

ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧКОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В МЕЙОЗЕ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ. IX. ЗАВЕРШЕНИЕ ЦИКЛА. ПЕРЕХОД ОТ ФРАГМОПЛАСТА К ИНТЕРФАЗНОЙ СИСТЕМЕ ЦИТОСКЕЛЕТА

© Н. В. Шамина, Ю. В. Сидорчук, Н. В. Дорогова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: shamina@bionet.nsc.ru

Проведено исследование завершающего этапа цикла реорганизации цитоскелета в мейозе растительной клетки — перехода от фрагмопласта к интерфазному радиальному цитоскелету после окончания цитокинеза. Проанализирован мейоз дикого типа у ряда видов однодольных растений с последовательным цитокинезом и ряда видов двудольных с одновременным цитокинезом. Выявлено и изучено несколько аномалий цитоскелета на этой стадии в мейозе у мейотических мутантов, гаплоидов и отдаленных гибридов различных видов. Впервые описан ряд процессов перехода цитоскелета от фрагмопласта к интерфазной конфигурации в мейозе: разъединение и укорочение микротрубочек (МТ) фрагмопласта, роль дочерних клеточных мембран. Сделан вывод о независимости формирования интерфазного радиального цитоскелета от предыдущих этапов цитоскелетного цикла, а также от цикла преобразований ядерной оболочки.

Ключевые слова: цитоскелет, микротрубочки, фрагмопласт, ядерная оболочка, мейоз, деление растительной клетки, мейотические мутанты.

Завершение цикла реорганизации цитоскелета и восстановление его интерфазной конфигурации в ходе деления растительной клетки в настоящее время изучено недостаточно и является предметом дискуссий (Vauhn, Harper, 1998). В делении бесстеночных растительных клеток, таких как мейоциты или эндосперм, этот этап практически не изучен. Проблема механизмов этого «завершающего этапа» особенно интересна в растительной клетке, поскольку последняя лишена морфологически идентифицируемой центросомы. После полной автономизации дочерних клеток в результате цитокинеза необходимо, чтобы в них была восстановлена первоначальная «масса цитоскелета», т. е. сформировалось необходимое количество микротрубочек (МТ) на умножившихся центрах организации МТ (ЦОМТ). В делении животной клетки за этим процессом можно проследить, наблюдая ход центрального цикла — удвоение центриоли и умножение перичентриолярного материала (ЦОМТ) (Kellogg et al., 1994). В растительной клетке проследить за поведением ЦОМТ в ходе клеточного деления пока не удается (Lambert, Lloyd, 1994). Можно полагать, что такое свидетельство активности ЦОМТ, как появление новых систем МТ или их исчезновение, дает новую информацию о механизмах, управляющих реорганизацией цитоскелета в растительной клетке на морфологическом уровне.

В настоящей работе исследуется этап перехода цитоскелета от конфигурации фрагмопласта к интерфазной системе. В материнских клетках пыльцы (МКП) интерфазная конфигурация микротрубочкового цитоскелета представляет собой пучки МТ, радиально отходящие от поверхности ядерной оболочки (Franklin, Cande, 1999).

Этот переход является завершающим этапом цикла цитоскелета как в первом, так и во втором мейотическом делении. Цитокинез в мейозе у видов однодольных и двудольных растений происходит различным образом. В МКП большинства однодольных разделение цитоплазмы происходит последовательно после каждого деления мейоза (последовательный цитокинез), а у большинства двудольных 4 дочерних ядра автономизируются одновременно в телофазе второго мейотического деления (одновременный цитокинез). Можно ожидать поэтому, что и завершающий этап цикла реорганизации цитоскелета в мейозе будет у них происходить различным образом. Мы исследовали и сравнили между собой этапы перехода цитоскелета от фрагмопласта к радиальному цитоскелету в МКП ряда видов однодольных и двудольных растений в мейозе дикого типа. Нами также был выявлен ряд аномалий цитоскелета на этой стадии, что позволило обнаружить некоторые неизвестные характеристики этого перехода.

Материал и методика

Для цитологического анализа поведения цитоскелета в мейозе использовали пыльники отдаленных гибридов злаков первого поколения: пшенично-пырейных ППГ F1 №86-2 (*Triticum aestivum* АНК26А × *Agropyron glaucum*), № 97-13 (*T. aestivum* АНК9 × *A. glaucum*); ППГ F1 № 622, 624 и 625 (*T. aestivum* сорта Новосибирская 67 × *A. glaucum*); ППГ F1 № 6-2 (*T. aestivum* АНК-15 × *A. glaucum* 257-7), № 11-2 (*T. aestivum* сорта Новосибир-

ская 67 × *A. glaucum* 257-7), №10-3 (*T. aestivum* сорта Новосибирская 67 × *A. glaucum* 260-8); ППГ F1 № 30-2 и 30-4 (*T. aestivum* сорта Кормовая 128 × *E. elongatum*); пшенично-ржаных ПРГ F1 *T. aestivum* сорта Саратовская 29 × *C. cereale* сорта Онохойская) и ПРГ № 8245 (*T. aestivum* сорта Lutescence × *S. cereale* сорта Онохойская). Был также изучен цикл цитоскелета в мейозе у мейотических мутантов кукурузы *Zea mays ms43* и *ms28*, трансгенного табака *Nicotiana tabacum Res91* и 10.8, гаплоидов сарептской горчицы *Brassica juncea*, а также мейоз дикого типа всех вышеперечисленных видов. Кроме того, был изучен цитоскелет в мейозе дикого типа у томата *Lycopersicon esculentum*, картофеля *Solanum tuberosum*, сахарной свеклы *Beta vulgaris*, гороха *Pisum sativum*, бобов *Vicia faba* и арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*.

Для наблюдения цитоскелета на светооптическом уровне в белом свете бутоны фиксировали модифицированным фиксатором Навашина (Wada, Kisunoki, 1964), давленные препараты пыльников окрашивали ацетокармином. Для визуализации МТ способом иммуноокраши-

вания использовали разработанный нами вариант этого метода на целых клетках (Shamina et al., 2003). Наблюдения проводили на микроскопах Amplival, Nikon и Axiophot.

