

СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОДВИЖНОГО ФРАГМОПЛАСТА В МЕЙОЗЕ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫМ ЦИТОКИНЕЗОМ

© Н. В. Шамина,¹ Ж. М. Мухина,² Н. М. Ковалева,³ В. А. Филюрина⁴

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,

² Всероссийский НИИ риса, Краснодар,

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,

и ⁴ Новосибирский государственный университет;

¹ электронный адрес: shamina@mcb.nsc.ru

В статье приводятся не описанные ранее аномалии формирования фрагмопласта в материнских клетках пыльцы гаплоидов и аллогамноидов (отдаленных гибридов первого поколения) злаков. Эти аномальные фенотипы выявляют и иллюстрируют отдельные неизвестные этапы формирования фрагмопласта в делящейся растительной клетке, указывают на специальную регуляцию их запуска, а также подтверждают информацию об этом процессе, полученную путем других подходов.

Ключевые слова: мейоз, микротрубочки, фрагмопласт, цитокинез, цитоскелет.

Цитокинез — фундаментальный процесс клеточного деления, механизмы которого в растительной клетке во многом остаются неясными (Jurgens, 2005; VanDamme et al., 2008). Главной субклеточной структурой, осуществляющей разделение цитоплазмы делящейся растительной клетки, является фрагмопласт. Он представляет собой систему биполярных фибрилл, состоящих из противоположно ориентированных микротрубочковых пучков, соединенных (+)-концами в области экватора клетки и обращенных (–)-концами к ее полюсам. Вдоль фибрилл фрагмопласта в область перекрывания (+)-концов микротрубочек (МТ) происходит транспорт мембранных пузырьков клеточной пластинки — зачатка дочерних клеточных мембран (Guertin et al., 2002). В различных типах клеток фрагмопласты различаются морфологически. Различают фрагмопласты неподвижные и совершающие центробежное движение. Неподвижные фрагмопласты формируются в одновременном цитокинезе в мейозе у двудольных, а также при целлюларизации эндосперма (Vantard et al., 1990; Zang et al., 1990). Подвижные фрагмопласты формируются в митозе, а также в последовательном цитокинезе в мейозе у однодольных. Они могут состоять из длинных либо коротких фибрилл, различаясь по механизму осуществления центробежного движения (Otegui, Staehelin, 2000; Nishihama, Machida, 2001; Дорогова, Шамина, 2005; Jurgens et al., 2005; Segui-Simarro et al., 2007).

Благодаря анализу аномалий мейотического деления различного происхождения нам удалось детализировать процесс формирования и функционирования подвижного фрагмопласта в материнских клетках пыльцы (МКП) в мейозе с последовательным цитокинезом у однодольных видов, а также разделить телофазу на подстадии (Shamina et al., 2007).

Биполярные фибриллы фрагмопласта (фибриллы центрального веретена) формируются в средней прометафазе

(Шамина и др., 2005а), а собственно фрагмопласт (центральное веретено, или биполярная система биполярных фибрилл) строится в поздней прометафазе путем ориентации фибрилл веретена вдоль оси деления (Шамина и др., 2005б, 2006а). После расхождения хромосом к противоположным полюсам в анафазе цитоскелетный состав веретена меняется. Кинетохорные фибриллы деполимеризуются и укорачиваются в ходе анафазы, и в ранней телофазе веретено состоит практически из одних центральных фибрилл. В поздней анафазе—ранней телофазе центральное веретено имеет строение сплошного тяжа, располагающегося между телофазными группами хромосом. Мы определили эту структуру как ранний фрагмопласт.

В ранней телофазе на экваторе веретена начинается формироваться клеточная пластинка в виде монослоя мембранных пузырьков (пластосом). Эти пузырьки, производные аппарата Гольджи, транспортируются сюда центральными фибриллами веретена. После того как клеточная пластинка пересечет все центральное веретено, его фибриллы перераспределяются таким образом, что окружают растущий край клеточной пластинки в виде полого цилиндра — среднего фрагмопласта. Фибриллы при этом окружают растущую клеточную пластинку в виде палисада. По-видимому, на этой стадии фибриллы центрального веретена теряют те латеральные связи друг с другом, которые они имели в метафазном—анафазном веретене. Фрагмопласт в МКП — это не совокупность коротких микротрубочек (МТ) вокруг клеточной пластинки, но система длинных фибрилл, соединяющих полюсные районы с экватором и окружающий растущий край клеточной пластинки. В средней телофазе фибриллы фрагмопласта удлиняются, изгибаются и их центральные точки совершают за счет этого центробежное движение (Shamina et al., 2007). Эту расширяющуюся бочонкообразную структуру с прогрессивно изгибающимися фибриллами

мы назвали поздним фрагмопластом. По мере движения фрагмопласта к периферии его фибриллы становятся все более круто изогнутыми. Клеточная пластинка расширяется за счет присоединения новых мембранных пузырьков к ее растущему краю, а фибриллы фрагмопласта продолжают окружать ее, обеспечивая транспорт пузырьков в эту область. В ходе центробежного движения количество фибрилл фрагмопласта увеличивается, предположительно за счет полюсных синтезов новых МТ (Shamina et al., 2007). При достижении клеточной пластинкой мембраны материнской клетки пластосомы в ее составе сливаются с образованием дочерних клеточных мембран. После этого происходит формирование оболочек дочерних ядер.

Сформированные мембраны разделяют на экваторе фибриллы фрагмопласта в области перекрывания (+)-концов МТ. Разделенные пучки МТ фрагмопласта становятся после этого частью радиального интерфазного цитоскелета дочерних клеток. В поздней телофазе, когда фрагмопласт (клеточная пластинка) практически полностью пересекает цитоплазму материнской клетки, от телофазных групп хромосом в сторону, противоположную экватору, начинают полимеризоваться микротрубочковые пучки. В процессе цитокинеза они не принимают участия, а являются частью радиального цитоскелета, характерного для стадии интеркинеза. Цикл цитоскелета на этом завершается.

Известен ряд эмбриональных мутаций, нарушающих цитокинез у арабидопсиса (Sollner et al., 2002), в том числе нарушающих слияние мембранных пузырьков в составе клеточной пластинки и формирование дочерних клеточных мембран. Мутанты с нарушениями цитокинеза в мужском мейозе описаны у арабидопсиса (Chen, McCormick, 1996; Hulskamp et al., 1997; Spielman et al., 1997; Hauser et al., 2000; Magnard et al., 2001). Аномалии фрагмопласта описаны в ряде фенотипов: у эмбриональных мутантов *pilz* и *HINKEL* (*Arabidopsis thaliana*) (Mayer et al., 1999; Strompen et al., 2002), в мейозе у меймутанта *abnormal phragmoplast (aph)* (*Zea mays*) (Staiger, Cande, 1993) и у отдаленных гибридов злаков (Shamina et al., 2007), а также при химических и механических воздействиях на митотические клетки (Mole-Bajer, 1969; Smirnova, Bajer, 1998).

