

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧКОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И КАЛЛОЗНЫХ ОБОЛОЧЕК В ПРОЯВЛЕНИИ ЦИТОМИКСИСА В МАТЕРИНСКИХ КЛЕТКАХ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L.

© Ю. В. Сидорчук, Е. В. Дейнеко, В. К. Шумный

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

Обсуждаются возможные причины цитомиксиса в материнских клетках пыльцы (МКП) растений табака *N. tabacum* L. на клеточном уровне. Проведен сравнительный анализ структуры и динамики тубулинового цитоскелета в ходе клеточного цикла в цитомиктичных и нормальных МКП. Изучено строение каллозных оболочек. Установлено, что микротрубочковый цитоскелет не играет видимой роли в процессе межклеточного перемещения ядерного материала. Повышенный уровень цитомиксиса сопровождается нарушениями синтеза каллозной оболочки в результате ее истончения и перфорации.

Ключевые слова: цитомиксис, материнские клетки пыльцы, мейоз, цитоскелет, каллозные оболочки.

Цитомиксис, или перемещение ядерного материала из одной клетки в другую, уже более века привлекает внимание исследователей. В настоящее время накоплен значительный фактический материал по цитологическому проявлению цитомиксиса у разных видов растений (Kamra, 1960; Heslop-Harrison, 1966; Шнайдер, 1975). Электронно-микроскопические исследования показали, что переход ядер и хромосом в материнских клетках пыльцы (МКП) происходит по цитомиктическим каналам, объединяющим мейоциты пыльника в общую систему (Heslop-Harrison, 1966; Feijo, Pais, 1989). Однако причины этого явления до сих пор изучены очень слабо. Цитомиксис в клетках растений связывают с нарушениями формирования клеточных стенок во время премейотических митозов (Kamra, 1960) или с изменениями в строении цитомиктических каналов (Heslop-Harrison, 1966; Шнайдер, 1975; Ван и др., 2004). Существует также ряд предположений о том, что причинами межклеточной миграции ядерного материала могут быть нарушения структуры и функций микротрубочкового цитоскелета (Feijo, Pais, 1989; Шамина и др., 2000) и каллозных оболочек (Falistocco et al., 1995; Caetano-Pereira, Pagliarini, 1997). В то же время четкой роли этих клеточных структур в процессе цитомиксиса показано не было.

В данной работе мы изучили структуру и динамику тубулинового цитоскелета, а также строение каллозных оболочек в МКП растений табака с целью выявить их возможную роль в межклеточных перемещениях ядерного материала.

Материал и методика

Материалом для исследований послужили трансгенные растения табака с удвоенным числом хромосом, выделенные нами ранее из серии независимо полученных

трансформантов (Дейнеко и др., 2000). Растения характеризовались высоким уровнем цитомиксиса в МКП на стадии профазы 1 мейоза (Сидорчук и др., 2004). В качестве контроля при сравнительном анализе строения и динамики тубулинового цитоскелета использовали растения исходной линии SR1, регенеранты, трансформанты с неизменной морфологией цветка и нетрансгенные растения с удвоенным числом хромосом. Регенеранты и трансформанты были получены из листовых эксплантов линии SR1 по стандартной методике (Horsch et al., 1985). Для удвоения числа хромосом и получения полиплоидных форм семена табака (линия SR1) обрабатывали колхицином по описанной методике (Smiley, Stokes, 1966). Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы с фотопериодом 16/8 ч (день/ночь), при 22/18 °C (день/ночь).

Структуру тубулинового цитоскелета анализировали в мейоцитах из пыльников, отобранных на необходимой стадии и зафиксированных 8 %-ным параформальдегидом в K⁺-фосфатном буфере (pH 6.8) при комнатной температуре в течение 1—2 ч. Каллозную оболочку удаляли смесью ферментов (1 % пектиназы и 3 % целлюлазы). Визуализацию цитоскелета в МКП растений табака проводили с использованием первичных антител на α -тубулин (monoclonal anti- α -tubulin, clone B-5-1-2, Sigma, product number T5168) и вторичных антител (anti-mouse IgG FITC conjugate; Sigma, США). Хромосомы окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в 20 %-ном глицерине.