Результаты

Динамика цитоскелета по окончании телофазы в МКП у видов однодольных растений в мейозе дикого типа. Все исследованные нами виды однодольных растений демонстрировали высокий консерватизм процессов реорганизации цитоскелета на всех стадиях мейоза. В ранней мейотической телофазе цитоскелет представлен фрагмопластом в виде движущейся центробежно системы центральных фибрилл веретена (рис. 1, а, б). В поздней телофазе фибриллы фрагмопласта достигают мембраны материнской клетки и, мембранные пузырьки клеточной пластинки сливаются с образованием дочерних клеточных мембран (рис. 1, в, г). Фибриллы фрагмопласта разделяются до-

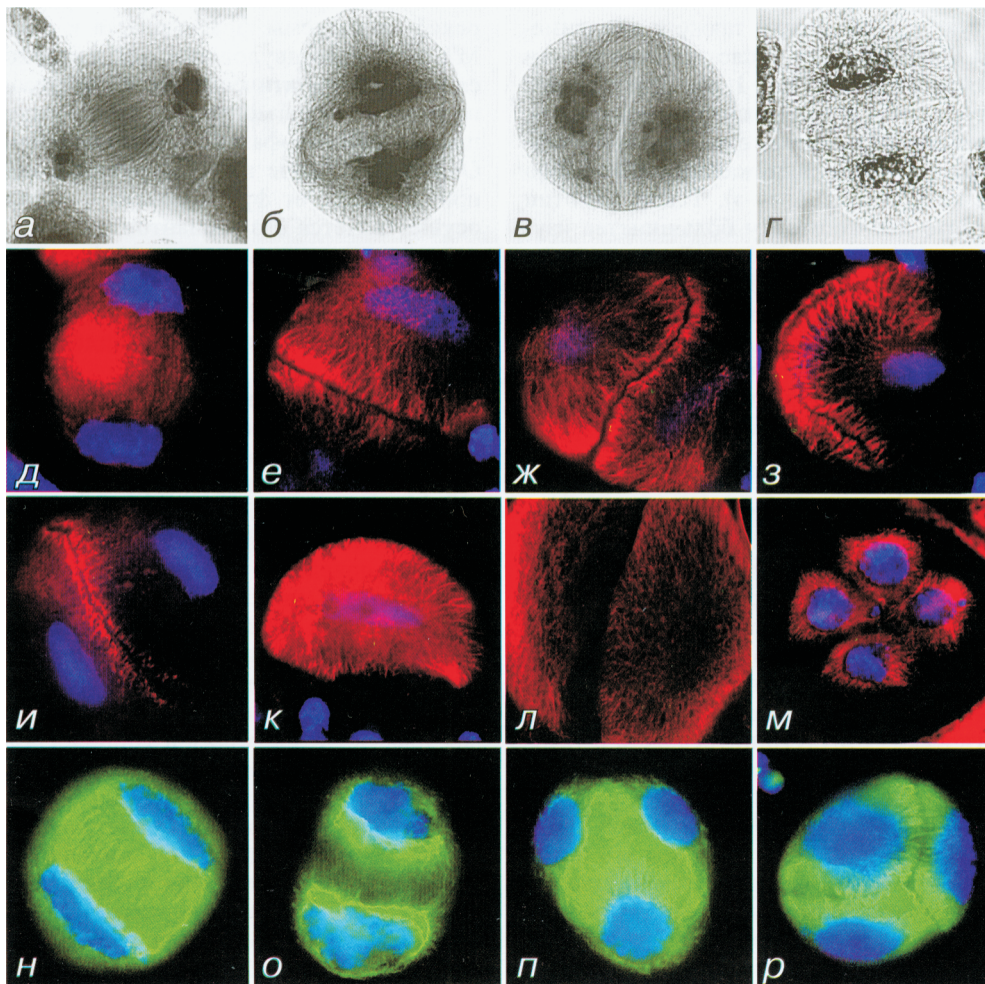


Рис. 1. Переход цитоскелета от фрагмопласта к интерфазной конфигурации в МКП с последовательным и одновременным цитокинезом в мейозе дикого типа.

а—г — переход от телофазы к интеркинезу в первом делении мейоза МКП пырея удлиненного *Elytrigia elongatum*; визуализация цитоскелета по Навашину. а — средняя телофаза; б — поздняя телофаза; в, г — диада в интеркинезе; д—м — переход телофаза—интеркинез в МКП кукурузы *Zea mays*; иммуноокрашивание на β-тубулин (Алеха) с докрасиванием хромосом DAPI. д — подвижный фрагмопласт в средней телофазе; е—и — процесс деполимеризации фибрилл фрагмопласта после формирования дочерних клеточных мембран в поздней телофазе/раннем интеркинезе; к, л — радиальный интерфазный цитоскелет на стадии диад; м — радиальный цитоскелет в тетрадах. н—р — переход к интерфазному цитоскелету в МКП табака *Nicotiana tabacum*; иммуноокрашивание на β-тубулин (FITZ), докрасивание хромосом DAPI. н — интеркинез; о — профазы II; п — телофаза II; р — тетрада. Визуализация цитоскелета по Навашину и иммуноокрашивание на β-тубулин с докрасиванием хромосом DAPI. Об. 100×, ок. 10×.

черными мембранами и превращаются в радиальные пучки, идущие от дочерних ядер к периферии клетки (рис. 1, в, з). В поздней телофазе от телофазных групп хромосом по направлению к кортикальной зоне цитоплазмы полимеризуются пучки МТ радиального цитоскелета (рис. 1, б). По нашим наблюдениям, этот процесс может происходить как до восстановления оболочек дочерних ядер, так и после этого. Таким образом, интерфазный радиальный цитоскелет в мейозе у видов однодольных растений формируется как за счет полимеризации новых пучков МТ, так и за счет утилизации фибриллярной системы фрагмопласта. Иммуноокрашивание микротрубочкового цитоскелета на стадии перехода от телофазы к интеркинезу выявляет также массовую полимеризацию МТ от оболочек дочерних ядер в диадах (рис. 1, к, л). Эта полимеризация происходит на более поздних стадиях, в интеркинезе, и осуществляется от поверхности оболочек дочерних ядер. В мейозе у пырея удлиненного *Elytrigia elongatum* и у большинства изученных нами отдаленных гибридов злаков первого поколения деполимеризации фибрилл фрагмопласта после завершения цитокинеза не происходит.

Однако зачастую мы наблюдали также и деполимеризацию фибрилл фрагмопласта после достижения им мембраны материнской клетки (рис. 1, и). Этот процесс идет необычно: пучки МТ укорачиваются с (–)-концов, так что при окончании цитокинеза фрагмопласт представляет собой короткие пучки, окружающие клеточную пластинку в виде кольца (рис. 1, е–з). Такой фенотип наблюдается в мейозе дикого типа у большинства изученных нами видов однодольных растений, за исключением пырея удлиненного. Чем определяется тот или иной путь динамики цитоскелета в поздней телофазе (деполимеризация МТ фрагмопласта или их сохранение), неизвестно. В случае деполимеризации МТ фрагмопласта пучки МТ интерфазного радиального цитоскелета полимеризуются de novo от ядерной оболочки дочерних ядер (рис. 1, к–л).