В мейозе у высших цветковых растений цитокинез может осуществляться последовательно после каждого деления (как у большинства видов однодольных растений) или только в телофазе второго мейотического деления, одновременно автономизируя четыре дочерних ядра посредством активности шести фрагмопластов (как у большинства видов двудольных растений). Фрагмопласты, формирующиеся в последовательном и в одновременном цитокинезе, принципиально не различаются по строению: это система пучков МТ, отходящих от области расположения телофазных групп хромосом и перекрывающихся (+)-концами на экваторе. Однако фрагмопласты в последовательном и одновременном цитокинезе различаются по взаимному расположению составляющих их фибрилл и по способу построения клеточной пластинки (Шамина, Дорогова, 2006). Фрагмопласт в последовательном цитокинезе у однодольных представляет собой систему длинных фибрилл, окружающих в виде палисада растущий край клеточной пластинки, и перемещающийся центробежно. В одновременном цитокинезе у двудольных фрагмопласт(ы) представляет собой множество длинных

фибрилл, пронизывающих всю цитоплазму в интерзоне между дочерними ядрами (Brown, Lemmon, 1988). Фибриллы, так же как и в подвижном фрагмопласте, состоят из противоположно направленных пучков МТ, отходящих от дочерних ядер и соединяющихся (+)-концами в районе экватора. Этот фрагмопласт не имеет конфигурации полого цилиндра и не совершает центробежного движения. Это сплошная структура, подобная метафазному веретену, только более объемная и заполняющая практически всю цитоплазму между дочерними ядрами (Brown, Lemmon, 1991).

Функция фрагмопласта в мейозе у однодольных и двудольных не различается принципиально: транспортировать мембранные пузырьки в область перекрывания фибрилл для формирования клеточной пластинки. Однако формирование клеточной пластинки осуществляется различными способами. У однодольных фрагмопласт движется центробежно вместе с растущей клеточной пластинкой, а у двудольных он неподвижен. Точки, в которые должны поступить пластосомы в процессе формирования монослоя (клеточной пластинки), определяются точками перекрывания (+)-концов МТ фрагмопласта. Точки перекрывания (+)-концов МТ фибрилл подвижного фрагмопласта в совокупности вычерчивают плоскость клеточной пластинки в ходе своего центробежного движения. В случае неподвижного фрагмопласта все множество точек, в которые должны поступить пластосомы, заранее задано множеством точек перекрывания (+)-концов противоположно направленных микротрубочек, густо пронизывающих всю цитоплазму и лежащих в плоскости экватора.

Целью настоящей работы было выявление неизвестных ранее этапов формирования подвижного фрагмопласта в мейозе с последовательным цитокинезом. Впервые описаны этапы регуляции запуска процессов формирования раннего и среднего фрагмопласта, а также этап запуска основных процессов телофазы. Полученная информация представляет процесс цитокинеза растительной клетки как сложный многоэтапный процесс со специальной регуляцией каждого этапа.

Материал и методика

Для цитологического анализа мужского мейоза использованы отдаленные гибриды злаков первого поколения: пшенично-пырейные (ППГ F1) № 4-12 (*Triticum aestivum* сорта Новосибирская 67 × *Agropyron glaucum*); № 9-622 (*Triticum aestivum* СП743 × *Agropyron glaucum*); № 734 (*Triticum durum* сорта Алтайка × *Elytrigia elongatum*); № 5-739 (*Triticum durum* сорта Алтайка × *Elytrigia elongatum*) и пшенично-ржаной (ПРГ F1) № 8206 (*Triticum aestivum* var *ferrugineum* × *Secale cereale* сорта Онохойская). Для анализа мейоза использованы также гаплоиды риса № 207, 211 и C54.

Бутоны на стадии мейоза фиксировали модифицированным фиксатором Навашина (Wada, Kusunoki, 1964) при комнатной температуре в течение 1 сут; затем материал хранили в фиксаторе в холодильнике. Давленные временные ацетокарминовые препараты пыльников приготавливали по рутинной методике. Наблюдения проводили на микроскопе Olympus при увеличении 10 × 100. Обработку изображений с помощью программы Photoshop не проводили.

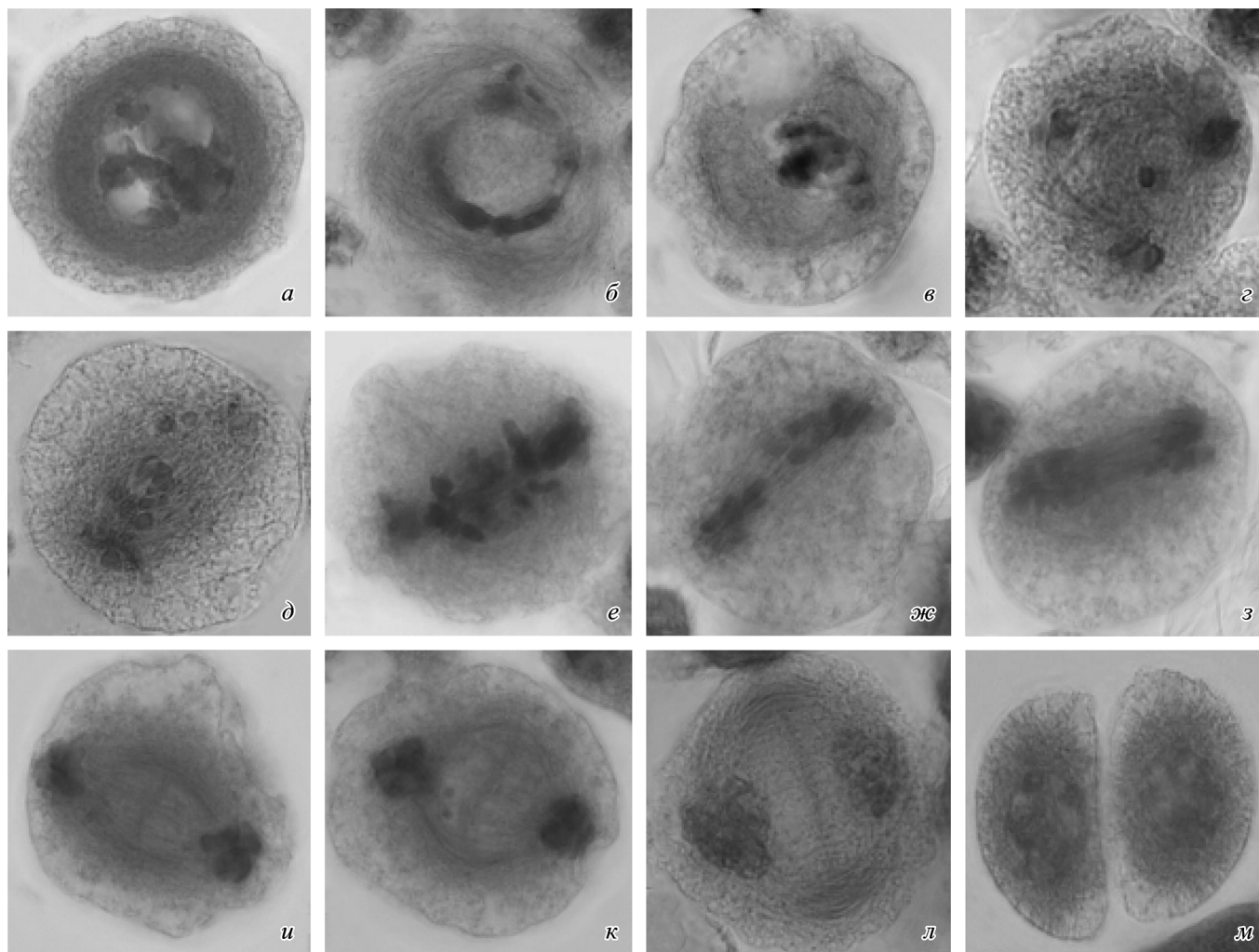


Рис. 1. Мейоз в МКП ППГ F1 № 4-12 (*Triticum aestivum* сорта Новосибирская 67 × *Agropyron glaucum*) обычного фенотипа.