Строение каллозных оболочек исследовали на примере линии с удвоенным числом хромосом Res79 и линии SR1 (в качестве контроля). Ультратонкие срезы готовили по описанной методике (Baskin et al., 1992). Каллозные оболочки окрашивали красителем Water blue (2 %-ный анилиновый голубой в 20 %-ном водном растворе K₃PO₄). Микроскопирование проводили в ультрафиолетовом свете при длине волны 360 нм.

Флуоресцентные фотографии получали на микроскопе Axioskop 2 plus с помощью фотонасадки AxioCamHR, используя объектив 100×.

Результаты

Структура и динамика микротрубочкового цитоскелета. Согласно нашим наблюдениям, в средней профазе первого деления мейоза в МКП растений табака цитоскелет представлен ретикулярной системой микротрубочек, пронизывающих весь объем клеточной цитоплазмы от поверхности ядерной оболочки к кортикальному слою цитоплазмы (рис. 1, а, б). Также на рис. 1 представлены две клетки, объединенные мигрирующим ядерным материалом (в, з), и клетка, практически полностью лишенная ядра в результате цитомиксиса (д, е). Ни в первом, ни во втором случае мы не обнаружили каких-либо отличий в структуре микротрубочкового цитоскелета МКП у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом от такового в МКП в группах контрольных растений.

В ходе мейотической профазы цитоскелет претерпевает ряд структурно-морфологических изменений от ретикулярной системы в ранней и средней профазе до перинуклеарной системы микротрубочек в поздней профазе. Проведенный нами анализ свидетельствовал о том, что динамика микротрубочкового цитоскелета на данной стадии мейоза не имеет каких-либо различий в нормальных клетках (рис. 2, а, б) и клетках с цитомиксисом (рис. 2, д, е). В ходе дальнейших фаз как первого, так и второго мейотических делений формирование биполярных веретен в метафазе (рис. 2, в, ж) и формирование интерзональных систем микротрубочек в телофазе—интеркинезе (рис. 2, з, э) проходят единообразно без нарушений в обоих типах клеток.

Формирование каллозной оболочки. Сравнение динамики формирования каллозной оболочки у контрольных и трансгенных растений с удвоенным числом хромосом в течение профазы I свидетельствовало о том, что у мутантных растений отложение каллозы и формирование оболочки происходили с нарушениями. Так, в пыльниках контрольных растений линии SR1 каллозные оболочки уже в средней профазе I равномерно окружали МКП и отделяли одну МКП от другой (рис. 3, а). Однако на примере линии Res79 нами было показано, что отложение каллозы у растений с удвоенным числом хромосом происходило неравномерно, с образованием перфорированных участков. Именно в этих участках с наименее выраженным каллозным слоем и наблюдалась миграция ядерного материала (рис. 3, б, в).

Финальным этапом мейоза является обособление молодых микроспор друг от друга внутри тетрады в результате формирования вокруг них достаточно мощного каллозного слоя (рис. 3, г—е). Однако нами показано, что в некоторой доле МКП отложение каллозы и формирование каллозных оболочек вокруг молодых микроспор могут происходить с нарушениями. В результате этого на стадии тетрад внутренние каллозные оболочки, сформировавшиеся в таких клетках, оказываются тонкими и в значительной степени перфорированными (рис. 3, ж, з), что, вероятно, может служить предпосылкой межклеточного перемещения ядерного материала между молодыми микроспорами внутри тетрады (рис. 3, и).

Обсуждение

Цикл реорганизации ядра и хромосом в растительной клетке тесно сопряжен с циклом другой структуры — микротрубочкового цитоскелета. При изучении трансгенной линии табака с мутантным фенотипом Шамина с коллегами (2000) было выдвинуто предположение о том, что высокий уровень цитомиксиса в этой линии вызван нарушениями микротрубочкового цитоскелета в профазе первого мейотического деления. Цитоскелет удерживает ядро в центре клетки. Если же эта функция им не выполняется, ядро может мигрировать по току цитоплазмы и контактировать с областью расположения цитомиктических каналов. Кроме того, при изучении цитомиксиса в МКП *Ophris lutea* на ультраструктурном уровне было обнаружено скопление пучков микротрубочек в непосредственной близости к цитомиктическим каналам (Feijo, Pais, 1989). Это также позволило нам предположить некоторую роль цитоскелетных структур в межклеточных перемещениях ядра и ядерного материала.