Переход к интерфазному цитоскелету в мейозе у видов двудольных растений. В мужском мейозе у двудольных с одновременным цитокинезом телофаза первого мейотического деления проходит без разделения цитоплазмы. Отсутствие цитокинеза в этом случае обеспечивается блоком образования клеточной пластинки (Шамина и др., 2006). В телофазе I формируется неподвижный фрагмопласт, характерный для мейоза у двудольных (рис. 1, н). Иными словами, реорганизация морфологических структур цитоскелета в телофазе I, где цитокинез отсутствует, происходит без принципиальных отличий от телофазы II (рис. 1, н), где происходит одновременный цитокинез. Неподвижный фрагмопласт, или интерзональная система МТ как его называют в первом мейотическом делении, полностью сохраняется в интеркинезе и, по-видимому, выполняет на этой стадии роль интерфазного цитоскелета. Можно сказать, что формирование интерзональной системы (фрагмопласта) одновременно является и формированием радиальной интерфазной системы цитоскелета. Это подтверждается и поведением этой структуры в профазе II: фибриллы фрагмопласта разъединяются в месте соединения противоположно направленных пучков МТ и, укорачиваясь, приближаются к дочерним клеткам (рис. 1, о). Такое поведение является основной характеристикой перехода от интерфазной конфигурации цитоскелета к профазной (Шамина, 2003).

В телофазе второго мейотического деления интерзональная система МТ формируется между четырьмя ядрами, лежащими в общей цитоплазме, так что пучки МТ заполняют всю клетку (рис. 1, п). Параллельно с этим формируются ядерные оболочки. На этой стадии, до формирования клеточных пластинок, клетки задерживаются на сравнительно долгое время (стадия более длительная, чем, например, метафаза). Для сравнения: в одновременном цитокинезе у однодольных центробежное движение фрагмопласта и построение клеточной пластинки начинаются сразу же после того, как хромосомы достигнут полюсов веретена, и цитокинез происходит полностью до восстановления ядерных оболочек. Таким образом, цитокинез в телофазе II у двудольных происходит в системе радиальных пучков МТ, отходящих от оболочек дочерних ядер и соединенных (+)-концами, т. е. фактически в системе интерфазного цитоскелета.

После формирования дочерних клеточных мембран фибриллы фрагмопласта, отходившие от дочерних ядер, становятся фибриллами радиального интерфазного цитоскелета (рис. 1, р). Таким образом, специальных процессов реорганизации цитоскелета, обеспечивающих переход от системы фрагмопласта к радиальной системе МТ, в мейозе у двудольных нет, а переход осуществляется как бы автоматически. Деполимеризации фибрилл неподвижного фрагмопласта после построения клеточной пластинки в телофазе II у двудольных мы не наблюдали. Описанный выше процесс реорганизации цитоскелета при переходе от фрагмопласта к интерфазной системе осуществляется без вариантов в мейозе всех изученных нами видов двудольных растений: табака *Nicotiana tabacum*, томата *Lycopersicon esculentum*, картофеля *Solanum tuberosum*, сахарной свеклы *Beta vulgaris*, гороха *Pisum sativum*, бобов *Vicia faba* и арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*.

Ряд обнаруженных нами аномалий цитоскелетного цикла на его завершающей стадии в мейозе как однодольных, так и двудольных растений позволяет выявить некоторые дополнительные характеристики этого этапа.

Сохранение фибрилл фрагмопласта в интерфазе при неполном последовательном цитокинезе. Интересное изменение поведения фрагмопласта на стадии окончания цитокинеза выявляется при нарушении некоторых пространственных характеристик последнего. В некоторых аномальных фенотипах по различным причинам фрагмопласт/клеточная пластинка располагаются ацентрически и пересекают не всю цитоплазму. При этом клеточная пластинка приходит в соприкосновение с ближайшей к ней областью мембраны материнской клетки до того, как пересечет всю цитоплазму. Соприкосновение хотя бы небольшого участка клеточной пластинки с мембраной материнской клетки немедленно вызывает слияние мембранных пузырьков и образование дочерних клеточных мембран. Все процессы цитокинеза (центробежное движение фрагмопласта, рост клеточной пластинки) после этого прекращаются. Дочерние мембраны при этом имеют форму более или менее глубокой насечки на материнской мембране, вдаваясь внутрь цитоплазмы. Слепой край этой насечки остается окруженным фибриллами фрагмопласта в течение всего интеркинеза и даже в профазе II (рис. 2, б, з). Эти фибриллы сохраняют свою морфологию (расположение, толщину и изгиб), но уже не движутся центробежно. Такая картина неизменно наблюдается во всех случаях аномально асимметричного цитокинеза. Фибриллы тех частей фрагмопласта, кото-

