных мостов между клетками тапетума и МСЦ.

Часть клеток тапетума уже в зиготене распределялись между МСЦ (рис. 4 и 5). В ходе взаимодействий между клетками тапетума и МСЦ происходила транслокация хроматина, которая иногда приобретала сложный каскадный характер, захватывая по несколько ядер (рис. 6, б–г). Вопреки ожиданию перетекание хроматина, по крайней мере в большинстве случаев, было направлено от МСЦ к ядрам тапетальных клеток (рис. 6, а–е). В сложные цепочечные формы транслокаций обычно вовлекались высокоплоидные ядра тапетума, способные аттрагировать хроматин из окружающих клеток, включая МСЦ. Особенно сложные формы транслокаций хроматина свойственны межклеточным взаимодействиям у лилии (рис. 6, г–е). Одним из факторов, инициирующим межклеточные взаимодействия, воз-

можно, является гидролитическая (каллазная) активность тапетальных клеток.

Примечательно, что в микроспorangии табака линии SR1, ни при каком уровне цитомиксиса, в раннем микроспорогенезе не наблюдалось межклеточных взаимодействий. Несмотря на тесные контакты между МСЦ и клетками тапетума, цитомиктических перемещений ядер и ядерного материала в ту или другую сторону не происходило.

Ультраструктурный анализ клеточных контактов. Представлялось интересным провести ультраструктурное исследование межклеточных контактов МСЦ и тапетума у линии табака, поскольку на светооптическом уровне у него не было обнаружено межклеточных взаимодействий.

Наличие цитомиктических каналов, обеспечивающих прямые цитоплазматические контакты между клетками, является необходимым условием цитомиксиса. В ходе ультраструктурного анализа цитомиктические каналы и сопутствующие им внутритканевые цитомиктические

