

## ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫЙ ЦИТОКИНЕЗ В МАТЕРИНСКИХ КЛЕТКАХ ПЫЛЬЦЫ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L.

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

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

У большинства видов двудольных растений цитокинез в МКП происходит однократно, после завершения двух циклов кариокинеза, т. е. по симультанному типу. В статье представлены цитологическая картина и частотные характеристики аномалии, при которой цитокинез в части МКП трансгенных растений табака инициировался уже после первого деления мейоза. Показано, что в таких клетках основные процессы реорганизации цитоскелета, характерные для симультанного типа цитокинеза, оставались без изменений. Однако в большинстве случаев преждевременное разделение цитоплазмы происходило с нарушениями, с образованием мембранного «тоннеля» или «надсечки». Установлено, что инициация дополнительного раунда цитокинеза не является препятствием к прохождению ядерного цикла и цитокинезу после второго деления мейоза. Таким образом, при данной аномалии происходила смена типа деления цитоплазмы — симультанного на сукцессивный.

Ключевые слова: материнские клетки пыльцы, цитокинез, цитоскелет, микротрубочки.

Принятые сокращения: МКП — материнские клетки пыльцы, МТ — микротрубочки.

В ходе нормального мейотического деления у большинства видов двудольных растений, к которым относится и табак, цитокинез проходит по симультанному типу. При таком типе цитокинеза образование дочерних клеточных мембран и разделение цитоплазмы МКП происходят однократно, после завершения двух циклов кариокинеза, когда в общей цитоплазме сформируются четыре дочерних ядра (Brown, Lemmon, 2001; Дорогова, Шамина, 2005; Шамина, Сидорчук, 2006). Правильная пространственная ориентация и координация деления при симультанном цитокинезе обеспечиваются особым аппаратом, состоящим из дочерних ядер в совокупности с радиальной системой МТ и образующим в объеме клетки ядерно-цитоплазматические домены (Brown, Lemmon, 1996, 2001). С помощью этого аппарата происходят дифференцировка цитоплазмы и маркирование определенных участков цитоплазмы, где должен произойти цитокинез. В структуре ядерно-цитоплазматических доменов большое значение имеет актиновая составляющая цитоскелета, которая, как предполагается, служит «матрицей» при формировании радиальной системы МТ (Traas et al., 1989).

Нормальное прохождение цитокинеза как фазы клеточного цикла обеспечивается не только правильной пространственной организацией плана деления, полноценным формированием системы фрагмопласт—клеточная пластинка, но и четкой временной координацией между карио- и цитокинезом (Guertin et al., 2002; Дорогова, Шамина, 2005). Начало цитокинеза должно быть согласовано с окончанием основных событий ядерного цикла. Разобщение этих процессов может приводить к нарушению цикла клеточного деления и в том числе к несвоевремен-

ному запуску цитокинеза и даже к смене типа деления цитоплазмы (Brown, Lemmon, 1991; Siddiqi et al., 2000; Magnard et al., 2001).

Современные методы визуализации субклеточных компонентов и молекулярного анализа позволили исследовать процесс цитокинеза на всех уровнях организации (Guertin et al., 2002). Тем не менее многие структурные и функциональные особенности цитокинетического аппарата растений пока остаются неясными (Дорогова, Шамина, 2005). К числу таких особенностей относятся, например, происхождение и динамика МТ фрагмопласта или механизмы включения (выключения) цитокинеза на субклеточном и молекулярном уровнях. В связи с этим анализ любых аномалий клеточного деления представляет интерес в свете решения проблемы пространственно-временной регуляции цитокинеза.

В лаборатории гетерозиса растений выделены трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L., линия SR1, в МКП которых наблюдался сложный комплекс нарушений мейотического деления. Одно из таких нарушений — цитокинез после первого деления мейоза. В данной работе представлена цитологическая картина этого нарушения на клеточном уровне, а также исследованы динамика МТ цитоскелета в МКП табака и его возможная роль в формировании этого признака.

