

ФОРМИРОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ФРАГМОПЛАСТА КОМПЕНСИРУЕТ НАРУШЕНИЕ ЦИТОКИНЕЗА В МЕЙОЗЕ У ПШЕНИЧНО-РЖАНОГО ГИБРИДА

© Е. И. Гордеева, Н. В. Шамина,¹ Л. Ф. Дудка,² В. Я. Ковтуненко,² Е. У. Болоболова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,
и ² Краснодарский НИИ сельского хозяйства им. П. П. Лукьяненко;
¹ электронный адрес: shamina@bionet.nsc.ru

Описан оригинальный механизм компенсации дисфункции фрагмопласта в мейозе у пшенично-ржаного гибрида первого поколения. Материнские клетки пыльцы (МКП) этого гибрида имеют описанный нами ранее у пшенично-пырейных (ППГ) и пшенично-ржаных (ПРГ) гибридов фенотип, при котором блокирован важный этап цикла цитоскелета: переход от системы фибрилл центрального веретена (в виде сплошного тяжа) к фрагмопласту (в виде полого цилиндра). Этот блок делает невозможным центробежное движение фрагмопласта и клеточной пластинки, в результате чего цитокинез не происходит и продуктом деления является двуядерная монада или монада с реституционным ядром. В МКП ПРГ F1 № Д-144гп 06г. F₁ (*T. aestivum* сорта 93—60 т 9 × *S. cereale* сорта Саратовская 7) с таким фенотипом в поздней телофазе формируется дополнительный фрагмопласт. Это происходит посредством механизма, характерного для формирования неподвижного фрагмопласта в симультанном цитогенезе в мейозе у двудольных, т. е. за счет полимеризации микротрубочек от полюсов веретена. Новый фрагмопласт формирует клеточную пластинку и, двигаясь центробежно, совершает цитокинез.

Ключевые слова: деление клеток, материнские клетки пыльцы, мейоз, отдаленные гибриды злаков, цитокинез, цитоскелет, фрагмопласт.

Принятые сокращения: МКП — материнские клетки пыльцы, МТ — микротрубочки, ППГ F1 — пшенично-пырейный гибрид первого поколения, ПРГ F1 — пшенично-ржаной гибрид первого поколения.

Цитокинез — фундаментальный завершающий процесс клеточного деления, приводящий к необходимой автономизации сегрегировавшего генетического материала в цитоплазме делящейся клетки. В растительной клетке по причине наличия жесткой клеточной стенки разделение цитоплазмы осуществляется не путем перетяжки, как в клетке животной, а отложением мембранных пузырьков между дочерними группами хромосом (см. обзор: Jurgens, 2005). Этот монослой пузырьков (клеточная пластинка) распространяется из центра клетки к материнской мембране вследствие активности специальной цитоскелетной структуры — фрагмопласта. Он представляет собой «частотол» микротрубочек (МТ), окружающих клеточную пластинку и транспортирующих в область ее растущего края мембранные пузырьки (пластосомы). МТ фрагмопласта ориентированы (+)-концами к растущему краю клеточной пластинки, где перекрываются (Gunning, 1982; Otegui, Staehelin, 2000). Вместе с расширением клеточной пластинки микротрубочки фрагмопласта сдвигаются из центра клетки к ее периферии, т. е. совершают центробежное движение, причем за счет собственного активного механизма (Nishihama, Machida, Shamina et al., 2007). Формирование фрагмопласта в растительной клетке происходит различными путями в зависимости от ткани. В эндосперме лилии гемантус (*Haemanthus*) и в материнских клетках пыльцы (МКП) у двудольных видов МТ фрагмопласта полимеризуются от полюсных районов те-

лофазного веретена и объединяются (+)-концами (DeMeu et al., 1982; Traas et al., 1989; Otegui et al., 2001; Шамина, Дорогова, 2006). В МКП однодольных видов фрагмопласт является производным центрального веретена (Шамина и др., 2006а). В меристематических клетках он формируется de novo на экваторе клетки (Smith, 1999; Granger, Cug, 2000). Однако взаимное расположение и ориентация микротрубочек во фрагмопласте во всех этих случаях сохраняются неизменными: (–)-концы обращены к дочерним ядрам, (+)-концы соединяются на экваторе.