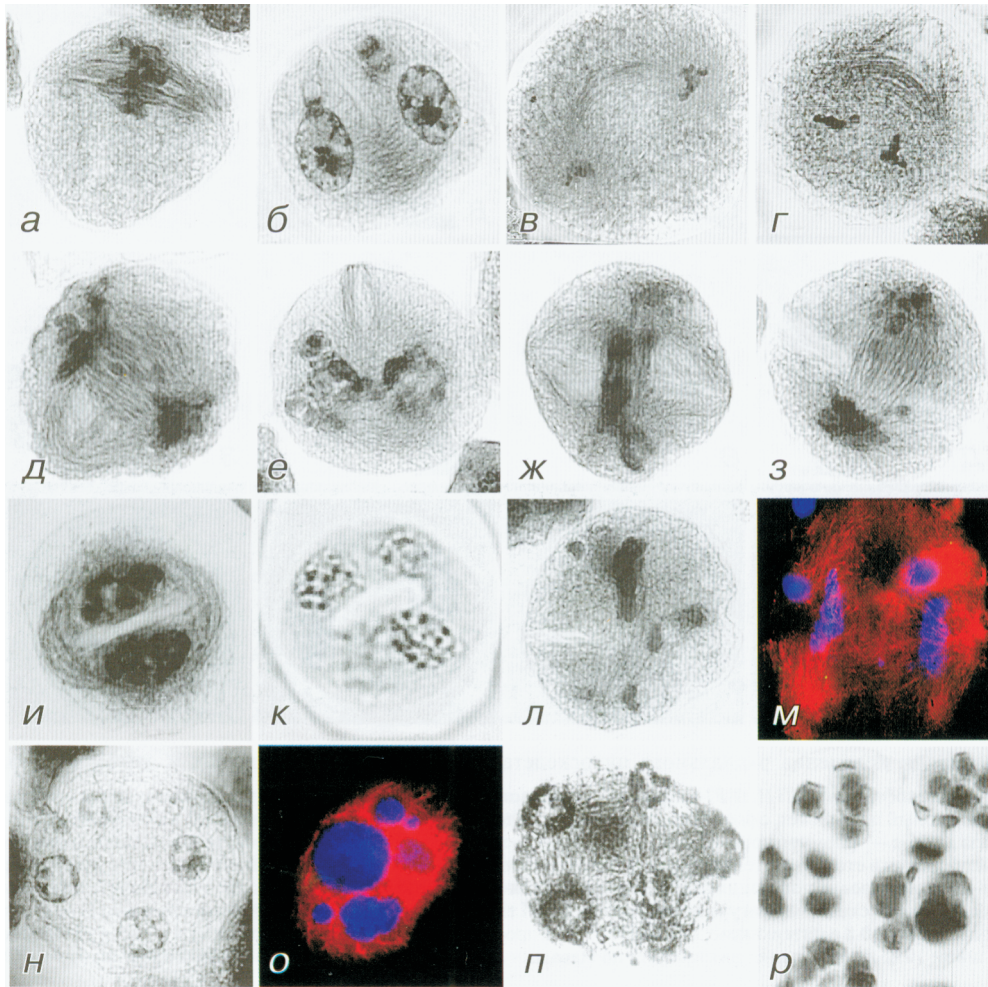


Рис. 2. Аномалии перехода к интерфазному цитоскелету.

a–g — консервация фибрилл фрагмопласта в случае неполного цитокинеза в виде насечки. *a* — ацентрическое положение веретена в метафазе I в МКП ППГ F1; *b* — диада с неполным цитокинезом в виде насечки и с сохраняющимися фибриллами фрагмопласта на слепом краю насечки; *г* — С-образное веретено на стадии телофазы I в МКП меймутанта *ms28*; *д* — неполный цитокинез в МКП *ms28*. *д–и* — неполный цитокинез в МКП ППГ F1 с неравномерным центробежным движением фрагмопласта. *д, е* — неравномерное асимметричное латеральное центробежное движение фрагмопласта и его последствия; *ж, з* — неравномерное симметричное латеральное центробежное движение фрагмопласта и его последствия; *и* — последствия неравномерного сагиттального центробежного движения фрагмопласта в виде «туннельного» цитокинеза; *к* — «туннельный» цитокинез в интеркинезе в МКП табака линии *Res91*; *л* — рассеченная монада с микроядрами в интеркинезе у ППГ F1; *м, н* — монада с микроядрами в интеркинезе у ППГ F1; *о, п* — МКП меймутанта табака *Res91* на стадии телофазы II с микроядрами, соединенными радиальным цитоскелетом в виде фрагмопластов; *р* — последствия присутствия микроядер в телофазе II в МКП двудольных: полиады на стадии тетрад. Визуализация цитоскелетных структур по Навашину и иммуоокрашивание на β -тубулин (Alexa) с докрасиванием хромосом DAPI. Об. 100 \times , ок. 10 \times .

рые соприкоснулись с мембраной материнской клетки и были разделены дочерними мембранами, становятся пучками МТ радиального интерфазного цитоскелета либо деполимеризуются. Радиальные пучки МТ формируются от оболочек дочерних ядер.

Мы наблюдали следующие причины асимметричного расположения цитокинетического аппарата.

1. Асимметричное расположение веретена деления. Если веретено оказывается по той или иной причине приближенным к какой-то области материнской мембраны (рис. 2, *a*), то первоочередное соприкосновение с этой областью клеточной пластинки ведет к слиянию пузырьков, формированию дочерних мембран и к остановке цитокинеза. Такое явление мы наблюдали в мейозе у ППГ F1 №86-2 (*T. aestivum* АНК26А \times *A. glaucum*), №97-13 (*T. aestivum* АНК9 \times *A. glaucum*), в делении многоядерных мейоцитов, где некоторые веретена были расположены в периферической зоне цитоплазмы (например,

второе мейотическое деление у гомозигот по мутации *ms43* у кукурузы), в аномальном фенотипе «множественные веретена» в ПРГ F1 (Шамина и др., 2004).

2. Асимметричное расположение экваториальной зоны веретена. Если веретено формируется изогнутым, что зачастую бывает в асиноптическом мейозе у отдаленных гибридов, его экваториальная область занимает ацентрическое положение. Это наблюдается также в фенотипе гомозигот по мутации *ms28* у кукурузы с нормальным синapsисом гомологичных хромосом (рис. 2, *в, г*). В таких условиях цитокинез также происходит асимметрично, и фибриллы фрагмопласта сохраняются на слепом краю насечки иногда до прометафазы следующего деления.

3. Неравномерное центробежное движение фрагмопласта/клеточной пластинки. В фенотипе ППГ 625 (*T. aestivum* сорта Новосибирская 67 \times *A. glaucum*) и ПРГ № 8245 (*T. aestivum* сорта Lutescence \times *S. cereale* сорта Onokhojskaya) в 10–15 % МКП цитокинез нару-

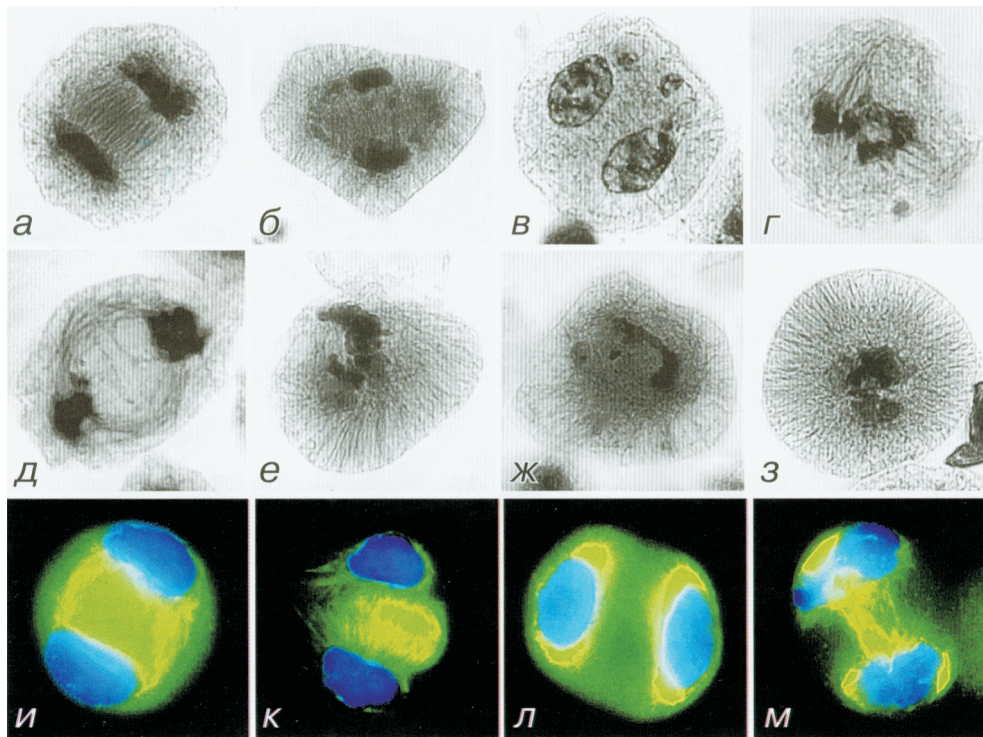


Рис. 3. Аномалии поведения радиального цитоскелета в МКП видов однодольных и двудольных растений.

