

КОРТИКАЛЬНОЕ ЦИТОСКЕЛЕТНОЕ КОЛЬЦО В ПРОФАЗЕ II ПРИВОДИТ К КОРРЕКЦИИ АНОМАЛИЙ ПЕРВОГО МЕЙОТИЧЕСКОГО ДЕЛЕНИЯ И К РЕСТИТУЦИИ ЯДЕР В МАТЕРИНСКИХ КЛЕТКАХ ПЫЛЬЦЫ

© Н. В. Шамина,¹ И. А. Запорожченко,² Ю. Р. Максютова,² О. А. Шацкая³

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, ²Кафедра цитологии
и генетики Новосибирского государственного университета

и ³Кубанский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П. П. Лукьяненко, Краснодар

В мейотическом делении материнских клеток пыльцы (МКП) гаплоида кукурузы *Zea mays* № 1498 в 50 % клеток обнаружено отклонение в структуре профазной конфигурации цитоскелета — околядерного кольца. В профазе обоих делений мейоза цитоскелетное кольцо формируется не в перинуклеарной области цитоплазмы, а в кортикальной. Иногда наблюдается формирование в одной клетке двух колец — перинуклеарного и кортикального. Показано, что кортикальное кольцо цитоскелета в многоядерных МКП, сформировавшихся в результате аномалий предыдущего мейотического деления, приводит к объединению хромосом в общее веретено и к мейотической реституции.

Ключевые слова: веретено деления, гаплоиды, мейоз, МКП, *Zea mays*, цитоскелет, микротрубочки.

В ходе деления растительной клетки цитоскелет проходит цикл особенно сложных преобразований по сравнению, к примеру, с процессом реорганизации цитоскелета в делящейся животной клетке. Это объясняется наличием у растительной клетки жесткой клеточной стенки, которая препятствует перемещению клеток в ходе морфогенеза органов и частей растения. Развитие организма в таких условиях определяется направлением пролиферации отдельных клеточных клонов. Это требует формирования в растительной клетке добавочных цитоскелетных структур, в частности препрофазного тяжа микротрубочек (Wick, 1991), который определяет ориентацию плана деления клетки. Наличие клеточной стенки определяет также формирование специфического аппарата цитокинеза — фрагмопласта (Gunning, Wick, 1985). Многообразие структур цитоскелета обусловило сложный ход их реорганизации в делении растительной клетки. Зачастую переход от одной структуры к другой может представлять собой весьма различающиеся цепи последовательных событий. Например, при формировании веретена деления фибриллы цитоскелета могут деполимеризоваться на переходных стадиях (Graas et al., 1989; Chan, Cande, 1998), а могут сохранять целостность (Шамина, 2003; Shamina, 2005). Переходные фигуры цитоскелета от интерфазной конфигурации к веретену деления также весьма различаются: профазное веретено (DeMey et al., 1982), перинуклеарная корзинка (Wick, Duniec, 1984; Smirnova, Bajer, 1998) и полярные шапочки (Baskin, Cande, 1990; Goddard et al., 1994), причем они могут формироваться параллельно в различных клетках одного и того же организма. Это указывает на гибкость и, так сказать, многоканальность процессов реорганизации цитоскелета в растительной клетке.

Анализ формирования веретена в мейотическом делении материнских клеток пыльцы (МКП) выявил промежуточную

цитоскелетную структуру на стадии поздней профазы — меридионально ориентированное перинуклеарное кольцо (Шамина, 2003; Шамина и др., 2003а, 2003б). Оно является аналогом тех переходных перинуклеарных фигур, которые перечислены выше и формируются в митотических клетках, хотя отличается от них по структуре. Промежуточные профазные цитоскелетные фигуры являются результатом реориентации цитоскелета для приближения к ядру (+)-концов микротрубочковых пучков. Собственные функции перинуклеарных структур цитоскелета неясны, хотя их подчас высокоорганизованная структура заставляет такую функцию предполагать. Для исследования этого вопроса полезными оказываются разнообразные аномалии этих структур и влияние этих аномалий на последующие стадии клеточного деления.

В настоящей работе представлены результаты анализа мейоза в МКП гаплоида кукурузы с отклонениями формирования перинуклеарной системы цитоскелета в профазе. Показано, что формирование общего цитоскелетного кольца в кортикальной зоне цитоплазмы в многоядерных монадах в профазе II сопровождается объединением хромосом в общее веретено деления. В результате вместо тетрад формируются диады — потенциальные предшественницы нередуцированных гамет.