В МКП злаков фибриллы центрального веретена, функционирующие в телофазе в качестве фрагмопласта, формируются еще в средней прометафазе путем соединения (+)-концов свободных МТ прометафазной хаотической фигуры (Шамина и др., 2005а). Образовавшиеся в результате этого биполярные фибриллы ((–)-концы МТ на концах, (+)-концы в центре) ориентируются биполярно в поздней прометафазе (Шамина и др., 2005б) и формируют центральное веретено. После расхождения хромосом к полюсам система центральных фибрилл веретена начинает транспорт мембранных пузырьков к (+)-концам своих МТ, т. е. в экваториальную зону клетки. В результате там возникает зачаток клеточной пластинки, вокруг которой перераспределяются, окружая ее, фибриллы центрального веретена. Таким образом, система фибрилл на этом этапе преформируется из «цельной колонны», или «сплошного пучка» (центральное веретено), в «полый ци-

линдр» (фрагмопласт, готовый начать центробежное движение). Центробежное движение фрагмопласта в мейозе происходит, согласно нашим данным, за счет удлинения его фибрилл и их одновременного изгиба. В результате сочетания этих процессов точки перекрывания (+)-концов МТ, куда поступают мембранные пузырьки, перемещаются центробежно (Shamina et al., 2007). При этом каждая фибрилла фрагмопласта ведет себя автономно.

В некоторых аномальных фенотипах с нарушениями цитокинеза (пшенично-пырейные и пшенично-ржаные гибриды; ППГ и ПРГ соответственно) пространственное перераспределение фибрилл центрального веретена с формированием полого цилиндра блокировано. В результате фрагмопласт имеет аномальную структуру: его фибриллы остаются в конфигурации центрального веретена и в ходе центробежного движения удлиняются и изгибаются как единое целое. Другими словами, такой аномальный фрагмопласт функционирует как одна-единственная фибрилла. Клеточная пластинка при этом не может нормально формироваться и расти, поэтому разделения цитоплазмы не происходит. Продуктами деления МКП с таким фенотипом являются двуядерные монады (Шамина и др., 2006а).

В настоящей работе описан оригинальный механизм компенсации этой аномалии в мейозе у ПРГ за счет формирования в поздней телофазе нового, уже нормального, фрагмопласта. Его МТ полимеризуются от полюсов аномального изогнутого телофазного веретена и соединяются концами на экваторе. После этого процесс цитокинеза начинается «сначала», уже с участием нового фрагмопласта, который формирует клеточную пластинку, движется вместе с ней центробежно и успешно разделяет цитоплазму. Этот фенотип вскрывает гибкость цитокинеза в растительной клетке и за счет этого возможность коррекции аномалий.

Материал и методика

Для цитологического анализа использовали материнские клетки пыльцы пшенично-пырейных (ППГ F1 № 9—260, 9—261 (*Triticum aestivum* L., cv. Novosibirskaya 67 × *Agropyron glaucum* L.) и пшенично-ржаных (ПРГ F1 № Д-143гп 06г. F₁ *T. aestivum* сорта 93—60 т 9 × *S. cereale* сорта Naruichiban, ПРГ F1 № Д-144гп 06г. F₁ *T. aestivum* сорта 93—160 т 9 × *S. cereale* сорта Саратовская 7 и ПРГ F1 № Д-147гп 06г. F₁ *T. aestivum* сорта Кума × *S. cereale* сорта Naruichiban) аллогаплоидов. Растения выращивали в поле в климатических условиях Омской обл. (ППГ) и Краснодарского края (ПРГ). Бутоны на стадии мейоза фиксировали модифицированным фиксатором Навашина (Wada, Kusunoki, 1964) при комнатной температуре в течение суток и затем хранили в фиксаторе при 4 °С. Из пыльников приготавливали давленные ацетокарминовые препараты по рутинной методике. Наблюдения проводили на микроскопе Olympus 50X.