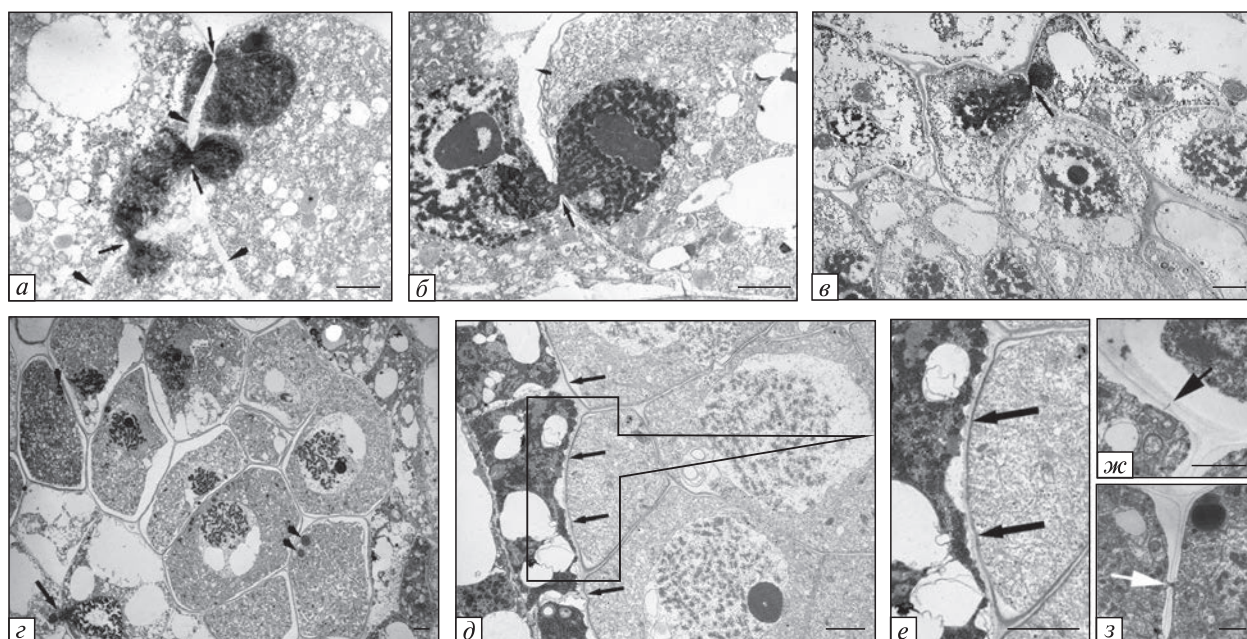


Рис. 7. Ультраструктурный анализ клеточных контактов в вегетативных и генеративных тканях пыльника на стадии профазы I мейоза у растений табака: *a, б* – цитомиксис между клетками тапетума (длинные стрелки), клеточная стенка (длинная стрелка); *в* – цитомиксис в клетках средних слоев стенки пыльника (стрелка); *г* – цитомиксис в клетках тапетума (длинная стрелка), микроядра в микроспороците (короткие стрелки); *д* – граница контакта (стрелки) микроспороцитов с клетками тапетума; *е* – граница контакта, увеличенный фрагмент; *ж* – плазмодесма (стрелка); *з* – цитомиктический канал между микроспороцитами. Масштаб – 2 мкм

кие контакты были выявлены только между клетками тапетума (рис. 7, *a, б, г*) и между микроспороцитами. Межтканевых взаимодействий между МСЦ и клетками тапетума у растений табака нами не выявлено. Клеточные стенки МСЦ представляют собой четкую границу между клетками генеративной и питающей ткани (рис. 7, *д, е*). На основании результатов исследования серии ультратонких срезов, полученных с разных образцов тканей пыльников табака, установлено, что в клеточной стенке МСЦ в начале мейоза отсутствуют какие-либо типы контактов с клетками тапетума (рис. 7, *е*). В то же время оба типа клеточных контактов, как плазмодесмы (рис. 7, *ж*), так и цитомиктические каналы (рис. 7, *з*), можно было наблюдать между МСЦ. Кроме тапетума, цитомиксис обнаруживался и в средних слоях стенки пыльника (рис. 7, *в*).

Обсуждение полученных данных. У исследованных в настоящей работе видов одно- и двудольных растений цитомиксис является спон-

таным естественным процессом, свойственным микроспорогенезу. Несмотря на некоторые, вероятно таксонспецифические отличия, в цитологической картине цитомиксиса у однодольных и двудольных видов прослеживаются общие определенные закономерности. Так, основные цитомиктические события наблюдаются в зиготене – пахитене профазы мейоза, когда МСЦ активно обособляются друг от друга и от тапетальной ткани каллозной стенкой [33]. Однако образование каллозных оболочек у МСЦ в начале микроспорогенеза не препятствует цитомиксису, поскольку в местах тесных контактов и коммуникаций МСЦ, где собственно и наблюдаются ядерные миграции, отложения каллозы минимизированы либо подвергаются локальному гидролизу, не блокируя проходимость цитомиктических каналов [6, 15, 34]. Что касается отложения каллозы со стороны тапетума, то в норме у злаков в МСЦ, образующих в пыльнике монослой вдоль тапетума, каллоза по месту контакта с тапетумом не от-

кладывается [35 и др.]. Тем не менее при стрессовых воздействиях (температурном, засухе, облучении) у некоторых видов злаков (ячмень) в стенках МСЦ уже на этапе раннего микроспорогенеза усиливается синтез каллозы, которая блокирует межклеточные и межтканевые взаимодействия, изолирует синцитиальные образования и, по-видимому, ограничивает распространение цитолитических процессов в пыльнике [36].