Материал и методика

Для цитологического анализа мейоза использовали гаплоид кукурузы *Zea mays* № 1498 F2(Кр633 × Кр717), полученный методом гаплоиндукции. Проанализирован также ход мейоза у гаплоидов *Zea mays* № 4492.1 и 4492.2 F2(Кр633 × Кр805), 4493.2 и 4493.4 F2(Гн346 × Гн345) и у пшенично-ржаных аллогаплоидов (гибридов первого

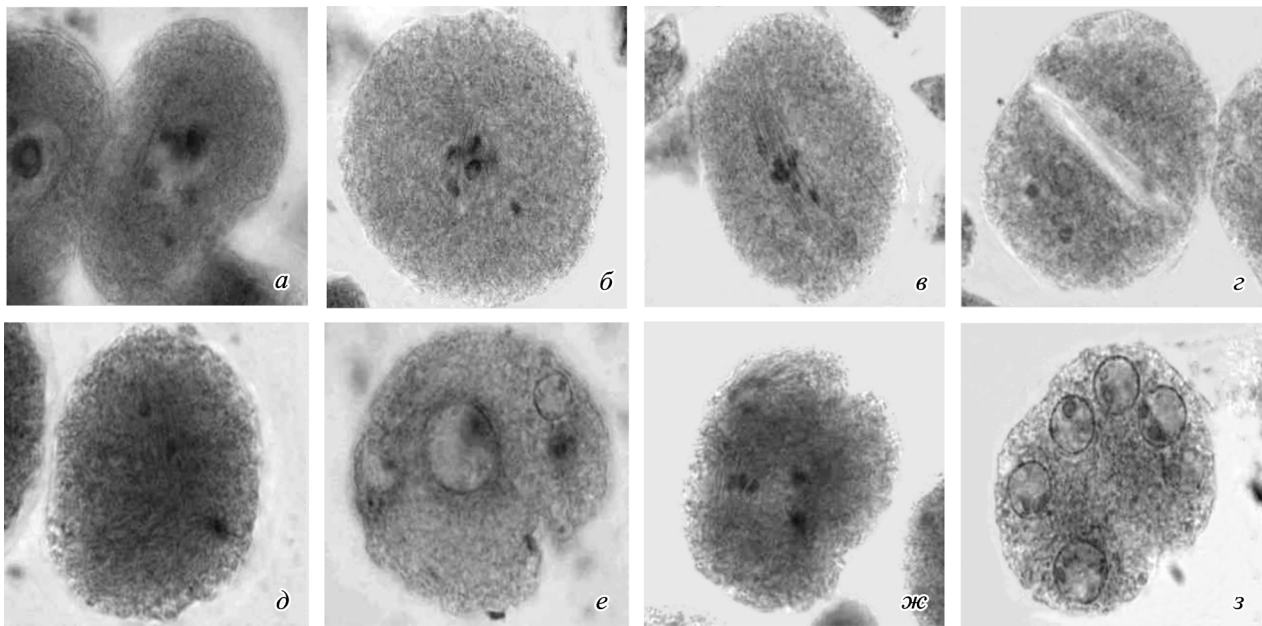


Рис. 1. Динамика цитоскелета на мобильных стадиях мейоза в МКП «стандартного» гаплоида кукурузы (а—з) и гаплоида с фенотипом «множественные веретена» (д—з).

а — перинуклеарные кольца в профазе I; б — хаотическая фигура цитоскелета в средней прометафазе I; в — биполярное веретено деления с разбросанными унивалентами в метафазе I; з — диада с микроядрами; д — множественные веретена в метафазе I; е — монада с микроядрами в интеркинезе; ж — множественные веретена в МП, сформировавшиеся на основе микроядер; з — монада с микроядрами на стадии тетрады. Об. 100×, ок. 10×.

поколения) *Triticum aestivum* var. *Ferrugineum* × *Secale cereale* сорта Онохойская № 8156, 8165, 8178, 8203, 8210, 8211, 8212, 8236 и 8252 с фенотипом «множественные веретена».

Бутоны на стадии мейоза фиксировали модифицированным фиксатором Навашина (Wada, Kusunoki, 1964) при комнатной температуре в течение 1 сут и хранили в фиксаторе. Давленные препараты пыльников окрашивали 3 %-ным ацетокармином по стандартной методике. Для наблюдений использовали микроскоп Olympus RX50 (об. 100×, ок. 10×). Изображения регистрировали на компьютере с помощью CCD-камеры AxioCam HRC и программного обеспечения Axiovision (Carl Zeiss). Изображения в Photoshop не обрабатывали.