### Материал и методика

Материалом для исследований служили трансгенные растения табака с мутантным фенотипом, обозначенные как Res61, Res73, Res79, 16.70 и 121.86. Данные растения

были выделены нами ранее из серии независимо полученных трансформантов и являлись спонтанными полиплоидами с измененной морфологией цветков и пониженным уровнем мужской фертильности (Дейнеко и др., 2000; Сидорчук и др., 2007). Для сравнительного анализа при выявлении особенностей цитокинеза у вышеобозначенной группы использовали растения исходной линии SR1 (контроль 1), регенеранты (контроль 2), трансформанты с неизменной морфологией цветка (контроль 3) и нетрансгенные растения с удвоенным числом хромосом (контроль 4). 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 известной методике (Smiley, Stokes, 1966). Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы с фотопериодом 16 ч день и 8 ч ночь, при температурах 22 °С днем и 18 °С ночью.

Для анализа мейотического деления бутоны цветков табака фиксировали по Карнуа (3 части 96%-ного этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение 1 сут. Фиксированный материал дважды промывали 70%-ным этанолом по 2—3 ч и хранили в 70%-ном этаноле при 4 °С. Цитологический анализ стадий мейоза проводили на давленных препаратах материнских клеток пыльцы (МКП) табака при окрашивании 4%-ным уксуснокислым кармином. Для каждого растения анализировали пыльники из 3—4 бутонов. Частоту клеток с преждевременным разделением цитоплазмы подсчитывали в первом делении мейоза в 1000—2500 мейоцитах для каждого пыльника.

Структуру тубулинового цитоскелета анализировали в мейоцитах из пыльников, отобранных на необходимой стадии и зафиксированных 4%-ным параформальдегидом в К-фосфатном буферном растворе (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  $\alpha$ -тубулин (monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin, clone B-5-1-2, SIGMA, product number T5168) и вторичных антител (anti-mouse IgG FITC conjugate, SIGMA, product number F0257). Хромосомы окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в 20%-ном глицерине.

Фотографии в проходящем свете делали на микроскопе Axioskop 2 plus с помощью фотонасадки MC 80 при увеличении (объектив  $\times$  окуляр) 1000 $\times$ . Флуоресцентные фотографии делали на микроскопе Axioskop 2 plus с помощью фотонасадки AxioCam HRc при увеличении (объектив  $\times$  окуляр) 1000 $\times$ .

## Результаты

Частота преждевременного цитокинеза. Преждевременный цитокинез наблюдался в МКП у всех проанализированных трансгенных растений табака с мутантным фенотипом. Как видно из данных, представленных в таблице, частота проявления этого признака варьировала в незначительных пределах от минимального значения 0.8 % у растения Res73 до максимального значения 3.7 % у растения Res61. В среднем же данная аномалия встречалась в анализируемой группе с частотой  $2.0 \pm 0.5$  %.

Ни в одной из контрольных групп растений с нормальным фенотипом, характеризовавшихся стандартным числом хромосом (контроли 1—3), равно как и в группе

Частота проявления преждевременного цитокинеза в МКП растений табака

Группы растений		Всего растений	Частота преждевременного цитокинеза, %
Трансгенные растения с мутантным фенотипом	Res61	1	3.7
	Res79	1	2.6
	121.86	1	1.6
	16.70	1	1.5
	Res73	1	0.8
	Среднее	7	$2.0 \pm 0.5$
Контроль 1 (SR1)		3	0
Контроль 2 (растения-регенеранты)		10	0
Контроль 3 (трансформанты с неизменной структурой цветка)		8	0
Контроль 4 (растения с удвоенным числом хромосом, $2n = 96$ )		3	0