a — фрагмопласт в средней телофазе I в МКП ППГ F1 с нормальным циклом цитоскелета. *б–г* — блок процессов средней телофазы I и его последствия в МКП ППГ №; *б* — радиальный цитоскелет, сформированный вокруг телофазного веретена (фрагмопласта) в интеркинезе; *в* — двуядерная молада в профазе II; *г* — метафаза II. *д–з* — формирование радиального цитоскелета в МКП ППГ № с нарушениями восстановления ядерной оболочки; *д* — формирование ядерной оболочки в стороне от телофазной группы хромосом; *е–з* — МКП без ядерной оболочки, но с развитым радиальным цитоскелетом в интеркинезе. *и–м* — нарушения поведения радиального цитоскелета в мейозе у мутантной линии 10.8 табака *Nicotiana tabacum* в сравнении с диким типом. *и* — нормальная цитоскелетная фигура в интеркинезе МКП табака дикого типа; *к* — радиальные пучки МТ, не соединенные (+)-концами на экваторе, в МКП линии табака 10.8 в интеркинезе; *л* — цитоскелет в профазе II в МКП табака дикого типа; *м* — блок разъединения (+)-концов МТ в профазе II в МКП линии 10.8. Визуализация цитоскелета по Навашину (*a–з*) и иммуноокрашивание на β -тубулин (*и–м*). Об. 100 \times , ок. 10 \times .

шен. При этом центробежно перемещается лишь часть фибрилл фрагмопласта, тогда как прочие остаются на том месте, которое занимало центральное веретено (рис. 2, *д, ж*). Поскольку МКП злаков имеет таблеткообразную форму, в них различаются сагиттальное и латеральное направления относительно оси деления. В МКП вышеперечисленных генотипов нарушается центробежное движение фрагмопласта наблюдается в сагиттальном (передне-заднем) направлении. Эти части фрагмопласта не движутся, и дочерние клеточные мембраны в этом случае имеют вид боковых насечек (рис. 2, *е, з*). В МКП ППГ F1 № 6-2 (*T. aestivum* АНК-15 \times *A. glaucum* 257-7), № 11-2 (*T. aestivum* сорта Новосибирская 67 \times *A. glaucum* 257-7), № 10-3 (*T. aestivum* сорта Новосибирская 67 \times *A. glaucum* 260-8) в 10–15 % МКП наблюдается нарушение движения фрагмопласта в латеральном направлении. Дочерние мембраны в этом случае имеют вид сквозного отверстия в центре материнской клетки (рис. 2, *и*). Мы назвали эту аномалию «туннельным» цитокинезом. Фибриллы фрагмопласта сохраняются на краях отверстия вплоть до профазы следующего деления.

«Туннельный» цитокинез наблюдается также в аномальном мейозе у двудольных, в трансгенной линии табака *Res91* в фенотипе «преждевременный цитокинез». При этом в телофазе I в неподвижном фрагмопласте формируются клеточная пластинка и дочерние клеточные мембраны. Последние часто имеют аномальную форму сквозного отверстия, по-видимому из-за каких-то нарушений про-

цесса формирования клеточной пластинки. Сохранения фибрилл фрагмопласта по краям «туннеля» мы в этих случаях никогда не наблюдали (рис. 2, *к*).

Нарушение разъединения фибрилл фрагмопласта при переходе к интерфазному цитоскелету. Выше было описано нарушение разъединения МТ в составе фибрилл фрагмопласта в зоне перекрывания их (+)-концов как вторичное явление после нарушения формирования дочерних клеточных мембран. Обнаруженный нами аномальный фенотип демонстрирует, что разъединение (+)-концов МТ, входящих в состав фибрилл фрагмопласта, осуществляется посредством собственного внутриклеточного механизма, который может быть нарушен. Так, в телофазе первого мейотического деления у инсерционного меймутанта 10.8 табака наблюдается нарушение поведения (+)-концов МТ: в 7 % МКП при формировании интерзональной системы цитоскелета (неподвижного фрагмопласта) не происходит соединения (+)-концов противоположно направленных полюсных МТ (ср. рис. 3, *к* и *и*). В этом же фенотипе нарушено также разъединение МТ интерзональной системы в профазе II (ср. рис. 3, *м, л, о* и *з, л*). Аналогичный фенотип мы наблюдали в мейозе у гаплоидов *V. juncea*, где в добавление к вышеописанным аномалиям наблюдается также блок разъединения фибрилл фрагмопласта даже после формирования дочерних клеточных мембран в телофазе II. В результате клетки — члены тетрады — оказываются соединенными между собой фибриллами цитоскелета.

Переход цитоскелета к интерфазной конфигурации в МКП однодольных, с резкими нарушениями цитоскелетного цикла на предыдущих стадиях. Нарушения биполярности веретена в клетке всегда сопровождаются резкими аномалиями сегрегации хромосом и цитокинеза. Это происходит при формировании в метафазе хаотичного (Серюкова и др., 2003) радиального (Shamina et al., 2000) и монополярного (Shamina et al., 2003) веретена. Во всех этих случаях хромосомы вместо двух телофазных групп формируют множество микроядер. Фрагмопласт в этих фенотипах не строится по причине отсутствия биполярной системы центральных фибрилл веретена, и формирование клеточной пластинки поэтому блокировано. Разделения цитоплазмы не происходит. В результате из клеток с вышеперечисленными аномальными фенотипами образуются монады с разбросанными в цитоплазме микроядрами (рис. 2, л—о). Однако несмотря на резкие нарушения цикла цитоскелета на предыдущих стадиях, интерфазный цитоскелет в таких клетках имеет нормальное строение, с поправкой на нарушение числа дочерних ядер в клетке, т. е. от поверхности каждого микроядра отходит радиальная система МТ (рис. 2, м, о). Это наблюдается, в частности, на стадии диад в монадах у пшенично-ржаных гибридов (ПРГ F1 *T. aestivum* сорта Саратовская 29 × *S. cereale* сорта Онохойская). В мейозе у этого гибрида формируются монополярные веретена, в результате чего сегрегация хромосом, построение фрагмопласта и цитокинез отсутствуют. В интеркинезе и на стадии тетрад многочисленные микроядра имеют развитый радиальный цитоскелет (рис. 2, м—о).

