

**КРАВЕЦ Е.А.¹✉, ПЛОХОВСКАЯ С.Г.¹, ГОРЮНОВА И.И.¹, СИДОРЧУК Ю.В.²,
МУРСАЛИМОВ С.Р.², ДЕЙНЕКО Е.В.², ЕМЕЦ А.И.¹, БЛЮМ Я.Б.¹**

¹ Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,
Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а, e-mail: kravetshelen@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10, e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

✉ kravetshelen@gmail.com, (067) 233-57-46

КОНКУРЕНТНОЕ И КООПЕРАТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК В МИКРОСПОРОГЕНЕЗЕ ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ

Клетка многоклеточного организма, согласно иерархической концепции естественного отбора, сохраняет черты индивидуальности, способности к поиску, коллективному поведению и самоорганизации [1, 2]. Хотя организм обеспечивает целостность, кооперацию и согласованность между разными уровнями его организации, важная роль конкурентных клеточных отношений в нем сохраняется. Одной из форм коллективного и «социального» поведения клеток является цитомиксис – тип межклеточного взаимодействия посредством обмена ядерным и цитоплазматическим материалом. Пыльник с его системой специализированных межклеточных контактов, межклеточной коммуникацией и клеточной дифференцировкой представляет удобную модель для изучения «социального» поведения клеток. Целью данной работы был анализ межклеточных отношений в ходе микроспорогенеза на примере двух клеточных систем – микроспороцитов и тапетума, где цитомиксис рассматривается как маркер таких взаимодействий.

Материалы и методы

Для исследований использовали представителей однодольных – лилию шафранную (*Lilium croceum* Chaix), лук батун (*Allium fistulosum* L.), лук репчатый (*Allium cepa* L.), ячмень двурядный (*Hordeum distichum* L.), а также один вид двудольных – табак виргинский (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) линия SR1. Колосья ячменя фиксировали по Бродскому (ФСУ), пыльники лилейных и табака – по Кларку (ацетоалкоголь). Содержимое пыльников окрашивали ацетогематоксилином с железо-аммонийными квасцами (1%+0,5%) или ацетокармином (6%), каллозные оболочки – анилиновым синим (1%), ядра – DAPI (0,2 мкг/мл). Препараты анализировали с помощью светового и флуоресцентного микроскопов

(Axioskop 40 и Axiostar, Carl Zeiss) с использованием камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss). Фотоизображения обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVisions Rel 4.7 (Carl Zeiss).

Результаты и обсуждение

У исследованных видов цитомиксис наблюдался во всех тканях пыльника. При этом в цитологической картине развития цитомиксиса прослеживались определенные закономерности. У ячменя основные цитомиктические события происходили при завершении интерфазы и в зиготене, у лилии и луков – в лептотене-зиготене, у табака – в зиготене и пахитене. Отдельные цитомиктические события сопровождали и далее процесс микроспорогенеза.

Кооперативное поведение микроспороцитов. В цитомиктическом поведении микроспороцитов (МСЦ) можно различить два преимущественных типа взаимодействия – парные и цепочечные (микроядерные). В первом случае ядра МСЦ сближаются и взаимодействуют попарно, во втором – в межклеточные взаимодействия вовлекается значительное число микроспороцитов, в результате парные контакты преобразуются в цепочечные (рис. 1).

Парный тип контактов достаточно быстротечен и осуществляется преимущественно путем перемещения петель хроматина через один или несколько цитомиктических каналов. По завершении зиготены поляризованные ядра обычно расходятся на свои прежние позиции, где продолжают мейотическое деление. Цепочечные контакты сопровождаются появлением микроядер, которые образуются из мигрирующего хроматина напротив цитомиктических каналов (рис. 1, а–д). Иногда ядра и микроядра «пускаются» в цепочную миграцию по клеткам, создавая впе-