Интенсивность спонтанного цитомиксиса в МСЦ в пределах вида, индивидуума и даже одного пыльника может варьировать, что является характерной особенностью данного типа межклеточных взаимодействий [1, 8, 20, 37]. Цитомиксис может ограничиваться кратковременными парными петельными взаимодействиями хроматина между МСЦ в зиготене, по завершению которых контактирующие ядра возвращаются в центральную часть своих клеток, где продолжают мейотическое деление. У изученных нами видов растений повышение цитомиктической активности в микроспорогенезе сопровождалось преобразованием парных клеточных контактов в сложные цепочечные взаимодействия, охватывающие по несколько клеток. Известно, что цитомиктические каналы по своей структуре являются цитоплазматическими мостами [6, 34, 37], через которые вместе с ядром или без его участия может перемещаться и часть цитоплазмы с органеллами, увеличивая объем реципиентной клетки. Учитывая этот факт, а также дистанцирование собственного ядра реципиентной клетки от мигрирующего хроматина, можно предполагать, что образование цепочечных контактов является результатом выравнивания тургорного неравновесия, возникающего при цитомиксисе.

Очевидным результатом цитомиксиса в профазе мейоза является образование микроядер в реципиентных МСЦ. Судьбу такого «экстра» хроматина проследить довольно трудно, как и судьбу самих цитомиктических клеток. Поскольку мигрирующий в составе ядра хроматин не повреждается, то он может сохранять свою функциональную активность [22, 23]. Возможно, гипохромосомные МСЦ, потерявшие в процессе цитомиксиса большую часть хроматина, подлежат избирательной клеточной гибели. Однако на молекулярном уровне характерных

признаков апоптоза у мигрирующего хроматина не обнаружено даже при массовом цитомиксисе [23]. Не исключено, что гипохромосомные МСЦ подвергаются гибели по иному, неапоптозному механизму, как это предполагается в контексте реализации клеточной конкуренции у животных [38].

Успешное развитие мужской репродуктивной сферы покрытосеменных включает ряд ключевых событий, одним из которых являются межклеточные взаимодействия тапетума и МСЦ [39–41]. Поскольку тапетум – ближайшая к МСЦ питающая ткань, то от нее во многом зависят их генезис, функции и в целом фертильность мужской генеративной системы. Помимо снабжения МСЦ пластическими веществами, клетки тапетума секретируют различные полисахариды и ферменты, в частности каллазу, ключевой фермент, детерминирующий освобождение молодых микроспор из каллозных оболочек [42–43]. В связи с этим вопрос о характере структурных и метаболических связей между этими тканями весьма актуален.

На сегодняшний день исследования цитомиксиса между клетками тапетума и МСЦ практически отсутствуют. Направленная миграция хроматина от тапетума к микроспорцитам была отмечена еще в ранних работах на лилии и традесканции [44–46]. Значение такого типа межтканевых взаимодействий для микроспорогенеза высших растений осталось не вполне понятным. Считается, что эндополиплоидизация, неупорядоченность митозов и ядерные слияния в тапетуме – нормальный этап его развития и физиологической активности. Однако выявленные нами в тапетуме у однодольных видов растений сложные формы межклеточного перемещения хроматина с формированием ядер разного уровня ploidy, в том числе гигантских, могут отражать и другие процессы. У лилии и лука в сравнении с табаком дифференциация и полиплоидизация тапетума сопровождаются внедрением тапетальных клеток на «территорию» МСЦ, освобождением ими гидролитических ферментов, что может оказывать негативное воздействие на МСЦ. Действительно, появление прямых межтканевых взаимодействий и ядерных транслокаций между тапетумом и МСЦ коррелирует с активизацией цитомиксиса в МСЦ.