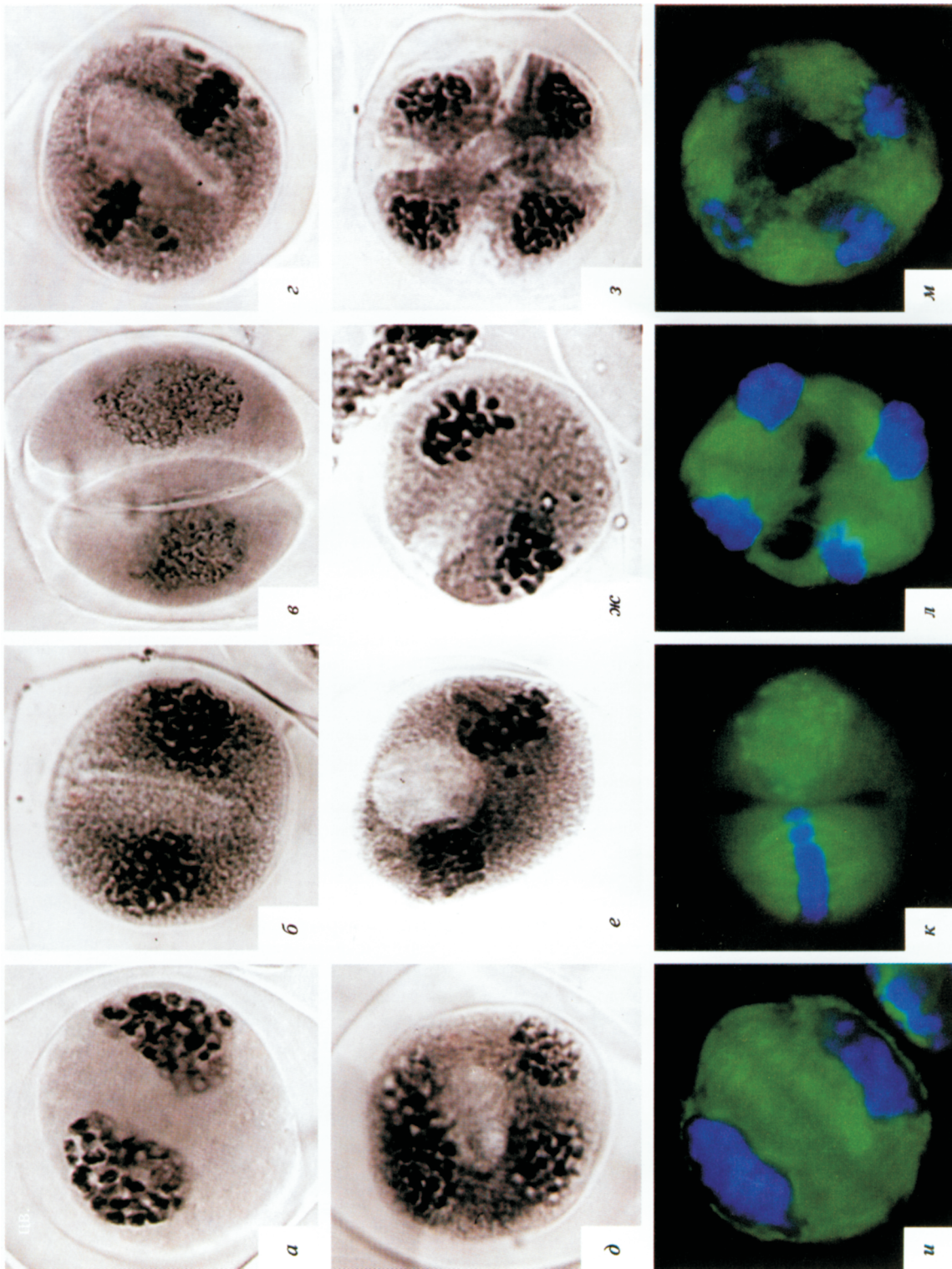
нетрансгенных растений с удвоенным числом хромосом (контроль 4), данной аномалии обнаружено не было. Цитокинез в МКП этих растений проходил обычным образом по симультанному типу после двух раундов кариогенеза (см. таблицу).

Особо следует отметить растение Res61, характеризовавшееся максимальным проявлением преждевременного цитокинеза (см. таблицу). В отдельных пыльниках данного растения цитокинез после первого деления мейоза наблюдался с частотой более 60 %. Однако явление это носило спорадический характер, и причины его не вполне понятны.