Результаты

В мейозе у большинства отдаленных гибридов злаков первого поколения цикл морфологических перестроек цитоскелета в ходе клеточного деления не отличается от дикого типа (рис. 1, а—з). Фрагмопласт формируется из системы фибрилл центрального веретена (рис. 1, б). В средней телофазе на экваторе центрального веретена строится

клеточная пластинка, а фибриллы фрагмопласта удлиняются, изгибаются и совершают центробежное движение вместе с растущей клеточной пластинкой (рис. 1, в, з).

Ход мейоза в МКП изученной в настоящей работе группы гибридов (ППГ F1 № 9—261, ПРГ F1 № Д-143) не отличался от тривиального до начала средней телофазы I. На этой стадии в 60—70 % МКП телофазное веретено начинало постепенно изгибаться (рис. 1, д—з), и этот процесс продолжался вплоть до поздней телофазы I, так что телофазные группы хромосом на полюсах веретена сближались сообразно с его изгибом. Никаких признаков формирования клеточной пластинки на экваторе изгибающегося веретена не наблюдалось. Толщина веретена не увеличивалась в ходе телофазы, но увеличивалась его длина. Иногда в результате изгиба веретено приобретало форму кольца или спирали (рис. 1, и—л). Поздняя телофаза в таком фенотипе характеризуется предельным сближением дочерних телофазных групп на полюсах изогнутого веретена (рис. 1, и—м), что приводит к реституции ядер в первом мейотическом делении. Во втором делении мейоза фрагмопласт строится и функционирует, как правило, нормально. Продуктами мейоза МКП с таким фенотипом являются нередуцированные гаметы в виде диад на стадии тетрад.

В отличие от этого в МКП ПРГ F1 № Д-143 и ППГ F1 № 9—260 после предельного изгиба веретена в поздней телофазе I происходило следующее. После того как полюса веретена и дочерние группы хромосом сближались, от полюсных районов веретена начиналась полимеризация МТ по направлению друг к другу и объединение их концов (рис. 2, а—в). В результате формировался добавочный фрагмопласт, на экваторе которого строилась клеточная пластинка, и вся цитокинезная фигура начинала центробежное движение (рис. 2, з—е). Растущая клеточная пластинка пересекала всю цитоплазму, включая и экваториальную зону изогнутого телофазного веретена, затем формировались дочерние клеточные мембраны, и цитокинез благополучно завершился (рис. 2, ж, з). Сформированные в результате этого процесса диады с анеуплоидными клетками-членами имели характерный вид: ядра дочерних клеток были аномально сближены, но дочерние клеточные мембраны их, тем не менее, разделяли (рис. 2, и). Во втором мейотическом делении формировались прямые биполярные веретена, карио- и цитокинез в этих клетках происходили нормально. Продуктами мейоза в описанном фенотипе были анеуплоидные, но морфологически нормально сформированные тетрады с равно-великими клетками-членами.

В МКП ППГ F1 № Д-147 мы наблюдали морфологическую вариацию фенотипа с блоком формирования фрагмопласта. В этом варианте изгибающееся телофазное веретено практически не удлинялось, но значительно утолщалось (рис. 2, к—м). Однако нормального центробежного движения такой аномальный фрагмопласт также не совершал, и клеточная пластинка в нем не строилась. Дополнительный фрагмопласт в этом случае не формировался. Дочерние телофазные группы хромосом также сближались за счет изгиба тела веретена. Продуктом деления таких клеток были двуядерные или одноядерные монады.