а — диакнез с перинуклеарным кольцом цитоскелета; *б* — ранняя прометафаза I: распад ядерной оболочки и перинуклеарного кольца; *в* — вход МТ в зону бывшего ядра в начале средней прометафазы; *г* — хаотическая стадия средней прометафазы; *д* — поздняя прометафаза, фибриллы веретена ориентируются биполярно; *е* — условная метафаза I с разбросанными унивалентами; *ж* — анафаза I с некоординированным расхождением унивалентов; *з* — поздняя анафаза I—ранняя телофаза I: униваленты разошлись к полюсам веретена, между дочерними группами хромосом — ранний фрагмопласт (фибриллы центрального веретена); *и* — ранняя телофаза I: формирование среднего фрагмопласта и клеточной пластинки; *к* — средняя телофаза I: начало центростремительного движения фрагмопласта (клеточной пластинки), фибриллы фрагмопласта изгибаются; *л* — поздняя телофаза I; *м* — диада.

Результаты

Формирование фрагмопласта в МКП дико-го типа и в обычном фенотипе аллогамноидов злаков. Для того чтобы лучше ориентироваться в стадиях цитоскелетного цикла в растительном мейозе, мы предварительно описали аномальных фенотипов иллюстрацией обычного мейотического деления с последовательным цитокинезом материнских клеток пыльцы (МКП) аллогамноидов злаков (Shamina, 2005a, 2005b; Shamina et al., 2007). Обычно мы называем фенотип, в котором не наблюдается иных аномалий по сравнению с мейозом дико-го типа, кроме отсутствия синхронизации гомологичных хромосом и его плейотропных последствий (анеуплоидия дочерних ядер и т. п.).

Согласно нашим наблюдениям, формирование фибрилл подвижного мейотического фрагмопласта происходит на такой удаленной от цитокинеза стадии мейоза, как средняя прометафаза (Шамина и др., 2005а). Эту

стадию можно условно обозначить как начальную в довольно сложном и многоступенчатом процессе развития фрагмопласта, включающем в себя метафазу и анафазу и заканчивающемся в поздней телофазе. Ход внутриклеточных реорганизаций цитоскелета, обеспечивающий развитие и функцию фрагмопласта, выглядит следующим образом. В диплотене—диакнезе вокруг ядра в меридиональной плоскости формируется цитоскелетное кольцо (рис. 1, *а*).

Далее, одновременно с распадом ядерной оболочки и началом прометафазы, перинуклеарное кольцо также распадается на составляющие элементы — пучки МТ (рис. 1, *б*, *в*), которые входят в зону бывшего ядра (Шамина, 2003). В результате формируется хаотичная сеть элементов цитоскелета (пучков МТ) (рис. 1, *г*), которые соединяются с кинетохорами хромосом, формируя кинетохорные фибриллы веретена. Свободные пучки МТ на этой стадии соединяются (+)-концами друг с другом, формируя биполярные центральные фибриллы веретена.

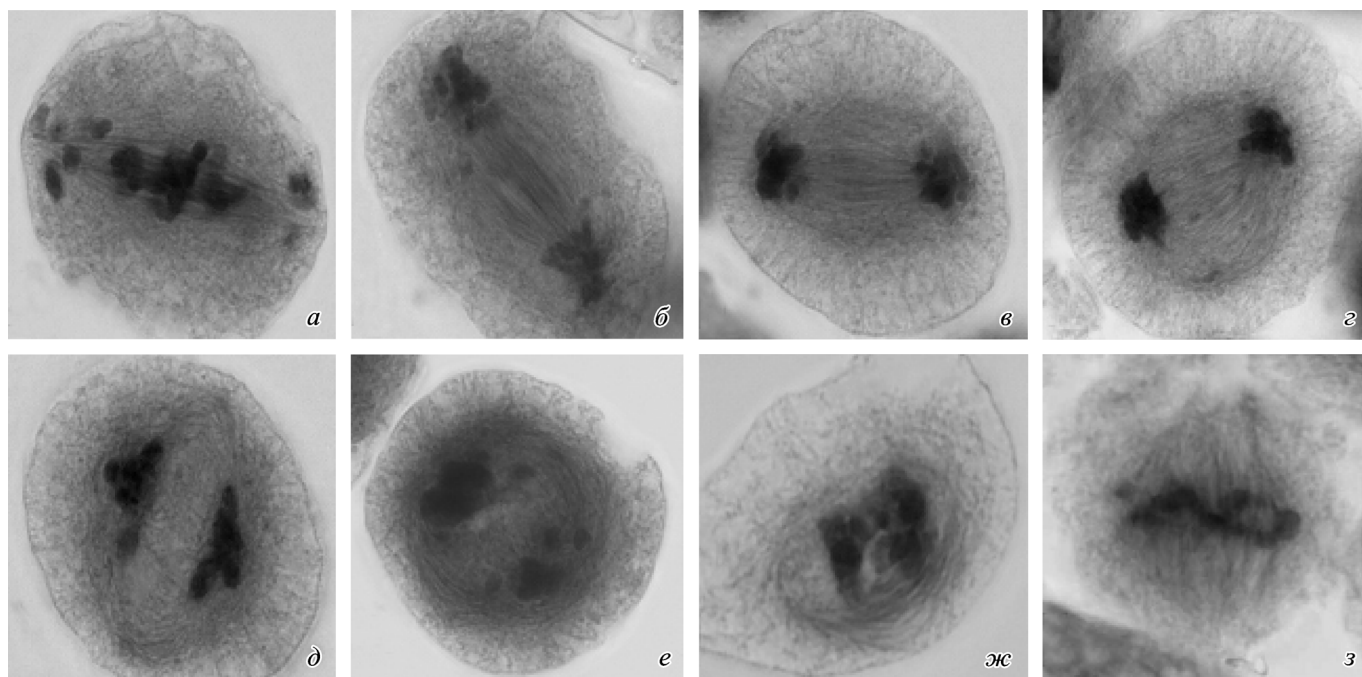


Рис. 2. Ход мейоза при блоке основных процессов телофазы I в МКП ППГ F1 № 9-622.

a — анафаза I; *б* — ранняя телофаза I; *в, г* — интеркинез с сохраненной телофазной фигурой цитоскелета, окруженной радиальными пучками фибрилл цитоскелета; *д-ж* — профаза II с общим перинуклеарным кольцом; *з* — общее веретено в метафазе II.