Цитологическая картина преждевременного цитокинеза. В большей части МКП у изученных нами растений табака с мутантным фенотипом первый раунд кариогенеза, как и положено, не завершался разделением цитоплазмы (см. рисунок, а). Однако в части клеток экваториальная зона между дочерними ядрами неожиданно начинала заполняться мембранными пузырьками, наблюдалось формирование клеточной пластинки и дочерних мембран уже после первого мейотического деления (см. рисунок, б). В незначительной части клеток деление проходило полностью и заканчивалось формированием обычной диады (см. рисунок, в). Однако в большинстве случаев в МКП, где наблюдался данный феномен, для формирования полноценной клеточной пластинки, вероятно, не было всех необходимых условий, и она была не способна равномерно пересечь всю цитоплазму. Дочерние мембраны чаще всего образовывались в виде полого цилиндра, пронизывающего объем цитоплазмы, в результате чего мы назвали этот феномен «тоннельный» цитокинез (см. рисунок, г—е).

Следует отметить, что наличие мембранного «тоннеля», сформировавшегося в МКП в конце первого деления мейоза, никак не влияло на прохождение второго деления. Построение метафазных пластинок, анафазное движение хромосом и формирование телофазных ядер происходили обычным образом без отклонений от нормы (см. рисунок, г, д).

Как правило, «тоннель» формировался по центру клетки, разделяя ее на условные компартменты, в кото-



Преждевременный цитокинез в МКП у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом.

*а* — телофаза I в норме; *б* — формирование клеточной пластинки в экваториальной зоне в телофазе I; *в* — диада клеток, образовавшаяся после первого деления мейоза; *г*, *д* — неполный цитокинез, дочерние мембраны в виде «стопней»; *е*, *ж* — формирование дочерних мембран со смещением к периферии МКП и образование «надсечки»; *з* — четырехъядерная молада, сформировавшаяся из МКП с преждевременным цитокинезом в первом делении мейоза и неполным цитокинезом во втором делении мейоза; *и* — интерзональная система МТ в МКП табака; *к* — формирование веретена второго деления в метафазе 2; *л*, *м* — формирование интерзональной системы МТ в телофазе 2. Об. 100X, ок. 10X. *а-г* — окрашивание ацетокармином; *и-м* — иммунофлуоресцентное окрашивание, *зеленый цвет* — цитоскелет, *синий цвет* — хромосомы и ядра.

рых располагались дочерние ядра. В редких случаях формирование дочерних мембран происходило не по центру МКП, а со значительным смещением к ее периферии (см. рисунок, *е*). Результатом такого смещения было образование не «тоннеля», а «надсечки» с одной из сторон клетки (см. рисунок, *ж*).

Таким образом, образованные в результате дополнительного раунда клеточного деления двуйдерные клетки можно рассматривать как разновидность аномальных диад с неполным разделением цитоплазмы.

Динамика микротрубочкового цитоскелета в МКП с преждевременным цитокинезом. Процесс построения характерной для мейоза двудольной биполярной системы фибрилл на стадии телофазы 1, интерзональной системы МТ, проходил единообразно как в клетках с преждевременным цитокинезом, так и в клетках контрольных растений (см. рисунок, *и*). Формирование веретен второго деления, а также кариокинез в каждом из условных компартментов проходили независимо и без видимых нарушений (см. рисунок, *к*). Цикл кариокинеза, как и в норме, заканчивался образованием четырех ядер, расположенных симметрично вокруг мембранного «тоннеля» первого деления (см. рисунок, *л, м*).

Дальнейшее развитие клеточного деления в таких клетках в целом происходило в соответствии с нормой и заканчивалось цитокинезом. Однако наличие в цитоплазме клетки во время второго деления мейоза мембранного «тоннеля» накладывало свой отпечаток на динамику микротрубочкового цитоскелета в телофазе 2.