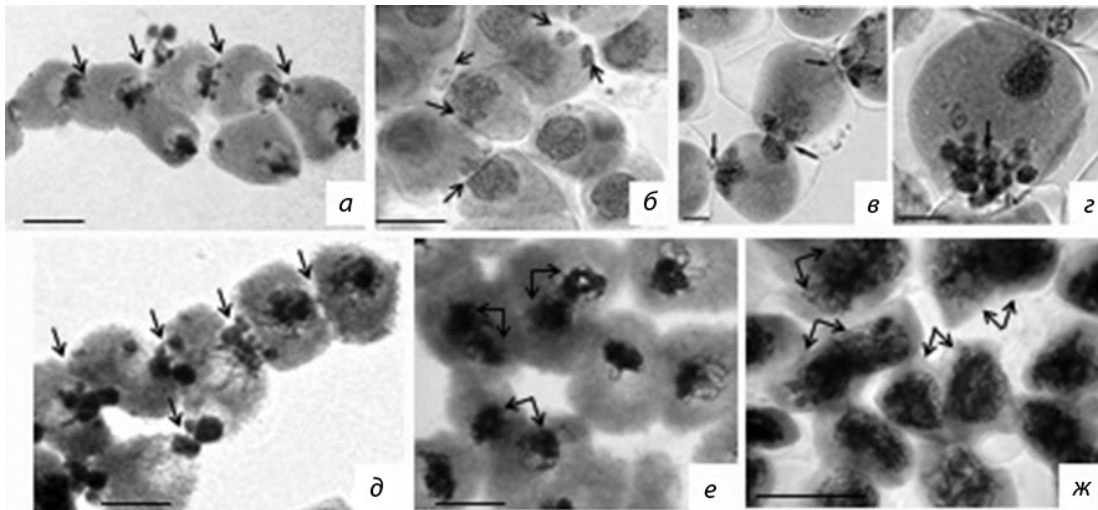


Рис. 1. Различные типы взаимодействий между микроспороцитами в зиготене-пахитене: *a–d* – цепочечные «микроядерные» взаимодействия; *e–ж* – парные «петельные» взаимодействия; *Hordeum distichum* (*a, d, e*), *A. cerea* (*б*), *N. tabacum* (*в, з*), *A. fistulosum* (*ж*). Обозначения: стрелками указаны транзитный хроматин и парные контакты. Окрашивание: ацетогематоксилин (*a, d–ж*), ацетокармин (*б–з*). Масштаб: 10 мкм

чтление, что объем убывающего хроматина компенсируется входящим (рис. 1, *a, d*). Такие цепочечные миграции ядер более свойственны растениям ячменя и табака, однако редко наблюдаются у лука и лилии, для которых более характерны парные взаимодействия (рис. 1, *e, ж*). Дальнейшая судьба мигрирующих ядер и микроядер может быть различной.

С интенсификацией цитомиксиса среди МСЦ исследованных видов наблюдается дифференциация на «доноров» и «реципиентов» (или акцепторов). В «донорно-акцепторных» отношениях микроспороцитов проявляются сложные элементы социального поведения. Так, в некоторых случаях несколько доноров окружают один из микроспороцитов и впрыскивают в него свой хроматин (рис. 2, *a, б*). Функциональное значение таких взаимодействий еще остается необъяснимым. Поскольку показано, что мигрирующий хроматин сохраняет не только структуру, но и функциональную активность [3, 4], то в таком поведении можно видеть элементы альтруистического поведения или коллективного «спасения». Гипохромосомные МСЦ могут восстанавливать свой генетический баланс за счет обратимых цепочечных взаимодействий, замены редукционного деления на эквационное или подвергаться отрицательному отбору.

У табака цитомиктические перемещения хроматина в основном ограничивались парными клеточными взаимодействиями. Однако, при интенсификации цитомиксиса, парные взаимодей-

ствия могли преобразовываться в цепочечные (рис. 1, *в, з*).

Кооперативное поведение тапетальных клеток. Цитомиксис в тапетуме характеризуется своими особенностями межклеточного взаимодействия. Как это типично для эпителиальной ткани, клетки тапетума связаны в однослойный пласт, выстилающий полость пыльника. Поведение тапетальных клеток обладает таксонспецифическим характером. У лилии и луков с началом мейоза в тапетуме рано разворачивается волна литической активности и «периплазмодизации» (рис. 2, *в*).