Проведенный нами анализ структуры и динамики микротрубочкового цитоскелета у мутантных растений, характеризовавшихся высоким уровнем цитомиксиса, не подтвердил ни одного из упомянутых выше предположений.

В МКП табака интерфазный ретикулярный цитоскелет в средней—поздней профазе преобразуется в систему радиальных пучков, которая в дальнейшем сменяется перинуклеарной профазной системой микротрубочек (Шамина, Сидорчук, 2006). Первые проявления цитомиксиса можно было наблюдать на самых ранних стадиях профазы I, когда цитоскелет еще представлен ретикулярной системой микротрубочек, что ставит его заякоривающую роль под сомнение. Более того, нами не было обнаружено каких-либо различий в структуре ретикулярного цитоскелета в МКП с цитомиксисом и без него. Даже потеря клеткой всего ядра или большей его части в результате цитомиксиса не сопровождалась видимыми изменениями ретикулярной системы микротрубочек.

В ходе мейотического деления в МКП табака цитоскелет претерпевает ряд структурно-морфологических реорганизаций, характерных для двудольных растений (Traas et al., 1989; Brown, Lemmon, 1996; Шамина, Сидорчук, 2006). Анализ мейоза от профазы первого деления и до стадии тетрад у полученных нами трансгенных растений табака с мутантным фенотипом не выявил каких-либо нарушений в динамике или организации микротрубочковой части цитоскелета МКП, которые позволили бы связать их с межклеточными перемещениями ядерного материала.

Известно, что цитомиктические каналы образуются *de novo* в процессе формирования каллозной оболочки вокруг МКП (Heslop-Harrison, 1966), и, следовательно, нарушение отложения каллозы может быть одной из возможных причин перемещения ядерного материала. В последние годы с помощью методов электронной микроскопии показано, что цитомиктические каналы образуются в местах локальной дегградации клеточной стенки, пронизанной многочисленными плазмодесмами. Более того, в таких местах наблюдали скопления везикул, что указывало на возможную роль каких-либо гидролитических ферментов, выделяемых этими везикулами, в дегградации клеточной стенки (Ван и др., 2004). Вполне возможно, что секреция везикулами гидролитических ферментов приводит не только к локальному разрушению клеточной стенки, но и

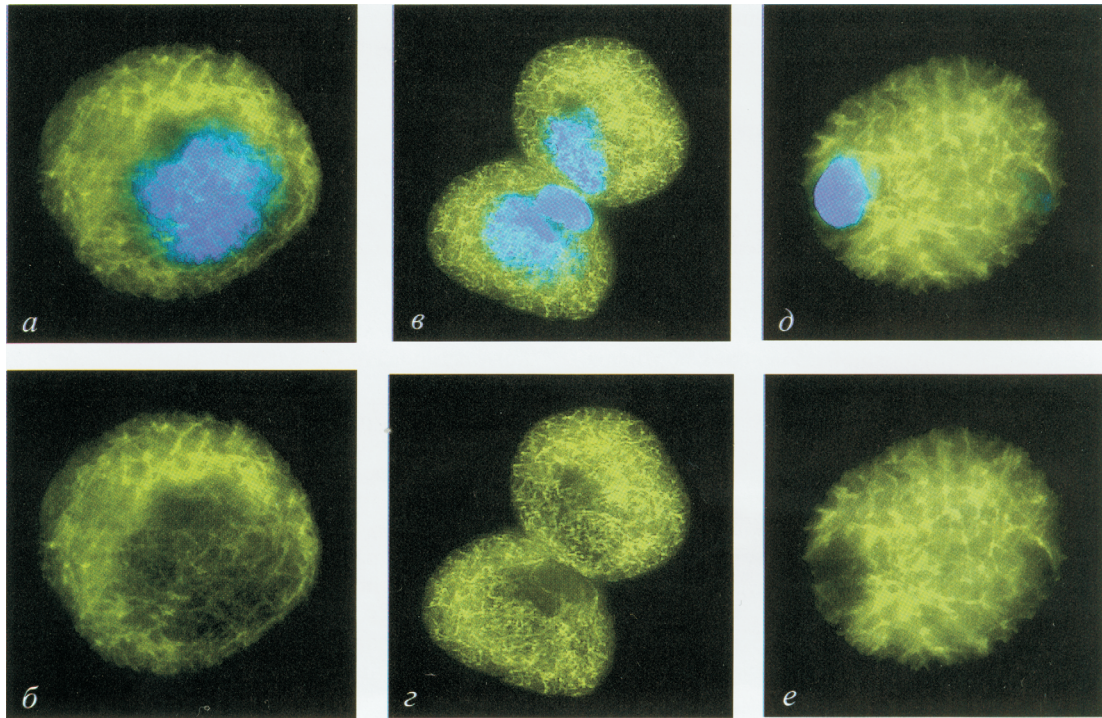


Рис. 1. Микротрубочковый цитоскелет в материнских клетках пыльцы (МКП) растений табака на стадии средней профазы I мейоза.