В телофазе 2 в МКП с «тоннельным» цитокинезом дочерняя мембрана, сформированная после первого деления мейоза, механически препятствовала образованию части вторичных веретен и интерзональной системы МТ. В результате этого четыре ядра оказывались связанными друг с другом интерзональными пучками МТ не тетраэдрически, как в норме, а по кольцу (см. рисунок, *л, м*). Как следствие в МКП вместо шести образовывались четыре фрагмoplastа. Области перекрытия интерзональных фибрилл заполнялись пузырьками клеточной пластинки. Можно предположить, что в части клеток, в случае если формирование системы фрагмoplast—клеточная пластинка происходило правильно, пузырьки клеточной пластинки достигали кортикальной зоны и образовывали дочернюю мембрану, сливаясь с материнской. В результате двух раундов цитокинеза в таких клетках формировалась тетрада микроспор, выделить которую в общей массе тетрады довольно трудно. Если же формирование системы фрагмoplast—клеточная пластинка происходило с отклонениями, например со смещением к периферии МКП, то деление цитоплазмы происходило не полностью, а в виде «надсечек». В данном случае результатом двух раундов цитокинеза являлась четырехъядерная монада своеобразной формы (см. рисунок, *з*).

### Обсуждение

У видов двудольных растений, в том числе и у табака, первое деление мейоза заканчивается формированием интерзональной цитоскелетной системы, которая играет роль неподвижного фрагмoplastа и одновременно выполняет функцию радиального цитоскелета в интеркинезе (Дорогова, Шамина, 2005; Шамина и др., 2006; Шамина, Сидорчук, 2006). В норме отсутствие цитокинеза на данном этапе клеточного цикла обеспечивается, по-видимо-

му, запрограммированным блоком образования клеточной пластинки (Дорогова, Шамина, 2005; Шамина и др., 2006). Описанная нами аномалия свидетельствует о том, что интерзональная система МТ, сформированная в МКП табака после первого деления мейоза, вполне функциональна, чтобы обеспечить формирование клеточной пластинки и дальнейшее ее преобразование в дочернюю мембрану. Однако эффективность этой системы в большинстве случаев недостаточна, чтобы координировать процесс цитокинеза в полной мере, о чем и свидетельствует появление МКП с неполным разделением цитоплазмы у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом.

Появление МКП с неполным разделением цитоплазмы по типу «тоннельного» цитокинеза отмечено у межродовых гибридов злаков (Шамина и др., 2003). Аномальный вид клеточной пластинки в данном случае был вызван блоком цитокинеза в телофазе 1 мейоза. Однако само по себе деление цитоплазмы в первом делении мейоза является нормой для злаков. У трансгенных же растений табака аномальный «тоннельный» вид формирующейся клеточной пластинки является вторичным нарушением, тем более что в части клеток деление цитоплазмы происходит полностью. Основным нарушением в данном случае является инициация дополнительного раунда цитокинеза в первом делении мейоза, что нехарактерно для двудольных. Таким образом, при данной аномалии происходит смена типа деления цитоплазмы — симультанного на сукцессивный. По-видимому, в части МКП мутантных растений нарушается механизм, обеспечивающий сопряжение между делением ядра и делением цитоплазмы во времени, вследствие чего процесс образования клеточной пластинки и дочерних мембран запускается уже после первого деления мейоза. При этом, как нами показано, преждевременный цитокинез не отменяет и не препятствует цитокинезу после второго деления мейоза. Причем все морфологические процессы, характерные для симультанного типа цитокинеза и лежащие в основе формирования системы фрагмoplast—клеточная пластинка, остаются без изменений.

Известно несколько мутаций, одним из фенотипических эффектов которых является внеплановая активация деления цитоплазмы в ходе мейоза и смена типа деления цитоплазмы. Так, мутация *dyad* у арабидопсиса приводила к блокированию второго деления мейоза при развитии мегагаметофита, но первое деление завершалось разделением цитоплазмы и формированием диад (Siddiqi et al., 2000). Мутация *tam* у арабидопсиса характеризовалась значительной задержкой прохождения фаз мейотического деления в части МКП. Это приводило к сильной асинхронности мейоза и двум последовательным раундам цитокинеза в первом и втором делениях, т. е. по сути к переключению в части клеток симультанного типа цитокинеза на сукцессивный (Magnard et al., 2001). Смена типа цитокинеза была также обнаружена при изучении роли цитоскелета в определении плана деления МКП у гибридов орхидей (Brown, Lemmon, 1991).