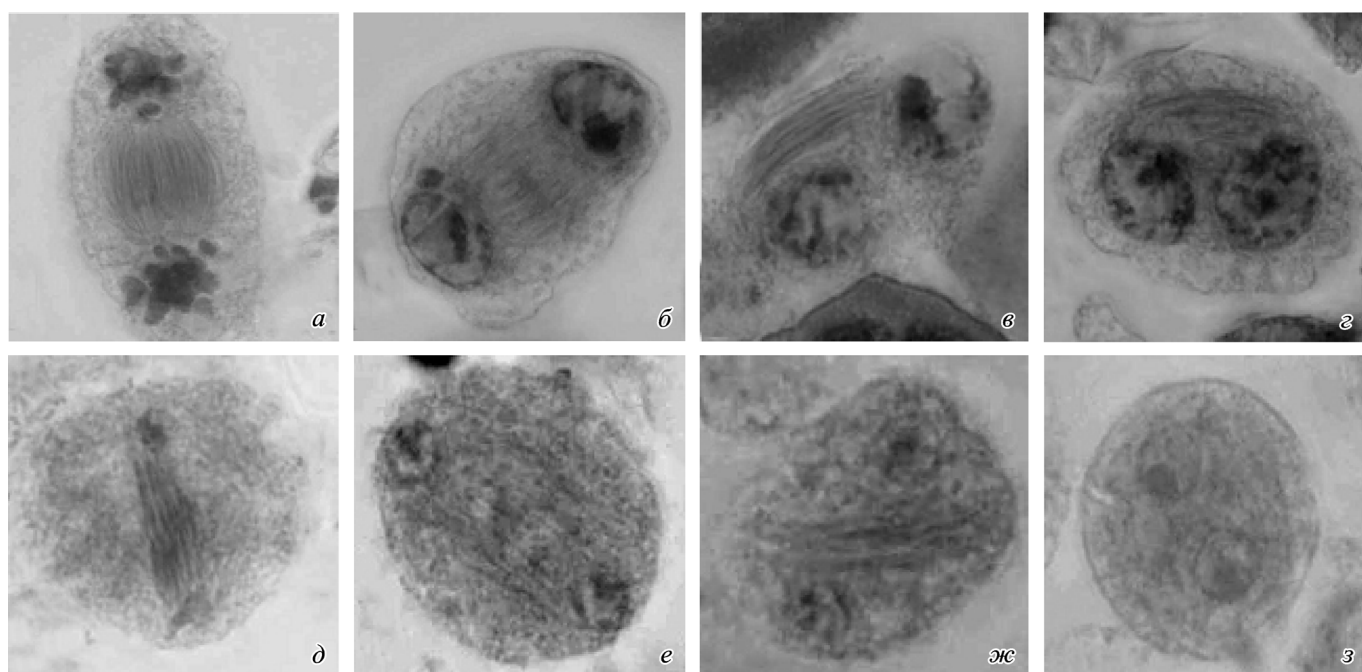


Рис. 3. Блок всех процессов цитокинеза в телофазе I в мейозе у злаков.

a-г — ход аномальной телофазы и интеркинез в МКП ППГ F1 № 734: *a* — телофаза I, блок на стадии раннего фрагмoplastа; *б-г* — МКП на стадии интеркинеза с интерфазными ядрами и сохраняющимся в цитоплазме ранним фрагмoplastом; *д-з* — аномальное окончание первого мейотического деления в МКП гаплоида риса № 207: *д* — ранняя телофаза I; *е, ж* — ранний фрагмoplast на стадии интеркинеза; *з* — двуядерная монода в профазе II.

Этот процесс — важнейший этап формирования фрагмoplastа, так как приводит к образованию его биполярных фибрилл, в которых (+)-концы МТ находятся в центре фибриллы, а (-)-концы — на ее концах (Шамина и др., 2005а). В поздней прометафазе (рис. 1, *д*) сформированные

кинетохорные фибриллы с прикрепленными унивалентами, а также центральные фибриллы веретена (являющиеся и фибриллами будущего фрагмoplastа) ориентируются биполярно, конвергируют на полюсах и формируют веретено деления (рис. 1, *е*). Униваленты, как правило, ориен-

тированы редуционно, т. е. каждый несет один кинетохор и соединен лишь с одним из полюсов. Поэтому метафазная пластинка отсутствует, хотя в ранней метафазе униваленты, распределяясь между полюсами случайным образом, консолидируются на экваторе веретена.

В анафазе униваленты оказываются разбросанными вдоль веретена и постепенно достигают полюсов (рис. 1, ж, з). Кинетохорные фибриллы при этом укорачиваются и исчезают. Веретено в ранней телофазе состоит из сплошного пучка центральных фибрилл (ранний фрагмопласт), которые являются основой формирующегося фрагмопласта, и анеуплоидных телофазных групп хромосом. На экваторе телофазного веретена формируется клеточная пластинка (рис. 1, и), фибриллы центрального веретена окружают ее, принимая конфигурацию полого цилиндра (средний фрагмопласт). Затем фибриллы его прогрессивно изгибаются и удлиняются, в результате чего их центральные точки (места перекрывания (+)-концов МТ) перемещаются центростремительно к периферии клетки. Расширяющийся центростремительно полый цилиндр, а точнее, сферическую фигуру, ограниченную изогнутыми фибриллами, мы обозначаем как поздний фрагмопласт (рис. 1, к, л). Достигнув мембраны материнской клетки, мембранные пузырьки клеточной пластинки сливаются с образованием дочерних клеточных мембран и цитокинез прекращается (Shamina et al., 2009). Продуктом деления является диада с анеуплоидными членами (рис. 1, м). Второе деление мейоза в обычном фенотипе происходит само по себе нормально, продуктом мейоза является тетрада анеуплоидных микроспор.

Блок основных процессов телофазы. В мейозе у ППГ F1 № 9-622 (*Triticum aestivum* СП743 × *Agropyron glaucum*) с частотой около 20 % наблюдаются резкие аномалии на стадии телофазы первого деления. После прохождения анафазы (рис. 2, а) телофазная фигура — ранний фрагмопласт с телофазными группами хромосом на полюсах (рис. 2, б) — не перестраивается в полый цилиндр; клеточная пластинка также не строится (рис. 2, в). Центростремительного движения фрагмопласта не происходит, но количество его фибрилл, его объем несколько возрастают (рис. 2, з). Восстановления ядерной оболочки вокруг дочерних ядер не происходит. На стадии условного интеркинеза в клетке формируется радиальный цитоскелет, существующий наряду с телофазным веретеном (ранним фрагмопластом) и располагающийся вокруг него. В профазе II из элементов радиального цитоскелета и фрагмопласта формируется цитоскелетное кольцо, окружающее оба дочерних ядра (рис. 2, д—ж). В прометафазе II из этого общего кольца строится общее веретено деления (рис. 2, з), и на стадии тетрад формируется диада. Клетки — члены диады — имеют нередуцированное число хромосом.

Полный блок процессов цитокинеза на стадии раннего фрагмопласта. Эта аномалия наблюдается в мейозе МКП ППГ F1 № 734 (*Triticum durum* сорта Алтайка × *Elytrigia elongatum*) в 35—40 % клеток, а также у гаплоида риса № С54 с частотой до 20 %. Этот фенотип отличается от предыдущего тем, что в нем блокированы не все процессы телофазы, а только процессы цитокинеза. До телофазы I мейотическое деление происходит тривиальным образом: формируется биполярное веретено, редуционно ориентированные униваленты нерегулярно расходятся к полюсам и формируют анеуплоидные телофазные группы, разделенные системой фибрилл центрального веретена (ранний фрагмопласт (рис. 3, а, д). В телофазе I—интеркинезе цитоскелет со-

храняет конфигурацию, в которой он находился в поздней анафазе I: центральное веретено с телофазными группами хромосом на полюсах.