Обсуждение

Значительное число внутриклеточных морфологических процессов, осуществляемых растительным цитоскелетом, предполагает наличие большого разнообразия сиг-

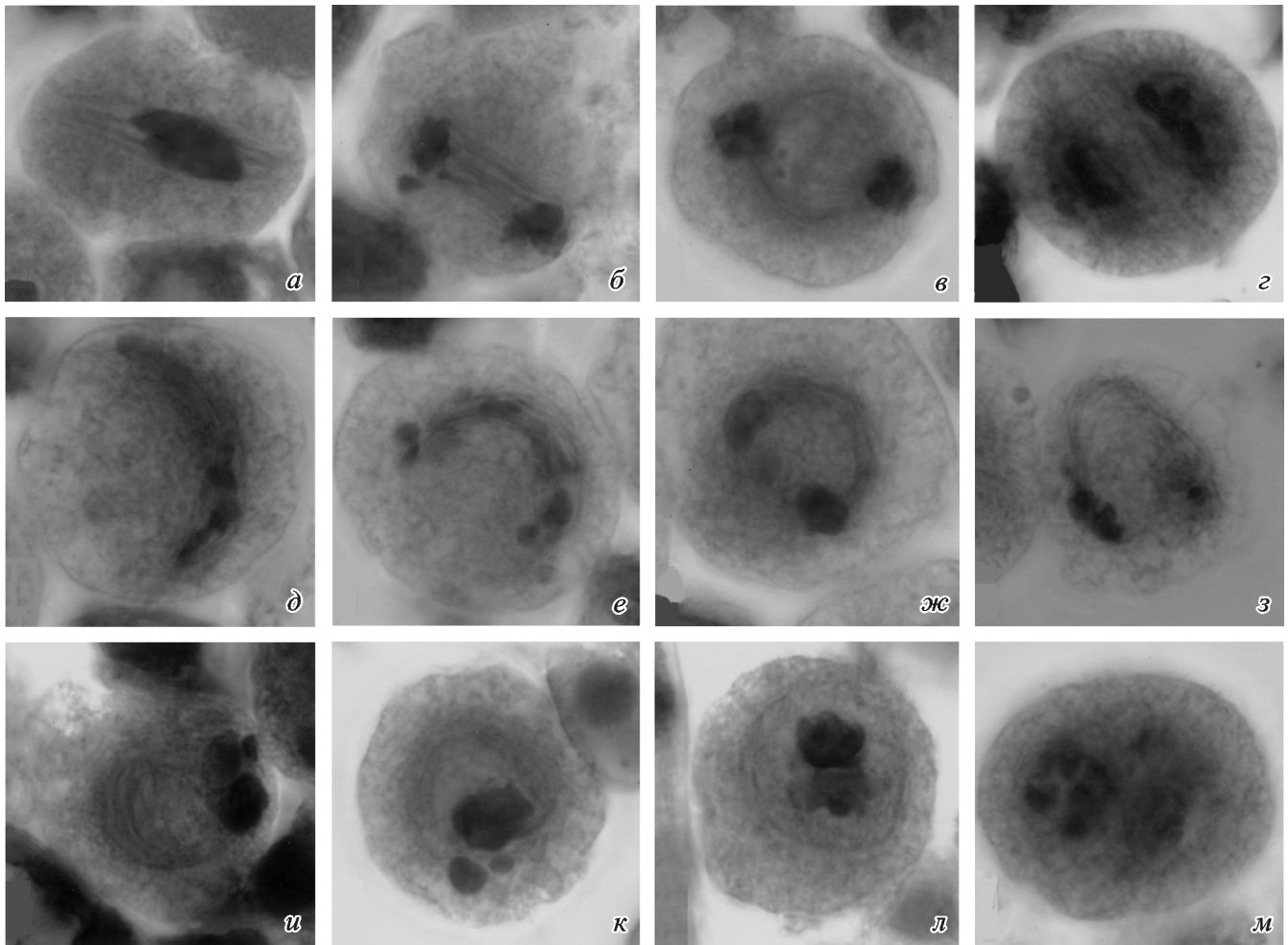


Рис. 1. Фенотип с изгибом телофазного веретена и нарушением цитокинеза (ПРГ F1 № Д-143, раст. 6) в сравнении с тривиальным фенотипом (ПРГ F1 № Д-143, раст. 15).