Клетки тапетума приобретают извилистый контур, формируют выпячивания и псевдоподии (рис. 2, *з*). Подобно эпителиальным клеткам в культуре *in vitro* [5], они «расползаются» между микроспороцитами, двигаясь не поодиночке, а в виде многоклеточных тяжей. У ячменя и табака двуядерные клетки тапетума в начале микроспорогенеза имеют ровную поверхность и таблитчатую форму. Цитомиксис в тапетуме у этих видов коррелирует с активизацией ядерных миграций между микроспороцитами. У лилии и луков с активизацией цитомиксиса между тапетальными клетками происходят сложные формы перетекания хроматина и ядерных слияний, образование высокоплоидных ядер, нередко гигантских, а также синцитиев и многоядерных конгломератов. Прямые миграции хроматина могут охватывать несколько клеток (рис. 2, *в*).

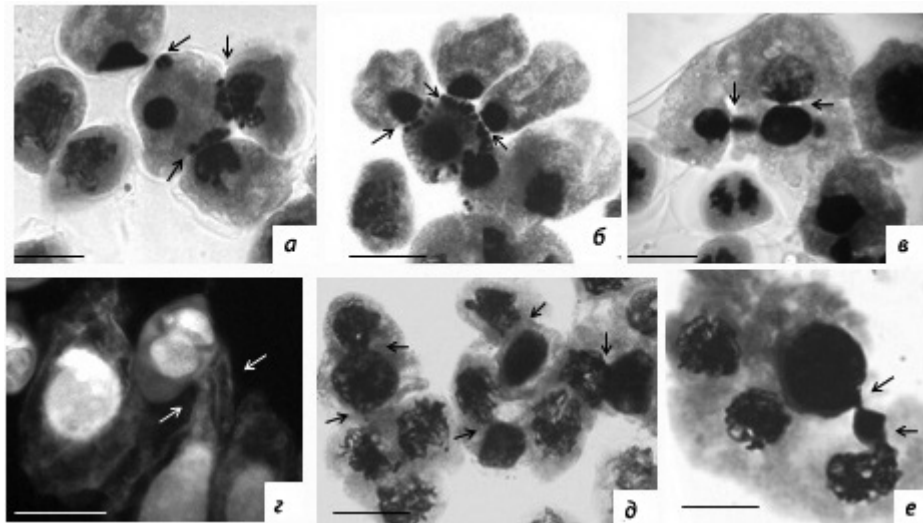


Рис. 2. Межклеточные и межтканевые (микроспорциты-тапетум) взаимодействия в микроспорогенезе: *a* – «донорно-акцепторные» взаимодействия микроспорцитов в зиготе; *b* – транслокации хроматина в тапетуме; *c–e* – взаимодействия между тапетальными клетками и МСЦ; *c* – образование выпячиваний и псевдоподий клетками тапетума, МСЦ в телофазе 2; *L. croceum* (*a–b, d–e*), *A. fistulosum* (*b*), *A. cepa* (*c*). Обозначения: стрелками указаны клеточные контакты и миграция хроматина. Окрашивание: ацетогематоксилин (*a–b, d–e*), анилиновый синий + DAPI (*c*). Масштаб: 10 мкм