Позднее телофазные хромосомные группы преформируются в интерфазные ядра, окружаясь ядерной оболочкой (рис. 3, б, е). Получается парадоксальная картина, никогда не наблюдающаяся в норме или в обычном фенотипе (алло) гаплоида: сосуществование на одной стадии интерфазных ядер и раннего фрагмопласта. Средний фрагмопласт как полый цилиндр, образованный противоположно направленными пучками МТ, не формируется, клеточная пластинка не строится, фибриллы раннего фрагмопласта не изгибаются и не удлиняются, умножения фибрилл центрального веретена не происходит (рис. 3, б, в, е, ж). Цитокинез полностью блокирован, дочерние ядра зачастую смещаются с полюсов раннего фрагмопласта (рис. 3, в, ж). Результатом первого мейотического деления клеток с таким фенотипом являются двуядерные монады (рис. 3 г, з).

Формирование неподвижного фрагмопласта в телофазе I мейоза с последовательным цитокинезом. Оригинальный фенотип демонстрируют с частотой до 30 % МКП ПРГ F1 № 8206 (*Triticum aestivum* var *ferrugineum* × *Secale cereale* сорта Онохойская). Телофаза первого деления мейоза проходит у него практически неотличимо от этой стадии в МКП видов двудольных растений с одновременным цитокинезом (см. для сравнения рис. 4, а—з). Формирование веретена деления и расхождение хромосом в анафазе происходят обычным образом (рис. 4, и). При переходе из поздней анафазы в раннюю телофазу цитоскелет имеет нормальную конфигурацию сплошного центрального веретена (или раннего фрагмопласта) с телофазными группами хромосом на полюсах (рис. 4, к). Затем ранний фрагмопласт, минуя стадию полого цилиндра (среднего фрагмопласта), расширяется за счет умножения фибрилл цитоскелета (рис. 4, л, м). Морфологически это выглядит так же, как развитие неподвижного фрагмопласта в телофазе I в мужском мейозе с одновременным цитокинезом у исследованных нами видов двудольных растений (рис. 4, в, з).

Вокруг дочерних групп хромосом восстанавливается ядерная оболочка; клеточная пластинка не строится (рис. 4, н, о). В конце интеркинеза, к началу профазы II, неподвижный фрагмопласт исчезает так же, как на соответствующей стадии в МКП двудольных. В метафазе второго деления формируются два веретена в общей цитоплазме; ориентированы они случайным образом (рис. 4, п, р). Иногда хромосомы дочерних ядер объединяются в одно общее веретено. Продуктом деления являются рассеченные монады с числом ядер от двух до четырех (три ядра могут сформироваться в телофазе II, если два полюса дезориентированных веретен попадают в одну точку сближения). Продуктом мейоза МКП с вышеописанным фенотипом могут быть также диады.

Блок цикла цитоскелета на стадии среднего фрагмопласта. Эта аномалия наблюдается в мужском мейозе у ППГ F1 № 5-739 (*Triticum durum* сорт Алтайка × *Elytrigia elongatum*) и в гаплоиде риса № 211. Мейоз происходит обычным образом до середины телофазы I (рис. 5, а, д). Полностью сформированный средний фрагмопласт на стадии полого цилиндра в дальнейшем не осуществляет своих функций, т. е. не расширяется центростремительно и не формирует клеточную пластинку; количество его фибрилл не увеличивается (рис. 5, б, е). Расположенные на полюсах телофазные группы хромосом окру-

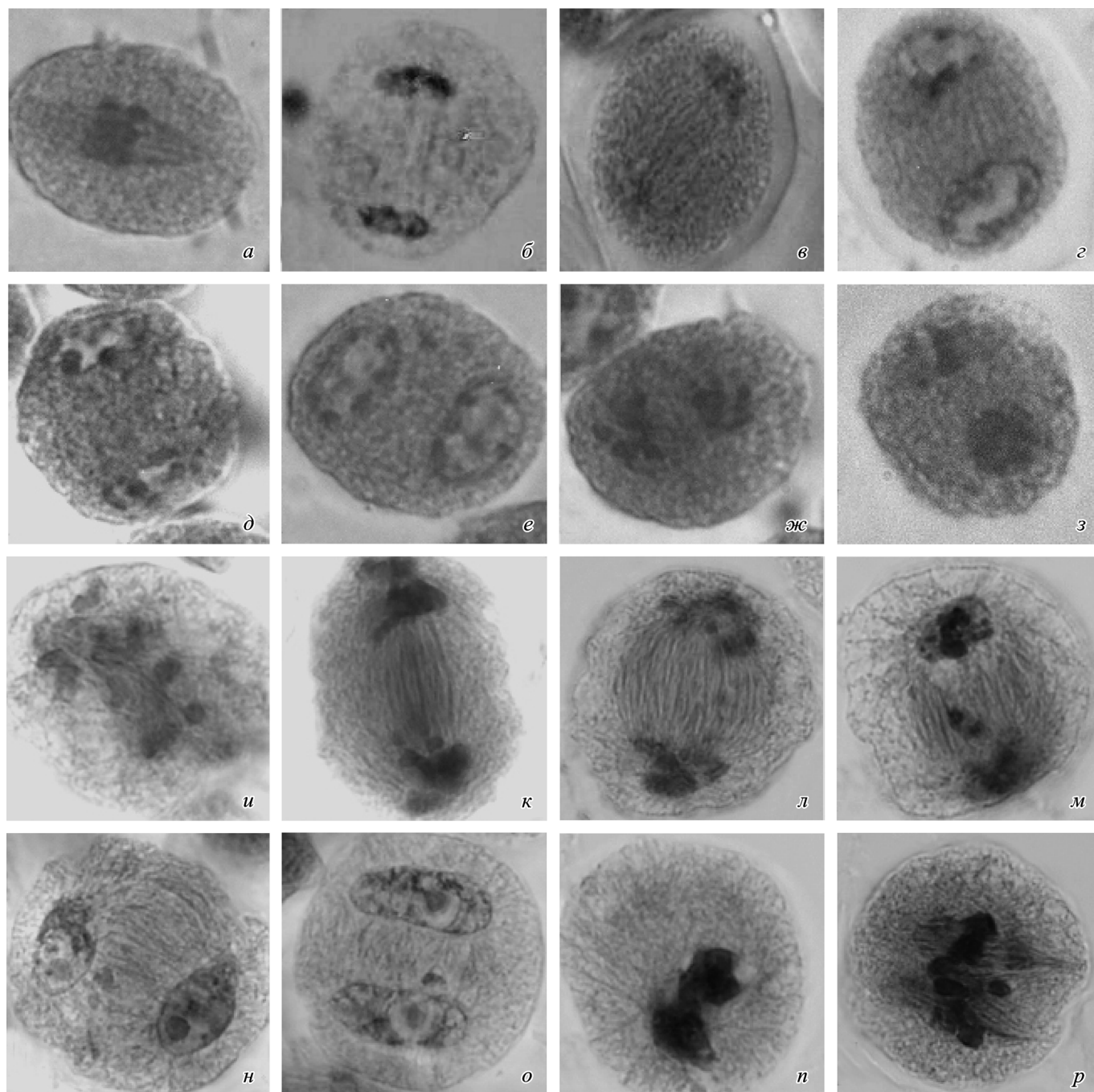


Рис. 4. Формирование неподвижного фрагмопласта и имитация телофазы I одновременного цитокинеза в МКП пшенично-ржаного гибрида F1.