Результаты

Реорганизация цитоскелета в мейозе у большинства гаплоидов и аллогатлоидов злаков проходит единообразно. В поздней профазе радиальная конфигурация интерфазного цитоскелета сменяется перинуклеарным цитоскелетным кольцом, которое опоясывает ядро в меридиональной плоскости (рис. 1, а). После распада ядерной оболочки кольцо распадается на отдельные фибриллы, которые входят в зону бывшего ядра (рис. 1, б). Затем хаотическая сеть фибрилл приобретает биполярную ориентацию и формируется веретено деления, чаще всего изогнутое (рис. 1, в). Униваленты обычно ориентированы редукционно, т. е. несут один нерасцепленный кинетохор, и распределяются между полюсами случайным образом. Анафазное движение некоординированное, часты отставшие униваленты. В результате цитокинеза формируется диада, зачастую с микроядрами (рис. 1, з). Второе деление происходит без затруднений, и продуктами

мейоза являются тетрады с анеуплоидными клетками-членами.

У ряда исследованных нами гаплоидов и аллогатлоидов на этот фенотип накладывалась аномалия формирования веретена в первом мейотическом делении, так что вместо единого веретена формировалось несколько биполярных веретен (рис. 1, д). Поведение цитоскелета на стадиях профазы, ранней и средней прометафазы при этом не отличалось от обычного: формировались перинуклеарное кольцо в профазе и хаотическая фигура в прометафазе. Но на стадии поздней прометафазы из внешне нормальной хаотической фигуры строилось несколько веретен вместо одного (Шамина и др., 2004б). Результатом первого мейотического деления таких клеток являлась монада с микроядрами (рис. 1, е). Второе деление мейоза в таких монадах проходило резко аномально: на основе микроядер формировалось несколько биполярных веретен (рис. 1, ж), и продуктом мейоза была многоядерная монада, иногда рассеченная (рис. 1, з). Такой фенотип наблюдался во всех исследованных нами формах с аномалией «множественные веретена», т. е. в 13 различных генотипах гаплоидов кукурузы и пшенично-ржаных аллогатлоидов.

Однако нами был выявлен гаплоид кукурузы № 1498, в мейозе у которого множественные веретена в метафазе I не приводили к формированию многоядерных монад по окончании мейоза. Вместо этого результатом мейоза в МКП с множественными веретенами являлись внешне нормальные диады (с частотой около 50 %). Анализ цикла реорганизации цитоскелета в МКП показал некоторые отклонения от обычного его хода. На стадии поздней профазы I в МКП гаплоида № 1498 наблюдались изменения в формировании перинуклеарной структуры — цитоскелетного кольца. Оно формировалось не в перинуклеарной зоне МКП, а в кортикальной (рис. 2, а). Иногда в клетке формировались два кольца — одно в перинуклеарной,