a–z — тривиальный фенотип на мобильных стадиях первого деления мейоза: *a* — метафаза, *б* — ранняя телофаза, *в* — центробежное движение фрагмопласта / клеточной пластинки в средней телофазе, *г* — поздняя телофаза. *д–м* — фенотип с изгибом телофазного веретена: *д* — ранняя телофаза, *е–з* — изгиб телофазного веретена в результате его аномального «центробежного движения» в средней телофазе, *и–л* — предельное сближение дочерних ядер и изгиб веретена в поздней телофазе, *м* — монода с реституционным ядром.

налов, которые эти процессы регулируют (Mayer, Jurgens, 2004; Wasteneys, Yang, 2004). В ходе широкого изучения разнообразных фенотипов с аномальным цитокинезом мы убедились в том, что факт благополучного завершения цитокинеза контролируется и регулируется клеткой, причем в различных морфологических аспектах.

Во-первых, оценивается такое морфологическое событие, как формирование дочерних клеточных мембран из пузырьков клеточной пластинки. Если этого процесса по какой-либо причине не происходит, процессы цитокинеза (синтез и транспорт мембранных пузырьков, центробежное движение фрагмопласта) не прекращаются, даже если фрагмопласт/клеточная пластинка полностью пересекли цитоплазму. Это является причиной феномена «чрезмерного» цитокинеза, при котором центробежное движение цитокинезной фигуры продолжается после достижения ею мембраны материнской клетки, что приводит либо к деформации клетки (бесстеночной), либо к повороту фрагмопласта в пространстве клеточной цитоплазмы (Дорогова, Шамина, 2001; Шамина и др., 200066). Нужно сказать, что и обсуждаемый здесь фенотип с изгибом телофазного веретена представляет собой результат «чрезмерного» цитокинеза, т. е. длящегося чрезмерно

долго процесса центробежного движения аномального фрагмопласта в виде удлинения и изгиба его фибрилл, связанных в единый конгломерат.

Во-вторых, согласно нашим наблюдениям, клеткой контролируется также завершенность разделения цитоплазмы. Во многих фенотипах с неполным цитокинезом (в виде насечки или перфорации) после формирования этих недостаточно протяженных дочерних клеточных мембран процессы цитокинеза каким-то образом продолжались в интеркинезе на слепых краях насечек. В результате неполные дочерние мембраны достраивались и клетки оказывались полностью разделенными. Этот процесс протекал аналогично так называемому поляризованному цитокинезу, который происходит в некоторых типах вакуолизированных клеток (Cutler, Ehrhardt, 2002).

Механизм формирования дополнительного фрагмопласта исследованных ПРГ F1 за счет синтеза полюсных МТ в поздней телофазе в МКП не является чем-то чужеродным для последовательного цитокинеза в мейозе у однодольных видов. Полюсные МТ принимают участие в построении фрагмопласта в мейозе у однодольных в некоторых немногочисленных случаях. В ходе же центробежного движения фрагмопласта исследованных ПРГ F1