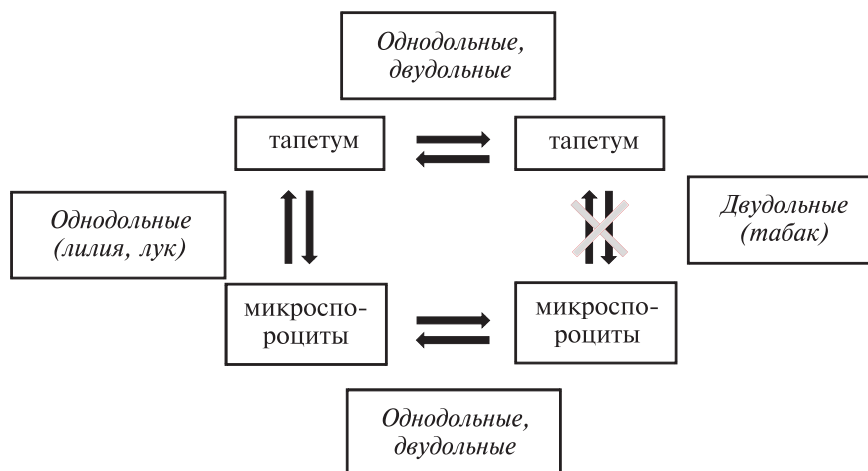


Рис. 8. Схема внутри- и межтканевых цитомиктических взаимодействий в микроспорогенезе у однодольных и двудольных видов покрытосеменных

В последние десятилетия появился ряд работ, в которых рассматриваются молекулярные механизмы дифференциации тканей пыльника. Так, ключевую роль в формировании монослоса клеток тапетума у *Arabidopsis* играет богатая лейцином рецепторная протеинкиназа (LRR-RPK), кодируемая геном EXCESS MICROSPOROCTES1 [47, 48]. На охарактеризованном в этой работе мутанте арабидопсиса *ems1*, в котором продуцируется избыток МСЦ и отсутствуют клетки тапетума, показано, что между тапетумом и МСЦ существует конкуренция за пространство, в результате чего регулируются размеры, форма ткани, число МСЦ и тапетальных клеток. Пыльник рассматривается как орган, в котором каждая ткань развивается соподчиненно с окружающими тканями. Показано, что редукция количества тапетальных клеток сопровождалась возрастанием количества МСЦ, и наоборот, восстановление тапетума у мутанта подавляло пролиферацию спорогенных клеток и ограничивало численность МСЦ. В этой связи межтканевые транслокации, обнаруженные нами в ходе спонтанного цитомиксиса у лилии и лука, могут быть отражением конкурентных отношений за пространство в пыльнике, причем полиплоидные ядра тапетума и синцитии как мощные акцепторы успешно конкурируют с МСЦ, направляя транслокацию хроматина в свою сторону. Этим может объясняться необходимость образования каллозных оболочек

вокруг МСЦ, защищающих от воздействия со стороны тапетальных клеток. По-видимому, активные межтканевые взаимодействия в ранней профазе мейоза у однодольных являются видоспецифической особенностью дифференциации микроспорангия, который, как известно, отличается крупными размерами и избыточным количеством микроспороцитов [4]. Отсутствие межтканевых взаимодействий в микроспорогенезе у двудольных, в частности табака, свидетельствует о большей сбалансированности размеров генеративной и соматической тканей при дифференциации пыльника.

Молекулярные механизмы внутри- и межтканевых цитомиктических взаимодействий остаются слабо изученными. Однако исследования последних лет выявлена ведущая роль молекулярных регуляторов и сигнальных молекул, таких как рецептор-подобные киназы, гликопротеины, транскрипционные факторы, мРНК и гормоны, в обеспечении двунаправленных структурных и метаболических связей между тапетальной и спорогенной тканью на всех этапах микроспорогенеза [41]. Можно предположить, что активацию цитомиксиса в МСЦ как на внутритканевом, так и на межтканевом уровнях может обеспечивать какой-то молекулярный триггерный сигнал. Примером тому служит белок (гликопротеин) MTR1, запускающий в микроспорогенезе риса программируемую клеточную гибель клеток тапетума, хотя экспрессия гена, который его кодирует, нако-

пление транскрипта и собственно белка происходят исключительно в МСЦ и тетрадах [49].