a, б — у растений табака исходной нетрансгенной линии SR1 (контроль) в МКП без цитомиксиса; *в—e* — в МКП у трансгенных растений табака с удвоенным числом хромосом: *в, z* — МКП, объединенные переходящим хроматином; *д, e* — МКП, почти полностью лишенная хроматина в результате цитомиксиса. *a, в, д*: *зеленый цвет* — цитоскелет, *синий* — хроматин в составе ядра; *б, z, e* — показан только цитоскелет.

к нарушению отложения каллозной оболочки путем ее растворения и перфорации.

Изложенные выше данные вполне согласуются с результатами по изучению динамики формирования каллозной оболочки у трансгенных растений с мутантным фенотипом на примере полученной нами линии Res79. Показано, что цитомиксису в МКП данной линии табака

сопутствует нарушение формирования каллозной оболочки. Возможно, это является необходимым условием ядерной миграции. Однако не вполне понятно, является ли устранение механической преграды между клетками также и достаточным при межклеточном перемещении оргanelл, поскольку до сих пор неизвестно, что является движущей силой этого процесса.

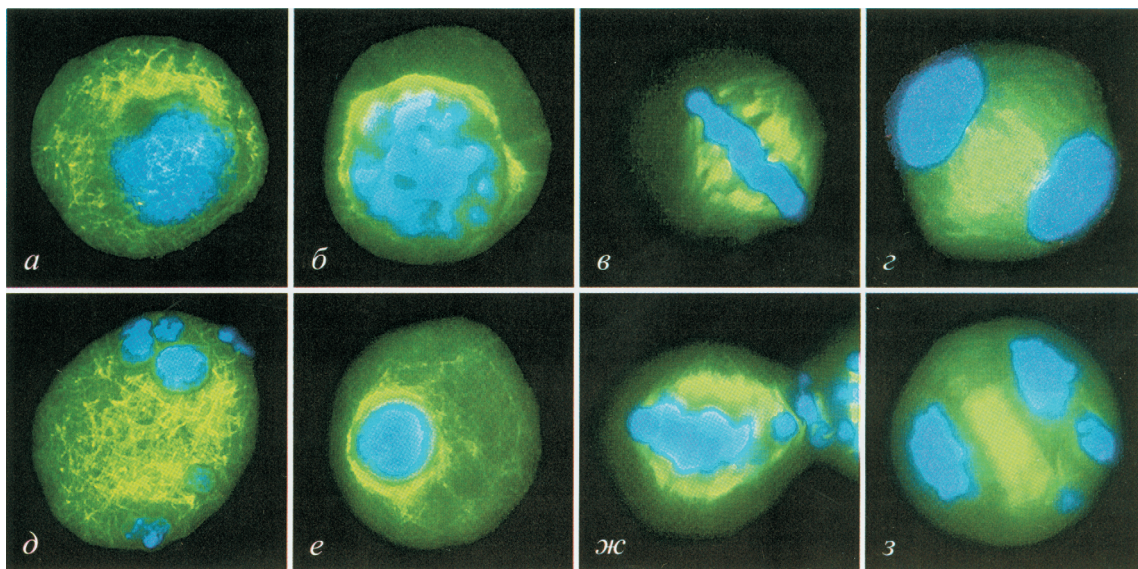


Рис. 2. Динамика микротрубочкового цитоскелета.

a—z — в МКП у растений исходной линии SR1 (контроль); *д—z* — в МКП с цитомиксисом у трансгенных растений табака с удвоенным числом хромосом; *a, д* — ретикулярный цитоскелет (средняя профаза I); *б, e* — перинуклеарный цитоскелет (поздняя профаза I); *в, ж* — веретено деления (метафаза I); *z, з* — интерзональная система микротрубочек (интеркинез). *Зеленый цвет* — цитоскелет, *синий* — хроматин в составе ядра, хромосомы.