Согласно имеющимся на сегодняшний день в научной литературе данным, преждевременное образование дочерних мембран может свидетельствовать о существовании специального механизма запуска цитокинеза. И хотя этот механизм сопряжен с ядерным циклом, эта связь далеко не жесткая, и поэтому даже когда ядерный цикл не закончен или блокирован, цитокинез все равно может инициироваться и завершиться образованием дочерних мембран (Siddiqi et al., 2000; Magnard et al., 2001;

Дорогова, Шамина, 2005). Поэтому единственной причиной описанного фенотипа может быть, на наш взгляд, нарушение в регуляторной системе цитокинеза, которое вызывает преждевременную, «внеплановую», активацию сигнала, обуславливающего запуск процесса образования дочерней мембраны.

Итак, завершающий этап первого деления мейоза у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом характеризовался разобщением временной координации между кардио- и цитокинезом в небольшой части клеток. Фенотипически это нарушение проявлялось в преждевременном запуске цитокинеза после первого деления мейоза. Показано, что в большинстве случаев преждевременное разделение цитоплазмы происходило с нарушениями. Клеточная пластинка строилась не полностью, а образовывала мембранный «тоннель» или «надсечку». Преждевременный цитокинез не являлся препятствием к прохождению ядерного цикла и цитокинезу после второго деления мейоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

#### Список литературы

- 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.
- Дорогова Н. В., Шамина Н. В. 2005. Организация цитокинеза в делении растительной клетки. Цитология. 47 (7) : 563—576.
- Сидорчук Ю. В., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. 2007. Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. с мутантным фенотипом. Цитология. 49 (10) : 870—875.

Шамина Н. В., Дорогова Н. В., Серюкова Е. Г. 2003. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе высших растений. II. Формирование перинуклеарного кольца микротрубочек. Цитология. 45 (7) : 655—660.

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.

Шамина Н. В., Сидорчук Ю. В., Дорогова Н. В. 2006. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. IX. Завершение цикла. Переход от фрагмопласта к интерфазной системе цитоскелета. Цитология. 48 (5) : 418—426.

Brown R. C., Lemmon B. E. 1991. Pollen development in orchids. 1. Cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. Protoplasma. 163 : 9—18.

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.

Brown R. C., Lemmon B. E. 2001. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. Protoplasma. 215 : 35—49.

Guertin D. A., Trautmann S., McCollum D. 2002. Cytokinesis in Eukaryotes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66 : 155—178.

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

Magnard J.-L., Yang Ming, Chen Y.-C. S., Leary M., McCormick Sh. 2001. The *Arabidopsis* gene *tardy* asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis I. Plant Physiol. 127 : 1157—1166.

Siddiqi I., Ganesh G., Grossniklaus U., Subbiah V. 2000. The *dyad* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. Development. 127 : 197—207.

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 17 IX 2007

#### PREMATURE CYTOKINESIS IN POLLEN MOTHER CELLS OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS *NICOTIANA TABACUM* L.

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

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

In majority species of dicotyledonous plants cytokinesis in PMCs occurs once after completion of two caryokinesis cycles, that is a simultaneous type. This paper represents cytological picture and frequency characteristics of abnormality which resulted in cytokinesis triggering after first meiotic division in a part of transgenic tobacco PMCs. It was shown that the main process of cytoskeleton reorganization typical for simultaneous cytokinesis remained without any alterations in such cells. However, in most cases premature cell division occurred with abnormalities such as membrane «tunnel» or «gash» formation. It was ascertained that initiation of additional round of cytokinesis did not block nuclear cycle and cytokinesis after second meiotic division. Thus, transition of cell division from simultaneous type to successive one occurs under this abnormality.