Итак, суммируя полученные нами данные (рис. 8), можно заключить, что цитомиксис в пыльнике является элементом преимущественно внутритканевого взаимодействия. В тапетуме цитомиксис отличается структурными и временными таксоноспецифическими особенностями. В МСЦ ядерные миграции приурочены в основном к зиготене — пахитене и характеризуются определенным синхронизмом с цитомиксисом в тапетуме. Основная волна цитомиктической активности в тапетуме однодольных разворачивается по ходу первого деления мейоза МСЦ. Межтканевые цитомиктические взаимодействия (тапетум — микроспорocytes) обнаружены лишь в микроспорогенезе однодольных. Несмотря на преимущественную миграцию хроматина от МСЦ к полиплоидным тапетальным ядрам, векторность перемещения ядерного материала, очевидно, может меняться в зависимости от этапа дифференциации пыльника и стадии микроспорогенеза. Предполагается, что появление межтканевых взаимодействий обусловлено обострением конкурентных отношений между тапетумом и микроспорocytes за пространство при дифференциации тканей пыльника. Полиплоидные ядра тапетума и синцитии, будучи мощными акцепторами, способны конкурировать с МСЦ и направлять транслокацию хроматина в свою сторону. Каллозные отложения на стенках МСЦ не только регулируют межклеточные взаимодействия, но и защищают инициалы мужских гамет от гидролитической активности со стороны соматических тканей пыльника. Отсутствие межтканевых цитомиктических взаимодействий в раннем микроспорогенезе табака, вероятно, свидетельствует о лучшей сбалансированности процессов дифференциации генеративной и соматической тканей пыльника у двудольных по сравнению с однодольными.

Работа выполнена при поддержке проекта «Изучение формирования и функционирования цитомиктических каналов в вегетативных и генеративных клетках растений» в рамках совместного конкурса научных проектов НАН Украины и Российского фонда фундаментальных

исследований 2014–2015 гг. (грант НАН Украины № 46-04-14 для украинской стороны и грант РФФИ № 14-04-90414-Укр_а для российской стороны), а также при поддержке бюджетного проекта СО РАН, № 0324-2014-0017) — для российской стороны.

INTRA- AND INTERTISSULAR CYTOMIC TIC INTERACTIONS IN MICROSPOROGENESIS OF MONO- AND DICOTYLEDONOUS PLANTS

E.A. Kravets, Yu.V. Sidorchuk, I.I. Horyunova, S.H. Plohovskaya, S.R. Mursalimov, E.V. Deineko, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: kravetshelen@gmail.com

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

A comparative cytological analysis of intra- and intertissular cytomictic interactions in early microsporangogenesis of mono- and dicotyledonous plants was performed by the example of the two cellular systems — microsporocytes and tapetum. It is found that cytomixis is the component of intratissular interactions mainly. In the tapetum cells cytomixis is notable for structural and temporary taxon specific features. The nuclear migration in microsporocytes is confined mainly to zygotene-pachytene meiotic stages and characterized by a certain synchronism with cytomixis at the tapetum. Intertissular cytomictic interactions (tapetum — microsporocytes) were found in the monocot anthers only. Intertissular interactions are likely to reflect the intensification of competitive relations between the tapetum and microsporocytes for area in the process of anther tissue differentiation. Polyploid tapetum nucleus and syncytia being powerful acceptors are able to compete with microsporocytes and direct the chromatin translocation to their favor. The absence of intertissular interactions in dicots probably reflects a better balance between the processes of differentiation at somatic and generative tissues into microsporangium compared to monocots.