a–з — развитие и ход телофазы I и ее последствия в нормальном мужском мейозе с одновременным цитокинезом у томата *Lycopersicon esculentum* L. сорта Черри: *a* — метафаза I; *б* — поздняя анафаза II, фибриллы центрального веретена занимают пространство между разошедшимися к полюсам группам хромосом; *в* — ранняя телофаза I, начало умножения фибрилл центрального веретена; *г, д* — неподвижный фрагмопласт в интеркинезе; *е* — профаза II, дочерние ядра в общей цитоплазме; *ж* — прометафаза II; *з* — метафаза II, веретена ориентированы взаимно перпендикулярно; *и–р* — ход мейоза в МКП ПРГ F1 № 8206: *и* — метафаза I—анафаза I; *к, л* — расширение центрального веретена в телофазе I за счет умножения его фибрилл; *м* — поздняя телофаза I, начало формирования оболочки дочерних ядер; *н, о* — интеркинез с развитой системой интерзональных фибрилл (неподвижным фрагмопластом); *п* — прометафаза II; *р* — метафаза II, веретена в общей цитоплазме.

жаются ядерной оболочкой и формируют интерфазные ядра. Существование таких ядер и среднего фрагмопласта на одной и той же стадии мейоза представляет собой резкую аномалию. Иногда дочерние ядра смещаются и проникают внутрь цитоскелетного «цилиндра» (рис. 5, *в, ж*). Цитоскелет сохраняет эту конфигурацию в интеркинезе и в профазе II, а затем переформируется в

перинуклеарное кольцо цитоскелета, опоясывающее сближившиеся дочерние ядра (рис. 5, *з, з*). В результате в прометафазе II хромосомы дочерних ядер объединяются в общем веретене. Продуктом деления МКП с таким фенотипом являются диады с потенциально жизнеспособными 2n-клетками. Частота этой аномалии достигает 35 % МКП.

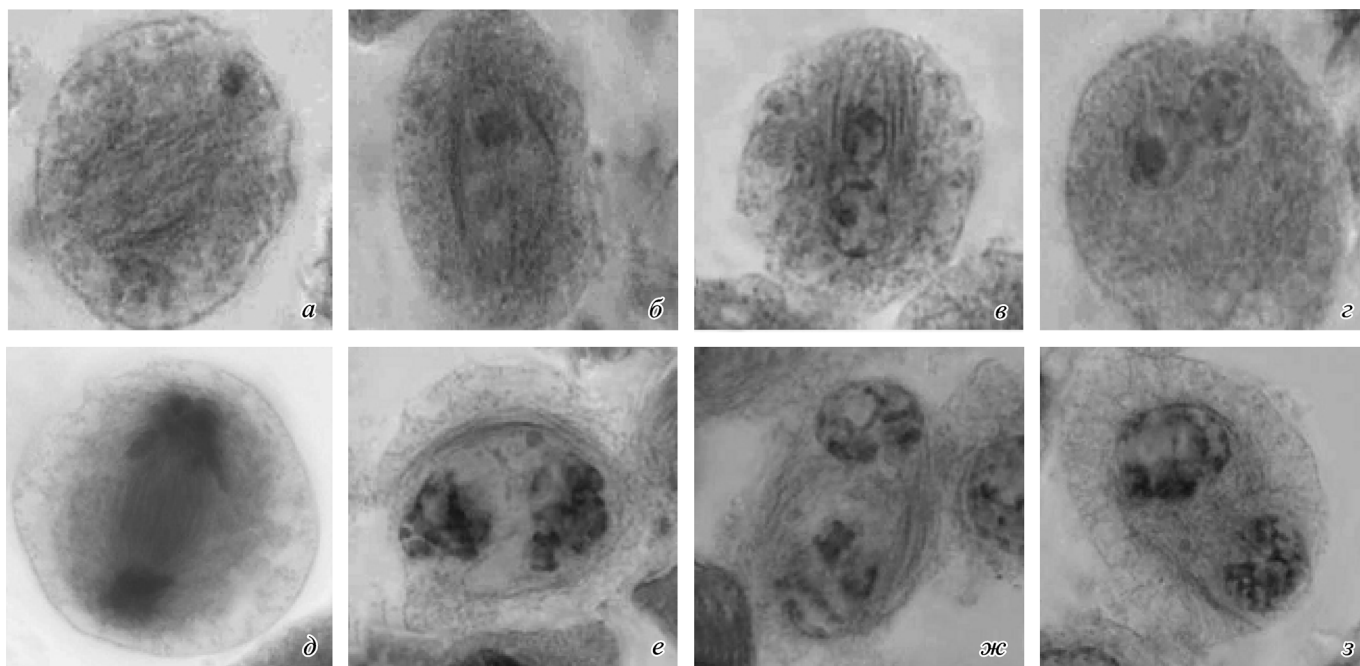


Рис. 5. Мейоз при блоке цитокинеза на стадии среднего фрагмопласта.

a–z — аномальное окончание первого деления мейоза в МКП гаплоида риса: *a* — ранний фрагмопласт в телофазе I; *б, в* — блок цикла цитоскелета на стадии среднего фрагмопласта, сформированные интерфазные ядра мигрируют внутрь «полого цилиндра»; *z* — двуядерная молада на стадии профазы II; *д–з* — аномальная телофаза I и интеркинез в МКП ППГ F1 № 5-739: *д, e* — проникновение телофазных групп хромосом в пространство «полого цилиндра» на стадии сформированного среднего фрагмопласта; *жз* — интерфазные ядра, сосуществующие со средним фрагмопластом; *z* — двуядерная молада на стадии профазы II.

Обсуждение

Согласно результатам наших предыдущих исследований, развитие фрагмопласта в материнских клетках пыльцы с последовательным цитокинезом включает в себя несколько этапов (Шамина и др., 2006б). Формирование раннего фрагмопласта происходит задолго до начала процессов цитокинеза, в ходе построения веретена деления в прометафазе. В средней прометафазе формируются биполярные фибриллы фрагмопласта (фибриллы центрального веретена), а в поздней они организуются в биполярную систему — ранний фрагмопласт. Нарушения этих процессов неизбежно приводят к отсутствию фрагмопласта и блоку цитокинеза. Более того, к такому же результату ведут многие нарушения ранней прометафазы, содержанием которой является переход цитоскелета от перинуклеарной конфигурации к хаотичной прометафазной. Так, полный блок формирования фрагмопласта демонстрируют такие аномалии ранней прометафазы, как консервация перинуклеарного цитоскелетного кольца и блок входа МТ в зону ядра (Шамина и др., 2003а, 2003б).