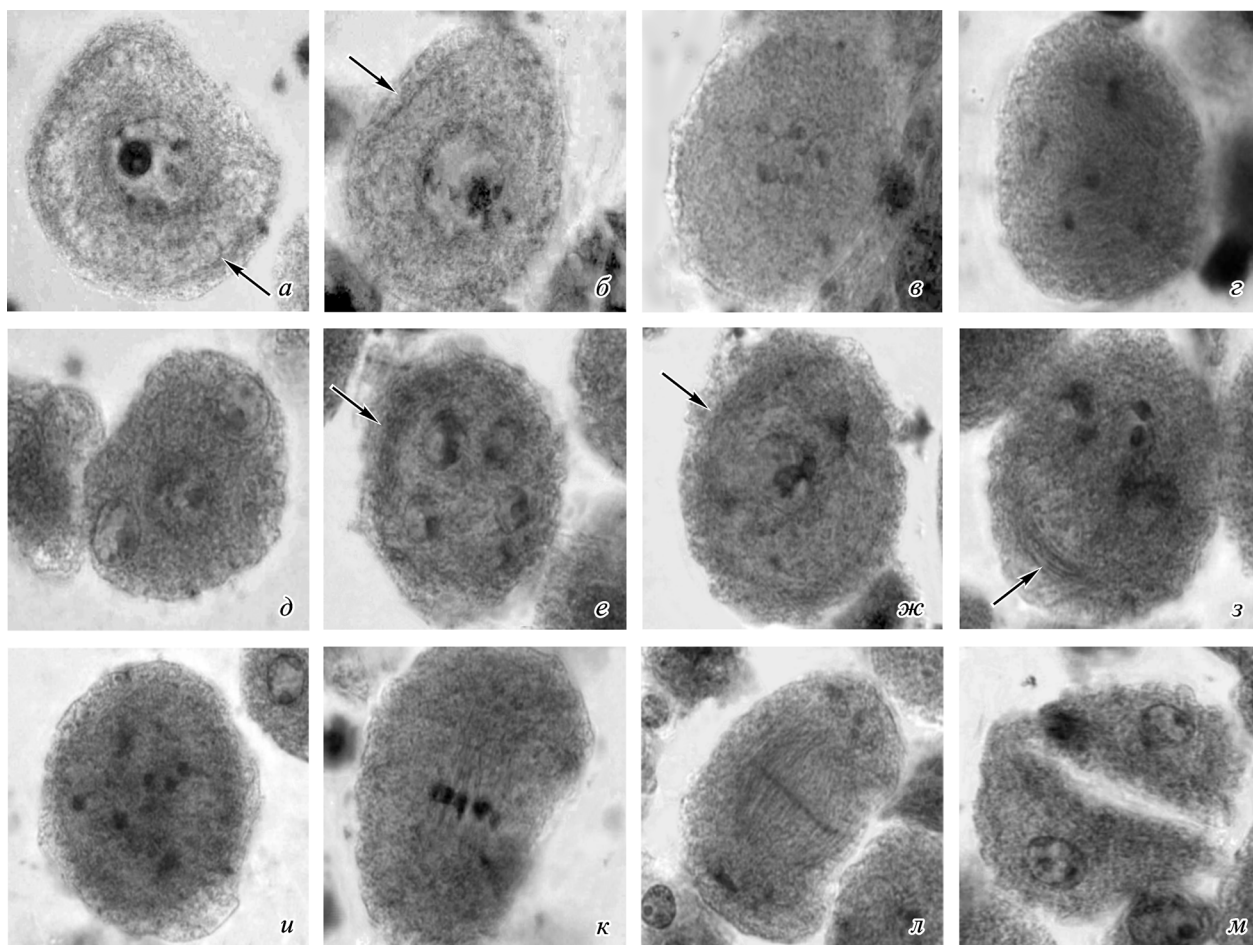


Рис. 2. Ход мейотического деления в МКП гаплоида № 1498.

a, б — кортикальные цитоскелетные кольца в профазе I (стрелки); *в* — общая хаотическая фигура в прометафазе I; *г* — множественные веретена в метафазе I; *д* — монада с микроядрами на стадии интеркинеза; *е—з* — кортикальное цитоскелетное кольцо в профазе II (стрелки); *и* — общая хаотическая фигура в прометафазе II; *к* — общее веретено деления в метафазе II; *л* — телофаза II; *м* — диада на стадии тетрад. Об. 100×, ок. 10×.

другое в кортикальной зоне (рис. 2, б). Частота МКП с кортикальными кольцевыми структурами цитоскелета достигала 70 %. После распада ядерной оболочки, в прометафазе, формировались внешне нормальные хаотические фигуры цитоскелета (рис. 2, в), из которых затем строились единичные биполярные либо множественные (в 40—50 % МКП) веретена (рис. 2, г). В интеркинезе из МКП с множественными веретенами формировались многоядерные монады (рис. 2, д). На стадии профазы II в них формировалось кортикальное цитоскелетное кольцо, опоясывающее все микроядра (рис. 2, е—з). В прометафазе II в таких клетках формировалась общая хаотическая фигура цитоскелета (рис. 2, и), из которой строилось одно общее биполярное веретено (рис. 2, к). Сегрегация хромосом и цитокинез происходили нормально (рис. 2, л), и продуктом мейотического деления являлась диада (рис. 2, м). Клетки-члены такой диады являются предшественниками нередуцированных 2n-гамет.

Обсуждение

Согласно нашим многочисленным наблюдениям аномального мейоза, деление многоядерных клеток в нем происходит двумя путями в зависимости от того, происходит это в первом или втором мейотическом делении.