ВНУТРІШНЬОТКАНИННІ ТА МІЖТКАНИННІ ЦИТОМІКТИЧНІ ВЗАЄМОДІЇ В МІКРОСПОРОГЕНЕЗІ ОДНО- ТА ДВОДОЛЬНИХ РОСЛИН

О.А. Кравець, Ю.В. Сидорчук, І.І. Горюнова, С.Г. Плоховська, С.Р. Мурсалімов, О.В. Дейнеко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм

Проведено порівняльний цитологічний аналіз внутрішньо- та міжтканинних цитоміктичних взаємодій в ранньому мікроспорогенезі одно- та дводольних рослин на прикладі двох клітинних систем —

мікроспороцитів і тапетума. Встановлено, що цитоміксис є елементом переважно внутрішньотканинної взаємодії. У тапетумі цитоміксис відрізняється структурними та часовими таксоноспецифічними особливостями. В мікроспороцитах основні ядерні міграції відбуваються в зиготені – пахітені та характеризуються певним синхронізмом з цитоміксисом у тапетумі. Міжтканинні цитоміктичні взаємодії (тапетум – мікроспороцити) виявлені лише в пиляках однодольних. Міжтканинні взаємодії, ймовірно, відображають загострення конкурентних відносин між тапетумом і МСЦ за простір в процесі диференціації тканин пиляка. Поліплоїдні ядра тапетума та синцитії як потужні акцептори здатні конкурувати з МСЦ та спрямовувати транслокацію хроматину в свій бік. Припускається, що відсутність міжтканинних взаємодій у дводольних відображає кращу збалансованість процесів диференціації соматичних та генеративних тканин мікроспорангія в порівнянні з однодольними.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Heslop-Harrison, J., Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes, *Ann. Bot.*, 1966, vol. 30, no. 2, pp. 221–230.
- Yen, C., Yang, J.-L., and Sun, G.-L., Intermeiocyte connections and cytomixis in intergeneric hybrids of *Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski with *Psathyrostachys huashanica* Keng, *Cytologia*, 1993, vol. 58, no. 2, pp. 187–193.
- Feijo, J.A., and Pais, M.S., Cytomixis in meiosis during the microsporogenesis of *Ophrys lutea*: an ultrastructural study, *Caryologia*, 1989, vol. 42, no. 1, pp. 37–48.
- Herrero, M., Male and female synchrony and regulation of mating in flowering plants, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2003, vol. 358, no. 1434, pp. 1019–1024.
- Guo G.-Q., and Zheng, G.-C., Hypothesis for functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms, *J. Theor. Biol.*, 2004, vol. 229, no. 1, pp. 139–146.
- Mursalimov, S.R., Baiborodin, S.I., Sidorchuk, Yu.V., Shumny, V.K., and Deineko, E.V., Characteristics of the cytomictic channel formation in *Nicotiana tabacum* L. pollen mother cells, *Cytol. Genet.*, 2010, vol. 44, no. 1, pp. 14–18.
- Pierre, P.M., and de Souza, S.M., Citomixia em plantas: causas, mecanismos e consequências, *R. Brasil. Bioci.*, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 231–240.