Клетки с аномалиями средней прометафазы, формирующие монополярные веретена, также не имеют фрагмопласта (Шамина и др., 2005а). Результат аномалий поздней прометафазы — непольные и хаотичные веретена — также характеризуется отсутствием фрагмопласта в телофазе (см. каталог аномальных веретен растительной клетки: Шамина, 2005). В большинстве случаев при таких аномалиях клеточная пластинка не строится, и цитокинез не происходит. Однако возможно формирование коротких клеточных пластинок на случайных хаотично ориентированных пучках МТ и образование из них множественных аномальных дочерних клеточных мембран (в виде насечек) в случае их контакта с материнской мембраной.

Подобный процесс описан при хаотизации веретена деления под действием хлоралгидрата (Mole-Bajer, 1969).

В настоящей работе приведены не описанные ранее аномалии процесса формирования фрагмопласта, происходящие на стадии телофазы. Нарушения фрагмопласта в первом из описанных в настоящей работе аномальных фенотипов позволяют предположить, что причиной аномалий в нем может быть нарушение регуляции соответствующих этапов клеточного цикла. Блок восстановления оболочек вокруг дочерних ядер и нарушение динамики МТ на стадии телофазы в экваториальной зоне делящихся животных клеток с аномальным цитокинезом описаны в экспериментах по ингибированию киназы CDK1 (Wheatley et al., 1997). Так или иначе, этот аномальный фенотип указывает на то, что этап перехода от раннего фрагмопласта (сплошной тяж фибрилл) к среднему (полюй цилиндр) регулируется специальным сигналом и является самостоятельной ступенью в развитии подвижного фрагмопласта.

Второй из описанных аномальных фенотипов также является результатом нарушения сигнального события, затрагивающего, в отличие от предыдущего, лишь цикл цитоскелета и мембран (пластосом). Цикл ядерной оболочки не затронут. Но все морфологические процессы, обеспечивающие цитокинез, блокированы: формирование среднего фрагмопласта, синтез пластосом, изгиб и удлинение фибрилл фрагмопласта, а также их умножение. Нарушение формирования фрагмопласта из интерзональных фибрилл (центрального веретена) и остановка его центробежного движения описаны в митозе клеток корешков пшеницы *Triticum turgidum* L. при воздействии хлорида алюминия (Frantzios et al., 2001).

Третий из описанных в настоящей статье аномальных фенотипов демонстрирует ранний фрагмопласт, в котором осуществляется лишь один из процессов функциони-

рования позднего фрагмопласта и центробежного движения — умножение фибрилл. Фрагмопласт сохраняет форму центрального веретена и расширяется за счет умножения фибрилл; клеточная пластинка также не строится. Этот фенотип дополняет, на наш взгляд, группу аномалий с арестом цитоскелета в конфигурации раннего фрагмопласта и наложением на нее элементов центробежного движения. Это фенотипы «гамма» и «удлиненный фрагмопласт». В этом случае в ходе телофазы фибриллы раннего фрагмопласта удлиняются и изгибаются как единое целое, одним пучком, так что телофазные группы хромосом предельно сближаются или даже меняются местами и вся фигура принимает форму греческой буквы «гамма» (Гордеева и др., 2009). В части МКП телофазное веретено не искривляется, а только аномально удлиняется, деформируя клетку. Наблюдаются также единичные клетки, где изгиб и удлинение раннего фрагмопласта сопровождаются умножением его фибрилл (Гордеева и др., 2009).

Блок формирования фрагмопласта как полого цилиндра описан также в митозе у гомозигот по мутации *HINKEL* (*Arabidopsis*) (Strompen et al., 2002). Продукт этого гена принадлежит к семейству кинезинов (Tanaka et al., 2004). Это согласуется с выдвинутой нами моделью центробежного движения фибрилл фрагмопласта как модификацией В-анафазы: кинезины обеспечивают взаимное скольжение антипараллельных МТ в составе фибриллы и ее удлинение (Brust-Mascher et al., 2004). Возможно, перераспределение фибрилл фрагмопласта в пространстве из конфигурации сплошного пучка в конфигурацию полого цилиндра происходит в результате центробежного движения, и нарушение этого процесса блокирует переход. Относящийся к кинезинам белок TKRP125, как полагают, обеспечивает взаимное скольжение МТ в составе фибрилл фрагмопласта (Asada et al., 1997).

Сохранение телофазным цитоскелетом конфигурации центрального веретена на фоне умножения фибрилл приводит к фенотипу, практически неотличимому от телофазы I в МКП, с одновременным цитокинезом у двудольных. Привлекательно предположение о том, что эволюционный переход от подвижного к неподвижному фрагмопласту в мейозе у двудольных осуществлялся так же, как в этом описанном нами аномальном фенотипе, т. е. за счет утраты функции кинезинов (удлинение фибрилл) и неизвестных белков, которые искривляют МТ в ходе центробежного движения. Отсутствие синтеза пластосом (мембранных пузырьков клеточной пластинки) в телофазе I приводит к отсутствию цитокинеза на этой стадии. Интересно, что отсутствие клеточной пластинки является самой распространенной аномалией цитокинеза в мейозе у злаков (Шамина и др., 2006б).

Четвертый аномальный фенотип, приведенный здесь, — остановка процессов цитокинеза на стадии среднего фрагмопласта. Он служит указанием на то, что центробежное движение позднего фрагмопласта — отдельно регулируемый процесс, отдельная стадия цитокинеза. Фенокопия этой аномалии встречается в митотических клетках корешков под действием ионов алюминия (Frantziou et al., 2001).

Описанные аномалии подтверждают правильность сделанного ранее (Шамина и др., 2006а; Shamina et al., 2007) разделения процесса формирования фрагмопласта на стадии, поскольку выявляют факты существования специальной регуляции начала каждой из них. Кроме того, они разделяют на отдельные стадии процесс утилизации центральных фибрилл веретена деления в ходе

формирования и функционирования подвижного фрагмопласта, выявляя их взаимосвязь и взаимозависимость. Дальнейшее расширение коллекции аномалий формирования фрагмопласта позволит детально изучить этот процесс на морфологическом уровне. Это необходимо не только само по себе, но важно, в частности, для анализа морфологического фенотипа инсерционных мейотических стерилей, обширные коллекции которых получены для ряда видов (арабидопсис, рис, кукуруза) (Martinez-Perez, 2009). Такие стерили служат моделью для изучения молекулярных механизмов деления растительной клетки, в том числе процессов цитокинеза.