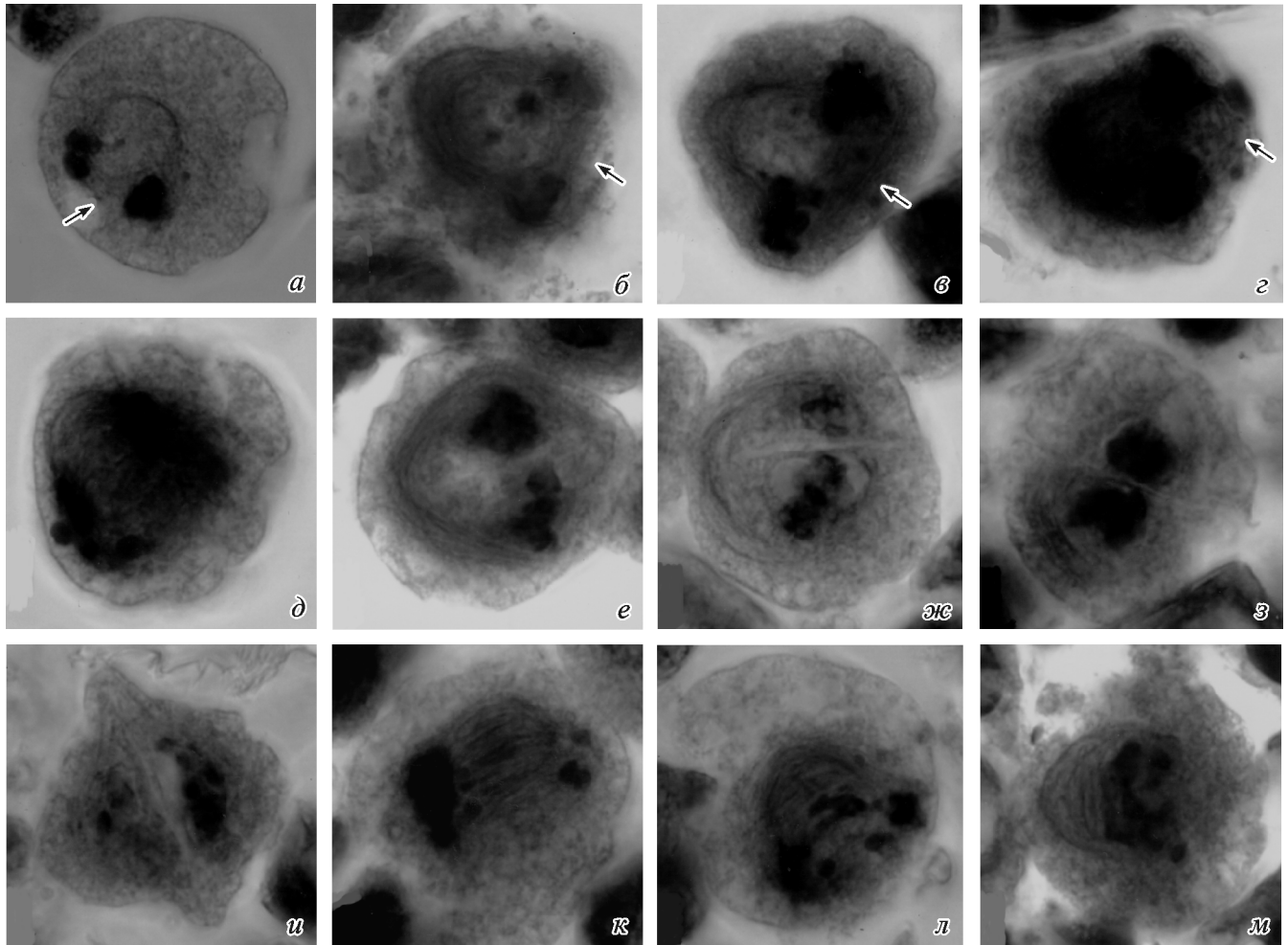


Рис. 2. Формирование дополнительного фрагмента в фенотипе с изгибом телофазного веретена, коррекция нарушения цитокинеза в мейозе у ПРГ F1 № Д-144 и вариант фенотипа с изогнутым телофазным веретеном в мейозе у ПРГ F1 № Д-147.

a—z — формирование дополнительного тяжа микротрубочек (отмечен стрелкой) между полюсами изогнутого веретена в поздней телофазе I; *д—ж* — центробежное движение дополнительного фрагмента и клеточной пластинки; *з, u* — диада с аномально сближенными ядрами; *к—м* — аномальный цитокинез в ПРГ F1 № Д-147 — вариант фенотипа с изгибом телофазного веретена. В ходе телофазы веретено утолщается и изгибается, но не удлиняется.