Необходимо отметить, что в ряде случаев эти монады бывают беспорядочно рассечены дочерними клеточными мембранами либо несут множество насечек (рис. 2, л). Такой вариант фенотипа проявляется в данных аномалиях при обильном поливе растений после засухи в период мейоза. По-видимому, при этом в мелких МКП, сформировавшихся под влиянием аридного режима, после полива происходит формирование непропорционально (объему клетки) большого количества пластосом. В результате на аномально расположенных фибриллах веретена формируются хаотично расположенные и случайным образом ориентированные аномальные клеточные пластинки. При этом в аномальные дочерние мембраны превращаются лишь те из них, которые прикоснулись к материнской мембране. В крайнем выражении этот процесс приводит к формированию полиады, некоторые члены которой могут содержать микроядра, а некоторые быть цитопластами, лишенными микроядер. Однако необходимо отметить, что этот фенотип является исключением. При отсутствии биполярного веретена продуктом деления такой клетки является монада с микроядрами и без признаков цитокинеза (рис. 2, н).

Переход цитоскелета к интерфазной конфигурации в МКП двудольных с одновременным цитокинезом при резких нарушениях цитоскелетного цикла на предыдущих стадиях. При формировании микроядер в телофазе II у видов двудольных с одновременным цитокинезом продукты мейоза являются принципиально иными. Практически всегда они представляют собой полиады (рис. 2, р) с числом клеток, равным числу микроядер. Это объясняется тем, что от каждой хромосомы или группы хромосом в ранней телофазе II полимеризуются радиальные пучки МТ, соединяющиеся (+)-концами с МТ, отходящими от других микроядер (рис. 2, н). Это

дает начало множеству фрагмопластов, на которых строится соответствующее число клеточных пластинок и дочерних клеточных мембран. Каждый член полиады содержит микроядро с радиальным цитоскелетом.

Радиальный интерфазный цитоскелет в клетках, не содержащих оформленных ядер. В некоторых аномальных фенотипах формирование дочерних ядер в поздней телофазе оказывается по различным причинам нарушенным. Так, в 15 % МКП ПРГ F1 № 624 блокированы все процессы телофазы — формирование клеточной пластинки, центробежное движение фрагмопласта и восстановление оболочек дочерних ядер. Тем не менее процессы цитоскелетного цикла в интеркинезе осуществляются, что приводит к парадоксальной конфигурации: телофазное веретено, окруженное радиальными пучками МТ (рис. 3, б). Поскольку все процессы цитокинеза блокированы, продуктом деления является двуждерная монада (рис. 3, в), а в метафазе II в общей цитоплазме формируются два веретена деления (рис. 3, г).

В МКП ПРГ F1 № 622 формирование оболочек дочерних ядер либо полностью блокировано, либо резко нарушено, так что ядерная оболочка восстанавливается в стороне от хромосом, автономно (рис. 3, д) либо не строится вовсе. В интеркинезе такие клетки вместо ядер содержат группы спирализованных хромосом (рис. 3, е—з). Несмотря на отсутствие ядерной оболочки, в цитоплазме на этой стадии наблюдается хорошо развитый и правильно расположенный радиальный цитоскелет (рис. 3, е—з). Второе мейотическое деление в таких клетках тем не менее может протекать нормально, с формированием цитоскелетного кольца вокруг группы хромосом и затем — веретена деления.

Обсуждение

Завершение цикла реорганизации цитоскелета как восстановление его интерфазной системы интенсивно изучалось и изучается главным образом в митотическом делении клеток меристемы. Эти клетки снабжены клеточной стенкой, и в интерфазе цитоскелет представлен в них кортикальными микротрубочковыми спиральями (Goddard et al., 1994). В настоящее время существуют две точки зрения на механизм их формирования. Согласно первой из них, кортикальные МТ полимеризуются на центрах организации (ЦОМТ), располагающихся в кортикальной зоне цитоплазмы и в месте контакта дочерних клеточных мембран с мембраной материнской клетки (Busby, Gunning, 1983; Cleary, Hardham, 1990). Иммунодетекция в растительной клетке γ -тубулина, являющегося компонентом ЦОМТ, обнаружила его локализацию в кортикальной зоне цитоплазмы в виде точечного окрашивания (Liu et al., 1995). Подтверждением «кортикальной» гипотезы происхождения кортикальных МТ служит факт их реполимеризации в кортикальной зоне цитоплазмы после экспериментального разрушения (Cyr, Palevitz, 1995), а также включение в эту зону инъецируемого тубулина, меченного флуоресцеином (Wasteneys et al., 1993). Согласно второй, «ядерной», гипотезе, кортикальные МТ формируются на перинуклеарных ЦОМТ, располагающихся на ядерной оболочке, а затем мигрируют к месту своей окончательной локализации (Clayton et al., 1985; Wick, 1985; Grandner, Cyr, 2000; Hasegawa et al., 2000). Эта модель предполагает, что стабильные пучки МТ перемещаются в кортикальную зону, затем ориен-

тируются и организуются в спирали с помощью добавочного автономного механизма (Mizuno, 1993; Lambert, 1995; Stoppin et al., 1995).

В мейотическом делении переход цитоскелета от телофазной конфигурации в интерфазную специально не рассматривался. Наблюдая переход от фрагмопласта к радиальным пучкам МТ в ходе мейоза как с последовательным, так и с одновременным цитокинезом, мы обнаружили, что фибриллы фрагмопласта переходят в состав радиального интерфазного цитоскелета и становятся его частью. Это происходит всегда в МКП двудольных с одновременным цитокинезом и зачастую в МКП изученных нами видов и форм однодольных с последовательным цитокинезом и зачастую в МКП изученных нами видов и форм однодольных с последовательным цитокинезом. У многих видов однодольных фибриллы фрагмопласта полностью деполимеризуются после окончания цитокинеза. Кроме того, фибриллы радиального цитоскелета формируются *de novo* от оболочек дочерних ядер в МКП как однодольных, так и двудольных.

