

**КРАВЕЦ Е.А.**<sup>✉</sup>, **ПЛОХОВСКАЯ С.Г.**, **ГОРЮНОВА И.И.**, **ЕМЕЦ А.И.**, **БЛЮМ Я.Б.**

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

<sup>✉</sup>kravetshelen@gmail.com, (067) 233-57-46

## ВЛИЯНИЕ ЦИТОМИКСИСА НА ХОД МИКРОСПОРОГЕНЕЗА И ОБРАЗОВАНИЕ НЕРЕДУЦИРОВАННЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН У ОДНОДОЛЬНЫХ

Цитомиксис – широко распространенный тип межклеточного взаимодействия в растительных и животных тканях. Наиболее известные исследования цитомиксиса связаны с микроспорогенезом покрытосеменных, где он наблюдается преимущественно в ранней профазе первого деления синхронно с ключевыми событиями мейоза. Если цитомиксис подпадает под генетическую регуляцию мейоза, то мигрирующий хроматин, при условии сохранения его интактности и функциональной активности [1, 2], может встраиваться в геном клеточных реципиентов и участвовать в перестройке генома микроспороцитов. Это косвенно подтверждается хромосомным полиморфизмом микроспороцитов и существованием широкого ряда природных полиплоидных цитотипов у многих видов растений, которым свойственен цитомиксис [3–5]. Однако в вопросе о влиянии цитомиксиса на ход мейоза не все так однозначно. В одних случаях цитомиксис дестабилизирует мейоз, в других, не влияет на его прохождение, в третьих – оптимизирует количество микроспороцитов и положительно воздействует на качественный состав пыльцы [6–9]. Нет полной ясности с механизмами формирования нередуцированных пыльцевых зерен и возникновения высокоплоидных цитотипов [5]. Накопленная в течение последних лет информация, а также факт приуроченности цитомиксиса к мужской генеративной сфере и «male-driven» эволюции, позволяют рассматривать цитомиксис как один из механизмов увеличения генетического разнообразия и видообразования у растений. Целью настоящего исследования было изучение судьбы цитомиксического хроматина, его влияния на последующие фазы мейоза и формирование нередуцированных микроспор.

### Материал и методы

Для исследований использовали такие виды лилейных, как лилия шафранная (*Lilium*

*croceum* Chaix.), лук батун (*Allium fistulosum* L.) и лук репчатый (*Allium cepa* L.). Предметом изучения был спонтанный цитомиксис. Пыльники фиксировали по Кларку или Бродскому (ФСУ). Содержимое пыльников окрашивали 1 %-ным ацетогематоксилином с железо-аммонийными квасцами (0,5 %), DAPI (0,2 мкг/мл), реже 2 %-ным ацетокармином. Препараты анализировали с помощью светового и флуоресцентного микроскопов (Axioskop 40 и AxioStar, Carl Zeiss) с использованием камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss). Фотоизображения обрабатывали с использованием программного обеспечения AxioVisions Rel 4.7 (Carl Zeiss).

### Результаты и обсуждение

Цитомиксис у исследованных видов является спонтанным процессом межклеточного взаимодействия. В зигопакитене микроспорогенеза им охватывается значительная часть популяции микроспороцитов [10]. Подобный тип цитомиксиса с прямыми междуядерными взаимодействиями смежных поляризованных микроспороцитов мы охарактеризовали как парно-петельный. Типично, он протекает без образования транзитных микроядер, а по завершении пахитены ядра расходятся и возвращаются на свои прежние позиции в клетке, где продолжают мейоз. Парно-петельный тип цитомиксиса обычно не имеет заметных последствий для мейоза. Однако в некоторых бутонах или отдельных пыльниках исследованных видов было заметно усиление цитомиксиса (донорно-реципиентный тип), которое сопровождалось вовлечением в межклеточные взаимодействия цепочек клеток и большого количества транзитных микроядер [10]. Цитологические последствия интенсивного цитомиксиса обнаруживались в виде асинхронности протекания мейоза, нарушений и задержек в формировании метафазных пластинок, выбросов ацентриков за пределы веретена, нарушений анафазного рас-

хождения хромосом, формирования мостов и перетяжек, реституции анафазных групп хромосом, а также гибели части популяции микроспороцитов (рис.).

Судьба цитомиктического хроматина, также как и его влияние на формирование про-

дуктов мейоза, могут быть различными. Основываясь на цитологическом анализе материала, мы считаем, что цитомиктический хроматин формирует дополнительные мейотические хромосомы в реципиентных клетках (рис. а-г).