Многоядерные МКП, наблюдаемые в профазе I, являются результатом нарушений последнего предмейотического митоза либо следствием цитомиксиса. Хромосомы множественных ядер в первом делении мейоза всегда объединяются в одно общее веретено деления (Шамина и др., 2004б). Напротив, во втором мейотическом делении в многоядерных клетках (сформировавшихся в результате аномалий первого мейотического деления) формируются, как правило, несколько веретен — соответственно числу ядер. Объединение их хромосом в общее веретено происходит только в отдельных случаях, за счет специфических механизмов мейотической реституции. Эти механизмы были описаны лишь в фенотипе «слившиеся веретена» в профазе и прометафазе II у двудольных (Подлиских и др., 2002; Conicella et al., 2003; Шамина и др., 2004а). Во втором мейотическом делении у видов однодольных растений объединение хромосом двух или нескольких ядер в общем веретене происходит только при условии тесного сближения этих ядер в пространстве клеточной цитоплазмы (Shamina et al., 1999).

С этой точки зрения фенотип гаплоида кукурузы № 1498 представляет собой редкое исключение. Множественные микроядра во втором мейотическом делении в этом фенотипе не сближаются, но их хромосомы объединяются в общем веретене. Мы полагаем, что причиной

этого является формирование кортикального цитоскелетного кольца в профазе II, охватывающего все микроядра. Показано, что перинуклеарное цитоскелетное кольцо, формирующееся в профазе, является непосредственным предшественником веретена деления: после распада ядерной оболочки кольцо распадается на отдельные микротрубочковые пучки, которые входят в зону бывшего ядра и принимают участие в формировании веретена деления (Шамина, 2003). Показательно, что после сближения профазных ядер в фенотипе «слившиеся веретена» их перинуклеарные кольца размыкаются и сливаются в общее кольцо, охватывающее оба ядра; из него затем строится общее веретено деления (Conicella et al., 2003; Шамина и др., 2004а). В многоядерных клетках в профазе I вокруг ядер формируется единое цитоскелетное кольцо (Шамина и др., 2003а, 2003б). Это указывает на то, что общее профазное кольцо цитоскелета способствует объединению генетического материала различных ядер.

Однако фенотип гаплоида № 1498 характеризуется явным противоречием: кортикальное кольцо цитоскелета формируется и в профазе I, предшествуя множественным веретенам в метафазе I. Иными словами, в первом делении мейоза кортикальное кольцо не препятствует «дисперсии» хромосом во множественные веретена даже в одноядерных МКП, тогда как во втором вызывает их объединение в общее веретено из нескольких ядер. Это противоречие можно объяснить, если вспомнить, что формирование множественных веретен происходит из общей хаотической фигуры цитоскелета в поздней прометафазе за счет нарушения процесса консолидации элементов цитоскелета в единую структуру (Шамина и др., 2004б). Причиной же формирования общего веретена на основе нескольких во втором мейотическом делении у гаплоида № 1498 является формирование общей хаотической фигуры цитоскелета из общего кортикального цитоскелетного кольца. Проанализировав 14 различных генотипов с аномалией «множественное веретено», мы не обнаружили ни в одном из них формирования множественных веретен в одноядерных клетках во втором мейотическом делении. Не проявляется эта аномалия в метафазе II и у гаплоида № 1498. Общее кольцо цитоскелета способствует объединению хромосом нескольких ядер путем формирования общей хаотической фигуры цитоскелета в средней прометафазе (Шамина и др., 2003а, 2003б). А уже на следующем этапе — в поздней прометафазе — из одной хаотической фигуры может сформироваться одно веретено или (в случае проявления аномалии) несколько. Именно поэтому кортикальное кольцо не может препятствовать формированию нескольких веретен в первом мейотическом делении у гаплоида № 1498. Оно в этом случае действует так же, как обычное перинуклеарное кольцо, которое обычно формируется в профазе I в фенотипе «множественные веретена» (Шамина и др., 2004а, 2004б). Но поскольку аномалия «множественные веретена» во втором мейотическом делении не проявляется, из одной общей хаотической фигуры формируется одно веретено.

Мы наблюдали массовое спонтанное формирование кортикальных цитоскелетных колец в профазе I в мейозе дикого типа у томата *Lycopersicon esculentum* сорта Черри (Шамина, 2005). Никакого влияния на ход деления они не оказывали. В профазе II, где (как и у большинства двудольных) два дочерних ядра находятся в общей цитоплазме, формирования кортикальных колец не наблюдалось никогда.

Итак, можно заключить, что тенденция формирования кортикальных колец в фенотипе гаплоида № 1498 приводит к реституционному процессу во втором мейотическом делении.