- Mursalimov, S.R., Sidorchuk, Y.V., and Deineko, E.V., New insights into cytomixis: specific cellular features and prevalence in higher plants, *Planta*, 2013, vol. 238, no. 3, pp. 415–423.
- Mantu, D.E., and Sharma, A.K., Cytomixis in pollen cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (L.) Alston, *Cytologia*, 1982, vol. 48, pp. 201–207.
- Singhal, V.K., and Gill, B., Cytomixis in some woody species, *Biologica*, 1985, vol. 1, pp. 168–175.
- Bedi, Y.S., Cytomixis in woody species, *Proc. Indian Acad. Sci.*, 1990, vol. 100, no. 4, pp. 233–238.
- De Souza, A.M., and Pagliarini, M.S., Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae), *Cytologia*, 1997, vol. 62, no. 1, pp. 25–29.
- De Oliveira, V.M., Forni-Martins, E.R., Magalhães, P.M., and Alves, M.N., Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae), *Genet. Mol. Biol.*, 2004, vol. 27, no. 2, pp. 215–222.
- Lattoo, S.K., Khan, S., Bamotra, S., and Dhar, A.K., Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.— an additional strategy and possible implications, *J. Biosci.*, 2006, vol. 31, no. 5, pp. 629–637.
- Sidorchuk, Yu.V., Deineko, E.V., and Shumny, V.K., Peculiarities of the cytomixis in the pollen mother cells of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) with mutant phenotype, *Cytology*, 2007, vol. 49, no. 10, pp. 870–875.
- Kumar, P., and Singhal, V.K., Cytology of *Caltha palustris* L. (Ranunculaceae) from cold regions of Western Himalayas, *Cytologia*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 137–143.
- Kravets, E., The role of cell selection for pollen grain fertility after treatment of barley sprouts (*Hordeum distichum* L.) with UV-B irradiation, *Acta Biol. Sloven.*, 2011, vol. 54, no. 2, pp. 31–41.
- Kravets, E.A., Zelena, L.B., Zabara, E.P., and Blume, Ya.B., Adaptation strategy of barley plants to UV-B radiation, *Emir. J. Food Agric.*, 2012, vol. 24, no. 6, pp. 632–645.
- Zheng, G.C., Yang, Q., and Zheng, Y., The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in Lily, *Caryologia*, 1987, vol. 40, no. 3, pp. 243–259.
- Bellucci, M., Roscini, C., and Mariani, A., Cytomixis in the pollen mother cells of *Medicago sativa* L., *Heredity*, 2003, vol. 94, no. 6, pp. 512–516.
- Liu, H., Guo, G.-Q., He, Y.-K., Lu, Y.-P., and Zheng, G.-C., Visualization on intercellular movement of chromatin in intact living anthers of transgenic tobacco expressing histone 2B-CFP Fusion Protein, *Caryologia*, 2007, vol. 60, no. 1–2, pp. 1–20.
- Mursalimov, S.R., Sidorchuk, Y.V., Baiborodin, S.I., and Deineko, E.V., Distribution of telomeres in the tobacco meiotic nuclei during cytomixis, *Cell Biol. Int.*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 491–495.
- Mursalimov, S., Permyakova, N., Deineko, E., Hou-