Список литературы

- Гордеева Е. И., Шамина Н. В., Дудка Л. Ф., Ковтуненко В. Я., Болоболова Е. У. 2009. Формирование дополнительного фрагмопласта компенсирует нарушение цитокинеза в мейозе у пшенично-ржаного гибрида. Цитология. 54 (4) : 297—301.
- Дорогова Н. В., Шамина Н. В. 2005. Организация цитокинеза в делении растительной клетки. Цитология. 47 (7) : 563—577.
- Шамина Н. В. 2003. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе высших растений. I. Околоядерное кольцо микротрубочек и построение мейотического веретена. Цитология. 45 (7) : 650—654.
- Шамина Н. В. 2005. Аномалии веретена деления растительной клетки. Цитология. 47 (7) : 584—594.
- Шамина Н. В., Гордеева Е. И., Серюкова Е. Г. 2006а. 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., Дорогова Н. В., Серюкова Е. Г. 2003а. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у 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 у высших растений. III. Стадии ранней прометафазы. Цитология. 45 (7) : 661—667.
- Шамина Н. В., Ковалева Н. М., Гордеева Е. И., Серюкова Е. Г. 2006б. Динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе у высших растений. VI. Механизмы последовательного цитокинеза. 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. 2006в. Изменения в ориентации фрагмопласта в результате его чрезмерно центробежного движения при отсутствии клеточной пластинки. Цитология. 48 (12) : 1023—1029.
- Asada T., Kuriyama R., Shibaoka H. 1997. TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytotkinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. J. Cell Sci. 110 : 179—189.
- Brown R. C., Lemmon B. E. 1988. Microtubules associated with simultaneous cytokinesis of coenocytic microsporocytes. Amer. J. Bot. 75 : 1848—1856.
- Brown R. C., Lemmon B. E. 1991. Pollen development in orchids. 2. The cytotkinetic apparatus in simultaneous cytokinesis. Protoplasma. 165 : 155—166.

- Brust-Mascher I., Civelekoglu-Scholey G., Kwon M., Mogilner A., Scholey J. M. 2004. Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 101 : 15 938—15 943.
- Chen Y. C., McCormick S. 1996. *Sidcar pollen*, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development*. 122 : 3243—3253.
- Frantzios G., Galatis B., Apostolakos P. 2001. Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *J. Plant Res.* 114 : 157—170.
- Guertin D. A., Trautmann S., McCollum D. 2002. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 : 155—178.
- Hauser B. A., He J. Q., Park S. O., Gasser C. S. 2000. TSO1 is a novel protein that modulates cytokinesis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Development*. 127 : 2219—2226.
- Hulskamp M., Parekh N. S., Grini P., Schneitz K., Zimmermann I., Lolle S. J., Pruitt R. E. 1997. The *STUD* gene is required for male-specific cytokinesis after telophase II of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Develop. Biol.* 187 : 114—124.
- Jurgens G. 2005. Cytokinesis in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56 : 281—299.
- Magnard J. L., Yang M., Chen Y. C., Leary M., McCormick S. 2001. The *Arabidopsis* gene *tardy asynchronous meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol.* 127 : 1157—1166.
- Martinez-Perez E. 2009. Meiosis in cereal crops: the grasses are back. In: *Meiosis*. Basel: Karger. 5 : 26—42.
- Mayer U., Herzog U., Berger F., Inze D., Jurgens G. 1999. Mutation in the *pilz* group genes disrupt the microtubule cytoskeleton and uncouple cell cycle progression from cell division in *Arabidopsis* embryo and endosperm. *Eur. J. Cell Biol.* 78 : 100—108.
- Mole-Bajer J. 1969. Fine structural studies of apolar mitosis. *Chromosoma*. 26 : 427—448.
- 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., Staehelin A. 2000. Syncytial-type cell plates: a novel kind of cell plate involved in endosperm cellularization of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12 : 933—947.
- Segui-Simarro J. M., Otegui M. S., Austin J. R., Staehelin L. A. 2007. Plant cytokinesis — insights gained from electron tomography studies. *Plant Cell Monogr.* 9 : 251—287.
- Shamina N. V. 2005a. Formation of division spindle in higher plant meiosis. *Cell Biol. Intern.* 29 : 309—318.
- Shamina N. V. 2005b. Catalogue of division spindle abnormalities in higher plants. *Cell Biol. Intern.* 29 : 384—391.
- Shamina N. V., Gordeeva E. I., Kovaleva N. M., Seriukova E. G., Dorogova N. V. 2007. Formation and function of phragmoplast during successive cytokinesis stages in higher plant meiosis. *Cell Biol. Intern.* 31 : 626—635.
- Shamina N. V., Zharkov N. A., Omelyanchuk L. V. 2009. Feed-back control of successive meiotic cytokinesis. *Cell Biol. Intern.* 33 : 393—401.
- Smirnova E. S., Bajer A. S. 1998. Early stages of spindle formation and independence of chromosome and microtubule cycles in *Haemaphys endosperm*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 40 : 22—37.
- Sollner R., Glasser G., Wanner G., Somerville C. R., Jurgens G., Assaad F. F. 2002. Cytokinesis-defective mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129 : 678—690.
- Spielman M., Preuss D., Feng-Lan L., Brown W. E., Scott R. J. 1997. Tetraspore is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124 : 2645—2657.
- Staiger C. H., Cande W. Z. 1993. Cytoskeletal analysis of maize meiotic mutants. In: *Molecular and cell biology of the plant cell cycle*. Kluwer Acad. Press. 157—171.
- Strompen G., El Kasmí F., Richter S., Lukowitz W., Assaad F. F., Jurgens G., Mayer U. 2002. The *Arabidopsis* *HINKEL* gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell-cycle dependent manner. *Curr. Biol.* 12 : 153—158.
- Tanaka H., Ishikawa M., Kitamura S., Takahashi Y., Soyano T., Machida C., Machida Y. 2004. The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes to Cells*. 9 : 1199.
- VanDamme D., Inze D., Russinova E. 2008. Vesicle trafficking during somatic cytokinesis. *Plant Physiol.* 147 : 1544—1552.
- Vantard M., Levilliers N., Hill A. M., Adoutte A., Lambert A. M. 1990. Incorporation of *Paramecium* tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 87 : 8825—8829.
- Wada B., Kusunoki F. 1964. Spindle membrane in meiosis of PMCs of *Tradescantia* and in mitosis of endosperm cells of *Zephyranthes*. *Cytologia (Tokyo)*. 29 : 109—111.
- Wheatley S. P., Hinchcliffe E. H., Glotzer M., Hyman A. A., Sluder G., Wang Y. 1997. CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis *in vivo*. *J. Cell Biol.* 138 : 385—393.
- Zhang D., Wadsworth P., Hepler P. K. 1990. Microtubule dynamics in living dividing plant cells: confocal imaging of microinjected fluorescent brain tubulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 87 : 8820—8824.

Поступила 22 IV 2010

THE STEPS OF MOBILE PHRAGMOPLAST FORMATION IN MEIOSIS WITH SUCCESSIVE CYTOKINESIS

N. V. Shamina,¹ Zh. M. Mukhina,² N. M. Kovaleva,³ V. A. Filiurina⁴

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of RAS, Novosibirsk,

² All-Russian Rice Institute, Krasnodar,

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of RAS Novosibirsk, and ⁴ Novosibirsk state University;

¹ e-mail: shamina@bionet.nsc.ru

Previously non-described in literature abnormalities of phragmoplast formation in pollen mother cells of cereal haploids and allohaploids are reported. These abnormal phenotypes reveal and illustrate some steps of the process of phragmoplast formation in dividing plant cell, indicate a special regulation of their start, and confirm the information about the process obtained from other sources. The cytokinetic stage in plant cytoskeleton cycle is discussed.

Key words: cell plate, cytokinesis, plant cell division, plant cytoskeleton, meiosis, microtubules, phragmoplast.