Список литературы

- Подлиских В. Е., Анкудо Т. М., Аношенко Б. Ю. 2002. Особенности формирования веретена деления и поведение хромосом в мейозе у образцов картофеля с мутацией «слившиеся веретена». Цитология. 44 (8) : 996—1004.
- Шамина Н. В. 2003. Динамика микротрубочек цитоскелета в мейозе высших растений. I. Околоядерное кольцо микротрубочек и построение мейотического веретена. Цитология. 45 (5) : 650—654.
- Шамина Н. В. 2005. Цикл реорганизации цитоскелета в делении растительной клетки: Дис. д-ра биол. наук. Новосибирск.
- Шамина Н. В., Дорогова Н. В., Серюкова Е. Г. 2003а. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе высших растений. II. Формирование перинуклеарного кольца микротрубочек. Цитология. 45 (7) : 655—660.
- Шамина Н. В., Дорогова Н. В., Серюкова Е. Г., Силкова О. Г. 2003б. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе высших растений. III. Стадии ранней прометафазы. Цитология. 45 (7) : 661—667.
- Шамина Н. В., Дорогова Н. В., Чередниченко А. Е. 2004а. Консолидация цитоскелета при формировании веретена деления в растительной клетке. II. «Слившиеся веретена». Цитология. 46 (8) : 685—689.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Шацкая О. А., Гаврилова Е. Д. 2004б. Консолидация цитоскелета при формировании веретена деления в растительной клетке. I. Аномалии, затрагивающие целостность веретена в мейозе. Цитология. 46 (7) : 587—591.
- Baskin T. I., Cande W. Z. 1990. The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41 : 27—35.
- Conicella C., Capo A., Cammareri M., Errico A., Shamina N., Monti L. 2003. Elucidation of meiotic nuclear restitution mechanisms in potato through analysis of microtubular cytoskeleton. Euphytica. 133 : 107—115.
- DeMey J., Lambert A.M., Bajer A.S., Moeremans M., DeBrunner M. 1982. Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus* endosperm with the immunogold staining method. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79 : 1898—1902.
- 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.
- Gunning B. E. S., Wick S. 1985. Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. J. Cell Sci. (Suppl. 2) : 157—179.
- Schmit A. C., Vantard M., DeMey J., Lambert A. M. 1983. Aster-like microtubule centers establish spindle polarity during interphase-mitosis transition in higher plant cells. Plant Cell Rep. 2 : 285—288.
- Shamina N. V. 2005. Formation of division spindle in higher plant meiosis. Cell Biol. Int. 29 : 309—318.
- Shamina N. V., Dorogova N. V., Orlova A. G., Trunova S. A., Gontcharov N. P. 1999. Abnormalities of spindle and cytokinesis behavior leading to meiotic restitution in cereals. Cell Biol. Int. 23 : 863—870.
- Smirnova E. S., Bajer A. S. 1998. Early stages of spindle formation and independence of chromosome and microtubule cycles in *Haemanthus* endosperm. Cell Motil. Cytoskeleton. 40 : 22—37.
- Traas J. A., Burgain S., Dumas de Vaulx R. 1989. The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant *Solanum melongena* L.: microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. J. Cell Sci. 92 : 541—550.

Wick S. 1991. The perprophase band. In: The cytoskeletal basis of plant growth and form. London: Acad. Press. 231—244.

Wick S. M., Duniec J. 1984. Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. II. Transition bet-

ween the pre-prophase band and the mitotic spindle. Protoplasma. 122 : 45—55.

Поступила 11 V 2006

CORTICAL CYTOSKELETAL RING AT PROPHASE II LEADS TO CORRECTION
OF ABNORMALITIES OF THE FIRST MEIOTIC DIVISION AND TO MEIOTIC RESTITUTION

N. V. Shamina,¹ I. A. Zaporozhchenko,² Yu. R. Maksutova,² O. A. Shatskaya³

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, ²Chair of Cytology and Genetics of Novosibirsk State University, and ³Kuban P. P. Lukianenko Research Agricultural Institute, Krasnodar

The deviation of prophase cytoskeletal ring formation was determined during meiotic division in 50 % of pollen mother cells (PMCs) in maize haploid № 1498 (*Zea mays*). At prophase in both meiotic divisions the cytoskeletal ring is formed in cortical region of cytoplasm instead of perinuclear. Sometimes formation of both perinuclear and cortical rings is observed in the same cell. It has been shown that in multinucleate PMCs the cortical ring leads to the consolidation of chromosomes into common spindle and to meiotic restitution.

Key words: cytoskeleton division spindle, PMCs, *Zea mays*, haploids, meiosis, microtubules.