всегда имеет место синтез полюсных МТ: его фибриллы умножаются за счет дополнительных МТ, полимеризующихся от полюсных районов веретена. При этом новообразованные МТ находятся в тесной ассоциации с уже существующими фибриллами фрагмента (Шамина и др., 2006а). Своеобразие описанного в данной работе фенотипа ПРГ № Д-144 состоит в том, что процесс умножения МТ фрагмента, происходящий в норме в течение всего хода центробежного движения за счет синтеза полюсных МТ, здесь осуществляется автономно и в пространстве, и во времени. В результате этого рядом с прежним, нефункционирующим, фрагментом, представляющим собой конфигурацию изогнутого центрального веретена, формируется новый функциональный фрагмент, состоящий из полюсных МТ. О значимости пространственного отделения полюсных МТ от центрального веретена свидетельствуют фенотипы с утолщенными изогнутыми веретенами, как у ПРГ № Д-147, где синтезируемые полюсные МТ входят в состав веретена и формирование дополнительного фрагмента поэтому невозможно.

Функционален дополнительный фрагмент по той причине, что процессы центробежного движения (изгиб и удлинение фибрилл) не отключаются в результате «чрез-

мерного цитокинеза». Клеточная пластинка формируется также, видимо, потому, что процессы синтеза мембранных пузырьков не отключались. Кроме того, функциональность дополнительного фрагмента обеспечивается тем, что при своем формировании он не проходит заблокированную стадию перехода цитоскелета от конфигурации центрального веретена к конфигурации фрагмента. Поведение цитоскелета при построении дополнительного фрагмента принципиально не отличается от формирования неподвижного фрагмента в телофазе I у двудольных, когда полюсные МТ окружают центральное веретено и заполняют всю цитоплазму. Различие состоит лишь в том, что у двудольных центральное веретено не изгибается (но изогнуты зато по направлению к экватору полюсные МТ, видимо для облегчения контакта с МТ, отходящими от противоположного полюса) и не формируется в телофазе I клеточная пластинка.

Итак, согласно приведенным данным, феномен «чрезмерного цитокинеза», а именно неотключение основных процессов цитокинеза, до тех пор, пока не будут сформированы дочерние клеточные мембраны, обеспечивает в фенотипе ПРГ № Д-144 и ПРГ F1 № 9—260 завершение цитокинеза даже при блоке формирования фрагмента

из фибрилл центрального веретена. Формирование дополнительного фрагмопласта является как результатом запаздывания синтеза полюсных МТ в телофазе, так и результатом их пространственной отделенности от тела телофазного веретена.

Различие между двумя описанными здесь фенотипами — без разделения цитоплазмы (ППГ № 9—261 и ПРГ № Д-143) и с компенсирующим цитокinesisом (ПРГ № Д-144 и ПППГ № 9—260) — состоит в том, что первый фенотип вдобавок к нарушению перехода «центрального веретено—цилиндрический фрагмопласт» имеет дополнительную аномалию — блок формирования полюсных МТ в телофазе.