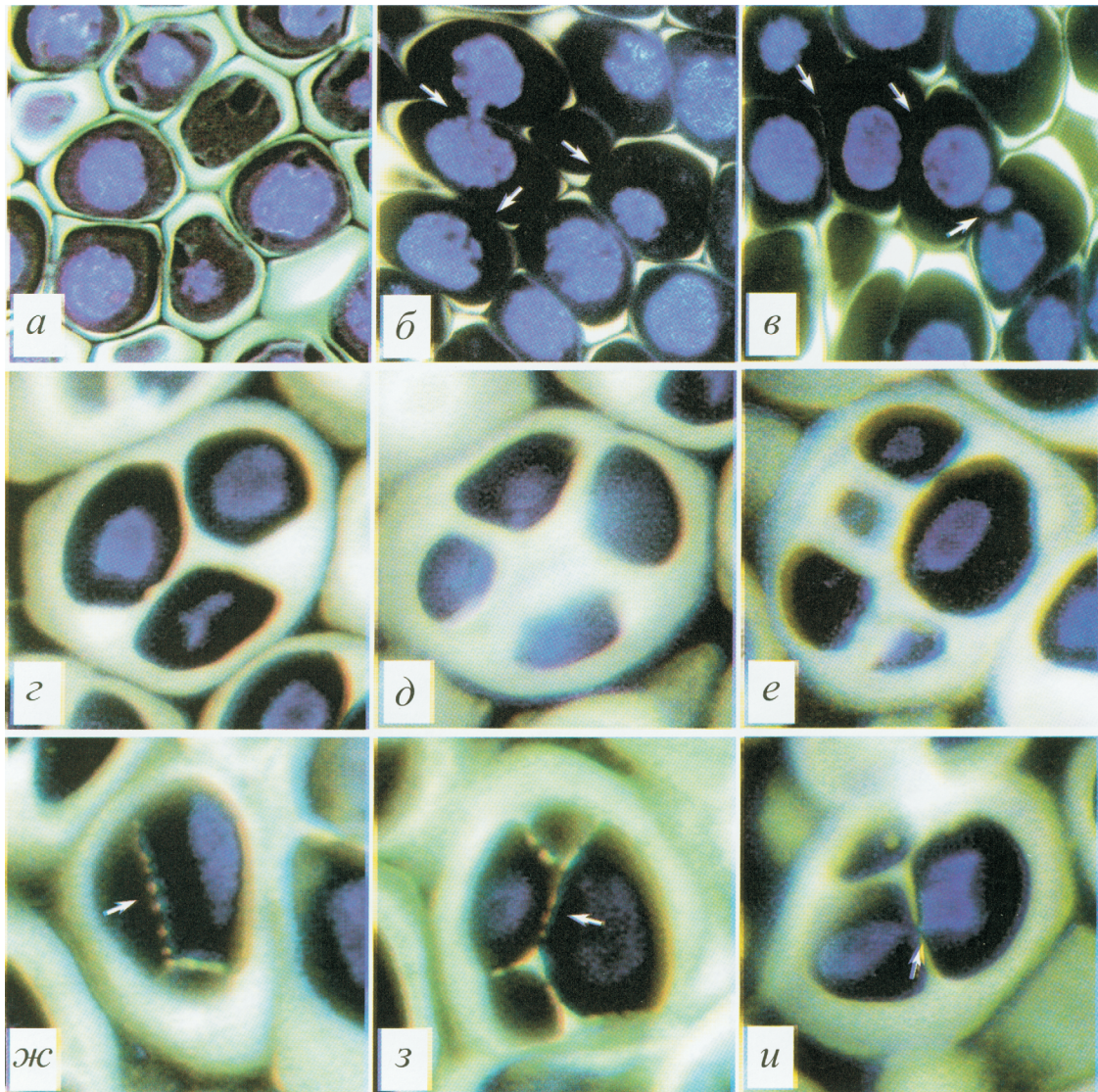


Рис. 3. Формирование каллозной оболочки на разных стадиях микроспорогенеза в мейоцитах трансгенной линии табака Res79 и в мейоцитах контрольной линии SR1.

a—в — профазы I мейоза; *г—и* — стадии тетрады; *a* — каллозная оболочка в мейоцитах контрольной линии SR1; *б, в* — нарушение отложения каллозы вокруг МКП мутантных растений с образованием перфорированных участков и цитомиксис; *г, д* — формирование каллозной оболочки в тетраде микроспор; *е* — формирование каллозной оболочки в полиаде; *жз, з* — перфорация каллозной оболочки между микроспорами на стадии тетрады; *и* — цитомиксис на стадии тетрады в клетках мутантной линии. (Материалы, представленные на рис. 3, получены в Plant Cell Biology Laboratory, Wageningen University, Нидерланды).