- ben, A., and Demidov, D., Cytomixis doesn't induce obvious changes in chromatin modifications and programmed cell death in tobacco male meiocytes, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 12, no. 6, p. 846.
24. Otto, S.P., and Hastings, I.M., Mutation and selection within the individual, *Genetica*, 1998, vol. 102–103, no. 1–6, pp. 507–524.
 25. Falistocco, E., Tosti, N., and Falcinelli, M., Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of $2n$ gametes, *J. Hered.*, 1995, vol. 86, no. 6, pp. 448–453.
 26. Bione, N.C.P., Pagliarini, M.S., and de Toledo, J.F.F., Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties, *Genet. Mol. Biol.*, 2000, vol. 23, no. 3, pp. 623–631.
 27. Ghaffari, S.M., Occurrence of diploid and polyploidy microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytomixis, *Afr. J. Biotech.*, 2006, vol. 5, no. 16, pp. 1450–1453.
 28. Malallah, G.A., and Attia, T.A., Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (Brassicaceae), *Bot. J. Linn. Soc.*, 2003, vol. 143, no. 2, pp. 169–175.
 29. Singhal, V.K., Rana, P.K., and Kumar, P., Syncytes during male meiosis resulting in $2n$ pollen grain formation in *Lindelofia longiflora* var. *falconeri*, *J. Syst. Evol.*, 2011, vol. 49, no. 5, pp. 406–410.
 30. Fuentes, I., Stegemann, S., Golczyk, H., Karcher, D., and Bock, R., Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species, *Nature*, 2014, vol. 511, no. 7508, pp. 232–235.
 31. Sidorchuk, Y.V., Novikovskaya, A.A., and Deineko, E.V., Cytomixis in the cereal (Gramineae) microsporogenesis, *Protoplasma*, 2016, vol. 253, no. 2, pp. 291–298.
 32. Carde, J.-P., Electron microscopy of plant cell membranes, *Plant Cell Membranes. Vol. 148. Methods in Enzymology*, eds L. Parker, R. Douce, San Diego, Acad. Press Inc., 1987, pp. 599–622.
 33. Matsuo, Y., Arimura, S., and Tsutsumi, N., Distribution of cellulosic wall in the anthers of *Arabidopsis* during microsporogenesis, *Plant Cell Rep.*, 2013, vol. 32, no. 11, pp. 1743–1750.
 34. Wang, X.Y., Yu, C.H., Li, X., Wang, C.Y., and Zheng, G.C., Ultrastructural aspects and possible origin of cytomictic channels providing intercellular connection in vegetative tissues of anthers, *Rus. J. Plant Physiol.*, 2004, vol. 51, pp. 97–106.
 35. Romanov, I.D. Features of development of pollen grains and their significance for some genetic research, *Genetics*, 1970, vol. 6, no. 10, pp. 11–25.
 36. Kravets, E.A., Cytomixis and its role in the regulation of plant fertility, *Rus. J. Develop. Biol.*, 2013, vol. 44, no. 3, pp. 113–128.
 37. Wang, X.Y., Nie, X.W., Guo, G.Q., Pan, Y.F., and Zheng, G.C., Ultrastructural characterization of the cytoplasmic channel formation between pollen mother cells of David lily, *Caryologia*, 2002, vol. 55, no. 2, pp. 161–169.
 38. Adachi-Yamada, T., and O'Connor, B., Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: cell competition and morphogenetic apoptosis, *J. Biochem.*, 2004, vol. 136, no. 1, pp. 13–17.
 39. Holford, P., Croft, J., and Newbury, H.J., Structural studies of microsporogenesis in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.) containing the cms-S cytoplasm, *Theor. Appl. Genet.*, 1991, vol. 82, no. 6, pp. 745–755.
 40. Zhang, D., Luo, X., and Zhu, L., Cytological analysis and genetic control of rice anther development, *J. Genet. Genom.*, 2011, vol. 38, no. 9, pp. 379–390.
 41. Zhang, D., and Yang, L., Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2014, vol. 17, pp. 49–55.
 42. Stieglitz, H., and Stern, H., Regulation of β -1,3-glucanase activity in developing anthers of *Lilium*, *Dev. Biol.*, 1973, vol. 34, no. 1, pp. 169–173.
 43. Rhee, S.Y., and Somerville, C.R., Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of pollen mother cell wall, *Plant J.*, 1998, vol. 15, no. 1, pp. 79–88.
 44. Cooper, D.C., The transfer of desoxyribose nucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at the onset of meiosis, *Amer. Natur.*, 1952, vol. 86, no. 829, pp. 219–229.
 45. Takats, S.T., Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis, *Chromosoma*, 1959, vol. 10, pp. 430–453.
 46. Takats, S.T., An attempt to detect utilization of DNA breakdown products from the tapetum for DNA synthesis in macrospores of *Lilium longiflorum*, *Amer. J. Bot.*, 1962, vol. 49, no. 7, pp. 748–758.
 47. Zhao, D.Z., Wang, G.F., Speal, B., and Ma, H., The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther, *Genes Dev.*, 2002, vol. 16, no. 15, pp. 2021–2031.
 48. Feng, X., and Dickinson, H.G., Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the *Arabidopsis* anther, *Development*, 2010, vol. 137, no. 14, pp. 2409–2416.
 49. Tan, H., Liang, W., Hu, J., and Zhang, D., MTR1 encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice, *Dev. Cell*, 2012, vol. 22, no. 6, pp. 1127–1137.

Поступила 12.12.15