Конкурентное поведение клеток в микроспорогенезе. У однодольных уже в раннем микроспорогенезе между микроспорцитами и тапетальными клетками наблюдаются тесные межклеточные взаимодействия с двунаправленной транслокацией хроматина. Взаимодействия между МСЦ и тапетумом сопровождались формированием псевдоподий и ядерных мостов (рис. 2, *c–e*), при этом часть клеток тапетума уже в зиготе распределялась между МСЦ. Межтканевая транслокация хроматина иногда приобретала сложный каскадный характер, охватывая по несколько ядер. Однако в большинстве случаев перетекание хроматина было направлено от МСЦ к ядрам тапетальных клеток (рис. 2, *e*). В цепочечные формы транслокаций обычно вовлекались высокоплоидные ядра тапетума, способные аттрагировать хроматин из окружающих клеток, включая МСЦ. Одним из факторов, инициирующих межтканевые взаимодействия, возможно, является гидролитическая (каллазная) активность тапетальных клеток. Примечательно, что в пыльнике растений табака не наблюдалось межтканевых взаимодействий ни при каком уровне цитомиксиса. Несмотря на тесное соприкосновение оболочек клеток тапетума и микроспорцитов в зиготе-пахитене, образования цитомиктических каналов и транслокаций хроматина между этими клетками не отмечалось.

Итак, в цитологической картине цитомиксиса как на межклеточном, так и межтканевом уровнях прослеживаются определенные закономерности. В ходе микроспорогенеза между микроспорцитами преобладает альтруистическое поведение внутри тапетума, а между микроспорцитами и тапетальными клеткам у однодольных видов – конкурентные отношения. Конкуренция сопровождается сложными цепочечными взаимодействиями, внедрением тапетальных клеток на «территорию» МСЦ, формированием ядер разного уровня плоидности, двунаправленным перемещением хроматина. Причем, полиплоидные ядра тапетума, как мощные акцепторы, успешно конкурируют с МСЦ, направляя транслокацию хроматина в свою сторону. Возможно, каллозная оболочка, начинающаяся откладываться на внутренней стенке микроспорцитов с началом мейоза, защищает их от воздействия именно со стороны тапетальных клеток. Ответы на эти, возможно, парадоксальные данные следует искать в синхронности пролиферативной и метаболической активности двух соседних тканей. Тапетум, кроме снабжения МСЦ пластическими веществами, секреторирует различные полисахариды и ферменты, в частности каллазу [6, 7], которая может активизировать цитолитические процессы не только в самом тапетуме, но и микроспорцитах. Микроспор-

циты, со своей стороны, участвуют в регуляции тапетогенеза, запуская, в частности, программируемую клеточную гибель тапетума [8, 9]. Появление межтканевых взаимодействий может быть обусловлено обострением конкуренции между тапетумом и микроспороцитами за пространство при дифференциации тканей пыльника [10–12]. По-видимому, межклеточная и межтканевая конкуренция в мейозе однодольных является видоспецифической чертой дифференциации микроспорангия, отличающегося большими размерами и избыточным количеством микроспороцитов. Отсутствие межтканевых взаимодействий в микроспорогенезе у двудольных, в частности табака, свидетельствует о лучшей сбалансированности размеров генеративной и соматической тканей при дифференциации пыльника.

Выводы

В ходе дифференциации тканей пыльника у покрытосеменных наблюдаются сложные формы коллективного «социального» поведения клеток тапетума и микроспороцитов.

С интенсификацией цитомиксиса среди микроспороцитов происходит дифференциация на «доноров» и «реципиентов» (акцепторов).

Между микроспороцитами преобладает кооперативное альтруистическое поведение; вну-

три тапетума, а также между микроспороцитами и тапетальными клеткам у однодольных доминируют конкурентные отношения. У двудольных конкурентные клеточные отношения в раннем микроспорогенезе не выявлены.

Причины межтканевых взаимодействий могут быть обусловлены обострением конкуренции между тапетумом и микроспороцитами за пространство при дифференциации тканей пыльника у однодольных. Полиплоидные ядра тапетума и синцитии, будучи мощными акцепторами, способны конкурировать с МСЦ и направлять транслокацию хроматина в свою сторону.

Отсутствие межтканевых конкурентных взаимодействий в пыльнике двудольных, вероятно, отражает лучшую сбалансированность процессов дифференциации соматических и генеративных тканей микроспорангия по сравнению с однодольными.