Итак, полученные нами данные позволяют утверждать, что микротрубочковый цитоскелет не играет видимой роли в процессе межклеточного перемещения ядерного материала. Повышенный уровень цитомиксиса у растений с удвоенным числом хромосом сопровождается нарушениями синтеза каллозной оболочки в результате ее истончения и перфорации.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Ведущие научные школы» (НШ-528.2006.4).

Список литературы

Ван С. Ю., Юй Ч. Х., Ли С., Ван Ч. И., Чжэн Г. Ч. 2004. Ультраструктура и возможное происхождение цитоплазма-

тических каналов, обеспечивающих связь между клетками вегетативных тканей пыльников. Физиол. раст. 51(1) : 110—120.

Дейнеко Е. В., Загорская А. А., Сидорчук Ю. В., Новоселя Т. В., Комарова М. Л., Филипенко Е. А., Шумный В. К. 2000. Особенности морфологических признаков и фертильности пыльцы у трансгенных растений табака. Физиол. раст. 47(1) : 73—78.

Сидорчук Ю. В., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. 2004. Цитомиксис в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.). Докл. РАН. 394(2) : 282—285.

Шамина Н. В., Дорогова Н. В., Загорская А. А., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. 2000. Нарушения мужского мейоза в трансгенной линии ges91 табака. Цитология. 42(12) : 1173—1178.

Шамина Н. В., Сидорчук Ю. В. 2006. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. X. Общая схема цитоскелетного цикла. Цитология. 48(5) : 427—437.

Шнайдер Т. 1975. К вопросу о цитомиксисе у растений. Изв. АН ЭССР. 24(3) : 199—209.

Baskin T., Busby C., Fowke L., Summut M., Gubler F. 1992. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta*. 187: 405—413.

Brown R. C., Lemmon B. E. 1996. Nuclear cytoplasmic domains, microtubules and organelles in microsporocytes of the slipper orchid *Cypripedium californicum* A. Gray dividing by simultaneous cytokinesis. *Sex. Plant Reprod.* 9 : 145—152.

Caetano-Pereira C. M., Pagliarini M. S. 1997. Cytomixis in maize microsporocytes. *Cytologia*. 62 : 351—355.

Falisto E., Tosti N., Falcinelli M. 1995. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes. *J. Heredity*. 86 : 448—453.

Feijo J., Pais S. 1989. Cytomixis in meiosis during the microsporogenesis of *Ophris lutea*: an ultrastructural study. *Caryologia*. 42 : 37—48.

Heslop-Harrison J. 1966. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. *Ann. Bot.* 30 : 592—600.

Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. I., Eichholtz D., Rogers S. G., Flaley R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227 : 1229—1231.

Kamra O. P. 1960. Chromatin extrusion and cytomixis in pollen mother cells of *Hordeum*. *Hereditas*. 46 : 592—600.

Smiley J. H., Stokes G. W. 1966. Induction and identification of tetraploid in burley tobacco. *Tobacco Sci.* 163 : 30—32.

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.

Поступила 27 IV 2006

THE ROLE OF MICROTUBULAR CYTOSKELETON AND CALLOSE WALLS IN THE CYTOMIXIS PROCESS IN TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.) POLLEN MOTHER CELLS

Yu. V. Sidorchuk, E. V. Deineko, V. K. Shumny

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

We have studied the microtubule cytoskeleton structure and callose walls deposition in the course of meiosis at the cytomictic and normal tobacco (*N. tabacum* L.) PMCs. It was ascertained that microtubule cytoskeleton did not play an evident part in the process of cytomixis. Increased cytomixis frequency probably is determined by irregular callose walls deposition. The possible reasons of nuclear material passage between tobacco PMCs at the cellular level are discussed.

Key words: cytomixis, pollen mother cells, meiosis, cytoskeleton, callose walls.