Список литературы

- Дорогова Н. В., Шамина Н. В. 2001. Феномен чрезмерного цитокinesisа в фенотипе мейотической мутации *ram* у кукурузы. Цитология. 43 (5) : 471—476.
- Шамина Н. В., Дорогова Н. В. 2006. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. VII. Процессы одновременного (симультанного) цитокinesisа. Цитология. 48 (2) : 127—132.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Гордеева Е. И., Серюкова Е. И. 2006а. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. VI. Механизмы последовательного цитокinesisа. Цитология. 48 (2) : 120—126.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Соловьева Н. В. 2005а. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. IV. Средняя прометафаза. Цитология. 47 (9) : 760—765.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Соловьева Н. В., Гордеева Е. И. 2005б. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. V. Поздняя прометафаза. Общая схема формирования веретена деления. Цитология. 47 (10) : 889—897.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Шацкая О. А. 2007б. Изменения в ориентации фрагмопласта в результате его чрезмерного центробежного движения при отсутствии клеточной пластинки. Цитология. 48 (12) : 1023—1029.
- Cutler S. R., Ehrhardt D. W. 2002. Polarized cytokinesis in vacuolate cells of *Arabidopsis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 2812—2817.
- DeMey J., Lambert A. M., Bajer A. S., Moeremans M., DeBrabander M. 1982. Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemathus* endosperm with the immunogold staining method. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79 : 1898—1902.
- Granger C. L., Cyr R. J. 2000. Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. Planta. 210 : 502—509.
- Gunning B. E. S. 1982. The cytokinetic apparatus: its development and spatial regulation. In: The cytoskeleton in plant growth and development. London: Acad. Press. 229—292.
- Jurgens G. 2005. Cytokinesis in higher plants. Ann. Rev. Plant Biol. 56 : 281—299.
- Mayer U., Jurgens G. 2004. Cytokinesis: lines of division taking shape. Curr. Opin. Plant Biol. 7 : 599—604.
- Nishihama R., Machida Y. 2001. Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. Curr. Opin. Plant Biol. 4 : 507—512.
- Otegui M. S., Mastrorade D. N., Kang B. H., Bednarek S. J., Staehelin L. A. 2001. Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. Plant Cell. 13 : 2033—2051.
- Otegui M., Staehelin L. A. 2000. Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell. Curr. Opin. Plant Biol. 3 : 493—502.
- Shamina N. V., Gordeeva E. I., Kovaleva N. M., Seriuokova E. G., Dorogova N. V. 2007. Formation and function of phragmoplast during successive stages in higher plant meiosis. Cell Biol. Internat. 31 : 626—635.
- Smith L. G. 1999. Divide and conquer: cytokinesis in plant cells. Curr. Opin. Plant Biol. 2 : 447—453.
- 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.
- 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., Yang Zh. 2004. New views on the plant cytoskeleton. Plant Physiol. 136 : 3884—3891.

Поступила 11 XII 2007

ADDITIONAL PHRAGMOPLAST CORRECTS ABNORMAL CYTOKINESIS IN WHEAT × RYE HYBRID POLLEN MOTHER CELLS

E. I. Gordeeva, N. V. Shamina,¹ L. F. Dudka,² V. Ya. Kovtunenکو,² E. U. Bolobolova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of RAS, Novosibirsk,
and ² P. P. Lukianenko Agricultural Institute, Krasnodar;
¹ e-mail: shamina@bionet.nsc.ru

The phragmoplast dysfunction in wheat × rye hybrid F₁ male meiosis has been described. The pollen mother cells (PMCs) show the phenotype where transition from central spindle fibers (forming a solid bundle) to a phragmoplast (hollow cylinder) is blocked. The blockade suppresses centrifugal movement of the phragmoplast and cell plate formation. The resulting cells occur to be binucleate. Sometimes, the two nuclei join and form one restitution nucleus. PMCs of wheat × rye F₁ hybrid N D-144gp 06r. F₁ (*T. aestivum* c. 93—60 r × *S. cereale* c. Saratovskaya 7) showing this phenotype have an additional phragmoplast at late telophase. This happens like that in the case of immobile phragmoplast formation in meiosis in bicotyledons: the new phragmoplast arises by the aid of microtubules polymerization starting from the spindle poles. The new additional phragmoplast builds a new cell plate and accomplishes cytokinesis.

Key words: cell division, pollen mother cells, meiosis, cereal wide hybrids, cytokinesis, cytoskeleton, phragmoplast.