Работа выполнена при поддержке проекта «Изучение формирования и функционирования цитомиксических каналов в вегетативных и генеративных клетках растений» в рамках совместного конкурса научных проектов НАН Украины и Российского фонда фундаментальных исследований 2014–2015 гг. (грант НАН Украины № 46-04-14 и гранты РФФИ № 14-04-90414-Укр_а и № 14-04-00992 А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Buss L.W. Evolution, development and the units of selection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1983. – 80. – P. 1387–1391.
2. Исаева В.В. Самоорганизация биологических систем // Известия РАН. Серия биологическая. – 2012. – № 2. – С. 144–153.
3. Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Baiborodin S.I., Deineko E.V. Distribution of telomeres in the tobacco meiotic nuclei during cytomicis // Cell Biol. Int. – 2015. – 39, N 4. – P. 491–495.
4. Mursalimov S., Permyakova N., Deineko E., Houben A., Demidov D. Cytomicis doesn't induce obvious changes in chromatin modifications and programmed cell death in tobacco male meiocytes // Front. Plant Sci. – 2015. – 6, № 846. – P. 1–13.
5. Самойлов В.И., Васильев Ю.М. Механизмы социального поведения тканевых клеток позвоночных: культуральные модели // Журн. общ. биологии. – 2009. – 70. – С. 239–244.
6. Stieglitz H., Stern H. Regulation of α -1,3-glucanase activity in developing anthers of *Lilium* // Dev. Biol. – 1973. – 34, N 1. – P. 169–173.
7. Lu P., Chai M., Yang J., Ning G., Wang G., Ma H. The *Arabidopsis CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE1* Gene Is Required for Male Fertility through Regulating Callose Metabolism during Microsporogenesis // Plant Physiol. – 2014. – 164. – P. 1893–1904.
8. Wu H.M., Cheung A.Y. Programmed cell death in plant reproduction // Plant Mol. Biol. – 2000. – 44. – P. 267–281.
9. Tan H., Liang W., Hu J., Zhang D. *MTR1* encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice // Dev. Cell. – 2012. – 22. – P. 1127–1137.
10. Yang W.C., Ye D., Xu J., Sundaresan V. The SPOROCTELESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. Genes Dev. – 1999. – 13. – P. 2108–2117.
11. Zhao D.Z., Wang G.F., Speal B., Ma H. The *EXCESS MICROSPOROCTELESS1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther // Genes Dev. – 2002. – 16. – P. 2021–2031.
12. Feng X., Dickinson H.G. Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the *Arabidopsis* anther // Dev. Plant Sci. – 2010. – 137. – P. 2409–2416.

**KRAVETS E.A.¹, PLOHOVSKAYA S.H.¹, HORYUNOVA I.I.¹, SIDORCHUK YU.V.²,
MURSALIMOV S.R.², DEINEKO E.V.², YEMETS A.I.¹, BLUM YA.B.¹**

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kiev, Osipovskii str., 2a, e-mail: kravetshelen@gmail.com*

² *Federal State Scientific Institution «Federal Research Centre Institute of Cytology and Genetics», Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Russia, 630090, Novosibirsk, pr. akad. Lavrentieva, 10, e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru*

COMPETITIVE AND COOPERATIVE BEHAVIOR OF CELLS IN ANGIOSPERMS MICROSPOROGENESIS

Aim. A comparative cytological analysis of intra- and intertissue cytomictic interactions in early microsporogenesis of mono- and dicotyledonous plants was performed using two cellular systems: microsporocytes and tapetum. **Methods.** Light and fluorescent microscopy. **Results.** There have been found complex forms of collective «social» cell behavior between tapetal cells and microsporocytes. The altruistic behavior prevails among microsporocytes, while competitive relationships dominate between microsporocytes and tapetal cells (only monocots). Polyploid tapetum nuclei and syncytia as powerful acceptors are able to compete with microsporocytes and guide the chromatin translocation to their favor. **Conclusions.** Intertissue interactions reflect likely the intensification of competition for area in anther between the tapetum and microsporocytes. The absence of intertissue interactions in dicots probably reflects a better balance of differentiation of anther somatic and generative tissues comparatively to monocots.

Keywords: cytomixis, microsporogenesis, tapetum, «social» cell behavior, cell competition.