Можно предполагать, что нарушения структуры и функции фрагмопласта будут блокировать цикл цитоскелета на стадии перехода к интерфазе. Однако наши наблюдения показывают, что ни нарушение структуры неподвижного фрагмопласта у двудольных, ни блок центрального движения подвижного фрагмопласта у однодольных, ни иные аномалии динамики цитоскелета в мейотической телофазе не препятствуют формированию радиальной интерфазной системы в последующей интерфазе. Это объясняется тем, что радиальные пучки МТ интерфазной системы полимеризуются заново от оболочки дочерних ядер, и этот процесс компенсирует все нарушения цикла цитоскелета предыдущих стадий. Способность ядерной оболочки к полимеризации МТ в растительной клетке была неоднократно показана (Lambert et al., 1991; Vaughn, Harper, 1998).

Интересным фактом является формирование нормального радиального цитоскелета в интерфазных клетках без интерфазных ядер в тех аномальных фенотипах, где заблокировано восстановление ядерной оболочки. Это говорит о том, что полимеризация МТ происходит, по-видимому, на множестве ЦОМТ, находящихся в цитоплазме. Таким образом осуществляется нормальная пространственная организация свободных пучков МТ по радиусам клетки в отсутствие оболочки ядра, представляет собой загадку. Формирование радиальных систем МТ описано в экстрактах из яйцеклеток *Xenopus* на стадии дробления. Они появлялись при добавлении к экстракту таксола (стабилизатора МТ) и динеина (белка, обладающего минус-направленной моторной активностью) (Verde et al., 1991). Правомерно также предположение о том, что новообразованные от полюсных районов телофазного веретена МТ могут перераспределяться в цитоплазме и принимать вид радиальной системы.

Девиацией циклических преобразований цитоскелета в поздней телофазе является, согласно нашим данным, отсутствие деполимеризации фибрилл фрагмопласта в МКП у однодольных. В мейозе дикого типа большинства изученных нами видов фибриллы фрагмопласта деполимеризуются на этой стадии. Однако у многих форм этого не происходит и фибриллы фрагмопласта входят в состав радиального цитоскелета в интерфазе. Никакого влияния на дальнейший ход цикла цитоскелета эти различия, по всей видимости, не оказывают. Такие девиантные фенотипы демонстрируют цепь утилизации одних и

тех же элементов цитоскелета (пучков МТ) в переходах «веретено деления—фрагмопласт—интерфазный радиальный цитоскелет». Действительно, фибриллы центрального веретена входят в состав фрагмопласта в МКП и с последовательным, и с одновременным цитокинезом (Шамина, Дорогова, 2006). Трудно сказать, в чем заключается смысл полной замены цитоскелета в интерфазе мейоза у большинства видов.

Анализируя аномалии перехода фибрилл фрагмопласта в состав радиального цитоскелета дочерних клеток, можно утверждать, что разъединение (+)-концов фибрилл фрагмопласта является специальным процессом, связанным с формированием дочерних клеточных мембран при условии в месте их контакта с материнской мембраной. Аномальные фенотипы с консервацией фибрилл фрагмопласта в неполном цитокинезе явно указывают на то, что для «разборки» фрагмопласта, т. е. для разъединения его фибрилл на экваторе и перехода их в статус радиального цитоскелета дочерних клеток, необходимо формирование дочерних мембран, причем обязательно при слиянии их с мембраной материнской клетки. Только в месте этого контакта происходит разделение фибрилл фрагмопласта. Консервация фибрилл фрагмопласта и сохранение их в интерфазе описаны также при воздействии на митотические клетки агентами, предотвращающими формирование дочерних клеточных мембран/клеточной стенки в цитокинезе (Vaughn et al., 1996).

Это условие не является необходимым в одновременном цитокинезе у двудольных, где консервация фибрилл фрагмопласта на неполных дочерних клеточных мембранах не происходит. Здесь существует специальный механизм разъединения (+)-концов МТ фрагмопласта, не зависящий от контакта дочерних клеточных мембран с материнской. На это указывает также нарушение разъединения МТ фрагмопласта в фенотипе инсерционных мутантов табака и гаплоидов сарептской горчицы. Необходимость такого механизма очевидна при отсутствии формирования дочерних клеточных мембран в телофазе I в мейозе с одновременным цитокинезом. Правда, остается непонятным, зачем в телофазе I у двудольных происходит соединение (+)-концов противоположных полюсных МТ. По-видимому, формирование такого каркаса, как неподвижный фрагмопласт, необходимо для предотвращения сближения дочерних ядер в общей цитоплазме. Такое сближение могло бы привести к формированию общего веретена в метафазе II и формированию нередуцированных гамет (Dorogova et al., 1999; Шамина и др., 2001).

Таким образом, переход от телофазной цитоскелетной системы (фрагмопласт) к интерфазной радиальной конфигурации в последовательном цитокинезе у однодольных происходит за счет разъединения фибрилл фрагмопласта на экваторе при формировании дочерних клеточных мембран, а также за счет полимеризации дополнительных пучков МТ от дочерних групп хромосом и оболочек дочерних ядер. Полимеризация новых МТ при этом является основным процессом, а МТ фрагмопласта могут деполимеризоваться и участия в этом переходе не принимать.

Неподвижный фрагмопласт в мейозе у видов двудольных растений с одновременным цитокинезом по своему происхождению представляет собой большей частью систему новосинтезированных радиальных пучков МТ, отходящих от дочерних ядер; центральные фибриллы веретена в него также входят. Пучки полюсных МТ

идентичны радиальному интерфазному цитоскелету, хотя формируются в телофазе, перед цитокинезом. Поэтому в таком случае переход от фрагмопласта к радиальному цитоскелету осуществляется автоматически, поскольку фрагмопласт является производным радиально-го цитоскелета.

Различия в способе перехода цитоскелета от фрагмопласта к интерфазным радиальным пучкам в мейозе у видов однодольных и двудольных растений заключаются, таким образом, лишь во времени формирования радиальных пучков цитоскелета. У двудольных они появляются в ранней телофазе и выполняют роль фрагмопласта, у однодольных — в ранней интерфазе в качестве собственно интерфазной системы цитоскелета, часто после деполимеризации предыдущей системы веретена/фрагмопласта. Наши наблюдения показали, что формирование пучков радиального цитоскелета от дочерних ядер или групп хромосом является процессом, не зависимым от предыдущего хода цикла цитоскелета, а также от цикла ядерной оболочки. Предыдущие структуры цитоскелета (веретено деления) могут сохраняться, а могут деполимеризоваться (в составе фибрилл фрагмопласта), не оказывая влияния на ход цикла цитоскелета на этой стадии.

Авторы выражают признательность Г. Е. Серюкову (Омский государственный агротехнический университет) и О. Г. Силковой (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск) за любезно предоставленный для исследования материал отдаленных гибридов злаков.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Динамика генофондов растений, животных и человека», направление «Фундаментальные проблемы транспорта растений и животных».

Список литературы

Серюкова Е. Г., Дорогова Н. В., Жарков Н. А., Шамина Н. В. 2003. Нарушения прометафазы, приводящие к реституции ядер. Цитология. 45 (3) : 244—248.

Шамина Н. В. 2003. Динамика микротрубочек цитоскелета в мейозе у высших растений. I. Околоядерное кольцо микротрубочек и построение мейотического веретена. Цитология. 45 (7) : 650—654.

Шамина Н. В., Вайсман Н. Я., Дорогова Н. В., Шаворская О. А., Малецкий С. И. 2001. Интерзональные микротрубочки и мейотическая реституция у двудольных. Цитология. 43 (1) : 33—38.

Шамина Н. В., Гордеева Е. И., Серюкова Е. Г. 2006. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. VIII. Последовательный и одновременный цитокинез в сравнении. Цитология. 48 (3) : 220—225.

Шамина Н. В., Дорогова Н. В. 2006. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. VII. Процессы одновременного (симультанного) цитокинеза. Цитология. 48 (2) : 127—132.

Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Шацкая О. А., Гаврилова Е. Д. 2004. Консолидация цитоскелета при формировании веретена деления в растительной клетке. I. Аномалии, затрагивающие целостность веретена в мейозе. Цитология. 46 (7) : 587—591.

Busby C. H., Gunning B. E. S. 1983. Orientation of microtubules against transverse cells walls in root of *Azolla pinnata* R. Br. Protoplasma. 116 : 78—85.

Clayton L., Black C. M., Lloyd C. W. 1985. Microtubule nucleating sites in higher plant cells identified by an auto-antibody against pericentriolar material. J. Cell Biol. 101 : 319—324.

Cleary A. L., Hardham A. R. 1990. Reinstatement of microtubule arrays from cortical nucleating sites in stomatal complexes of *Lolium rigidum* following depolymerization of microtubules by oryzalin and high pressure. Plant Cell Physiol. 31 : 903—915.

Cyr R. J., Palevitz B. A. 1995. Organization of cortical microtubules in plant cells. Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 65—71.

Dorogova N. V., Shamina N. V., Maletski S. I. 1999. The mutational variation of a cytoskeleton and formation of unreduced male gametes in sugar beet. Sugar Tech. 1 : 83—85.

Franklin A. E., Cande W. Z. 1999. Nuclear organization and chromosome segregation. Plant Cell. 11 : 523—534.

Goddard R. H., Wick S. M., Silflow C. D., Snustad D. P. 1994. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. Plant Physiol. 104 : 1—6.

Granger C., Cyr R. 2000. Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. Planta. 210 : 502—509.

Hasezawa S., Ueda K., Kumagai F. 2000. Time-sequence observations of microtubule dynamics throughout mitosis in living cell suspensions of stable transgenic *Arabidopsis*: direct evidence for the origin of cortical microtubules at M₂/G₁ interface. Plant Cell Physiol. 41 : 244—250.

Kellogg D. R., Moritz M., Alberts B. M. 1994. The centrosome and cellular organization. Ann. Rev. Biochem. 63 : 639—674.

Lambert A. M. 1995. Microtubule-organizing centers in higher plants — evolving concepts. Bot. acta. 108 : 535—537.

Lambert A. M., Lloyd C. W. 1994. The higher plant microtubule cycle/ In: Microtubules. Wiley-Liss, Inc. 325—341.

Lambert A. M., Vantard M., Schmit A.-C., Stoekel H. 1991. Mitosis in plants. In: The cytoskeletal basis of plant growth and form. AP Ltd. 199—208.

Liu B., Joshi H. C., Palewitz B. A. 1995. Experimental manipulation on v-tubulin distribution in *Arabidopsis* using anti-microtubule drugs. Cell Motil. Cytoskeleton. 31 : 113—129.

Mizuno K. 1993. Microtubule-nucleation sites on nuclei of higher plant cells. Protoplasma. 173 : 77—85.

Shamina N. V., Dorogova N. V., Trunova T. A. 2000. Radial spindle and the phenotype of maize meiotic mutant, *dv*. Cell Biol. Int. 24 : 729—736.

Shamina N. V., Silkova O. G., Serukova E. G. 2003. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. Cell Biol. Int. 27 : 657—664.

Stoppin V., Lambert A.-M., Vantard M. 1995. Plant microtubule-associated proteins (MAPs) affect microtubule nucleation and growth at plant nuclei and mammalian centrosomes. Eur. J. Cell Biol. 69 : 11—23.

Vaughn K. C., Harper J. D. I. 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. Int. Rev. Cytol. 181 : 75—149.

Vaughn K. C., Hoffman J. C., Hahn M. G., Staehelin L. A. 1996. The herbicide dichlobenil disrupts cell plate formation: immunogold characterization. Protoplasma. 194 : 117—132.

Verde F., Berrez J. M., Antony C., Karsenti E. 1991. Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. J. Cell Biol. 112 : 1177—1187.

Wada B., Kusunoki F. 1964. Spindle membrane in meiosis of pollen mother cells of *Tradescantia* and in mitosis of endosperm cells of *Zephyranthes*. Cytologia. (Tokyo). 29 : 109—111.

Wasteneys G. O., Gunning B. E. S., Hepler P. K. 1993. Microinjection of fluorescent brain tubulin reveals dynamic properties of cortical microtubules in living plant cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 24 : 205—213.

Wick S. 1985. Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/cytokinetic and interphase microtubule arrays. Cell Biol. Int. Rep. 9 : 357—371.

DYNAMICS OF MICROTUBULAR CYTOSKELETON IN HIGHER PLANT MEIOSIS.
IX. THE CYCLE ACCOMPLISHMENT. TRANSITION FROM PHRAGMOPLAST
TO RADIAL MICROTUBULE SYSTEM

N. V. Shamina, Yu. V. Sidorchuk, N. V. Dorogova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;
e-mail: shamina@bionet.nsc.ru

In this study we analysed the terminal step of cytoskeleton cycle in higher plant meiosis: transition from phragmoplast to radial interphase configuration. Wild type meiosis in a range of mono- and dicotyledonous species was studied. A number of cytoskeleton abnormalities on this stage was described in meiotic mutants, haploids and wide hybrids of various species. We described processes of cytoskeleton rearrangements on this stage: disjunction of phragmoplast MTs, their shortening and the role of daughter cell membranes. The independence of the interphase radial MT system formation from the previous steps of cytoskeleton cycle and from nuclear envelope cycle is proposed.

Key words: cytoskeleton, microtubules, phragmoplast, nuclear envelope, meiosis, plant cell division, meiotic mutants.