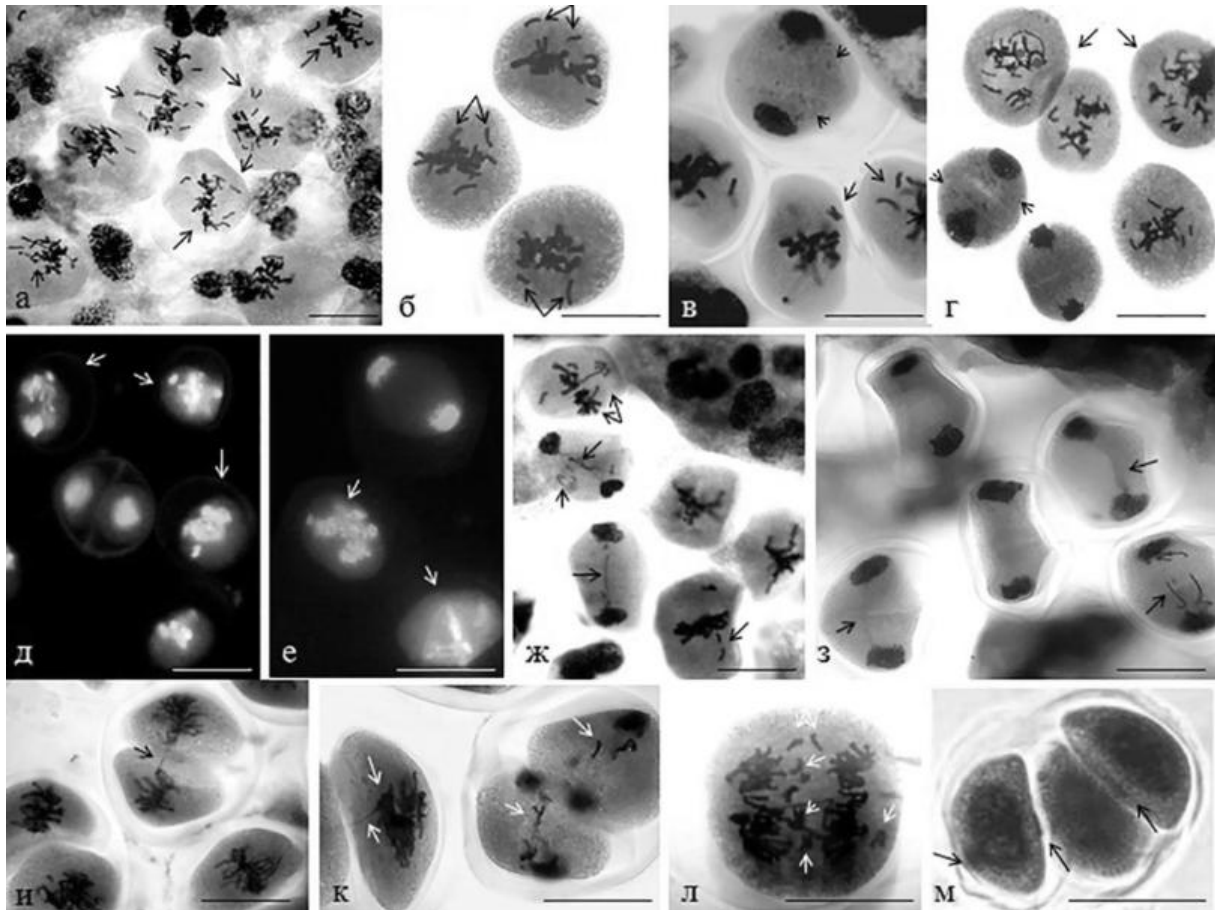


Рис. Цитогенетические последствия цитомиксиса в микроспорогенезе: а-б – метафаза 1, ацентрики не встраиваются в метафазную пластинку (стрелками обозначены ацентрики, в том числе с бивалентной организацией); в – мета- и телофаза 1, фрагментация хромосом (короткими стрелками обозначены мелкие фрагменты в области фрагмопласта, длинными – биваленты); г – затруднения в формировании метафазной пластинки, блок метафазы, телофаза 1 (длинными стрелками обозначены микроспороциты с метафазным блоком, короткими – фрагменты хромосом); д-е – блок в мета-анафазе 1 и реституция анафазных хромосом (стрелками указан мета-анафазный блок); ж-з – мета- и телофаза 1 (стрелками обозначены хромосомные мосты и фрагменты); и-к – мета- и телофаза 2, хромосомные мосты между смежными диадами (стрелками обозначены мосты и ацентрики); л – образование монады (стрелками обозначены ацентрики бивалентной организации); м – цитомиксис между микроспорами в тетраде (стрелками обозначены микроядро и цитомиктический хроматин); *L. croceum* (а-г, ж-л), *A. cera* (д-е), *A. fistulosum* (м). *Окрашивание*: ацетогематоксилин (а, в, г, ж-л), DAPI (д-е), ацетокармин (б, м). *Масштаб*: 10 мкм.

При этом большинство реципиентных хромосом подвергались перестройкам, очевидно, в ходе предшествующего мейотического кроссинговера. Так, в метафазе 1 наблюдалось

большое количество ацентрических линейных фрагментов бивалентной организации, иногда разной длины, реже кольцевых ацентриков (рис. а-г).

Сохранение цитомиктической хроматинной бивалентной организации подтверждает наше предположение о том, что хромосомные перестройки могли происходить одновременно с рекомбинацией ДНК. Значительная часть ацентрических фрагментов хромосом в ходе первого деления фрагментировалась (рис. а–г). Образование ацентрических и дицентрических фрагментов, по-видимому, является результатом негомологических транслокаций и неравного кроссинговера. Ацентрики затрудняют формирование основной метафазной пластинки (рис. в, г, ж), дицентрики – анафазное расхождение гомологов (рис. г–е, ж), что нередко завершается мета- анафазным блоком, реституцией расходящихся анафазных групп и формированием нередуцированных диад (рис. г–е). Многие телофазные ядра в первом делении оказывались соединенными хромосомными мостами, которые иногда разрывались, а ацентрики фрагментировались в зоне фрагмопласта (рис. г, ж, з). Часть микроспороцитов, по-видимому, гипохромосомных, дегенерировала уже после первого деления (рис. з). Несмотря на значительное число неорганизованных фрагментов, характерной для цитомиксиса «липкости» или «текучести» хромосом не наблюдалось, а ход мейоза, в целом, сохранял присущий ему порядок. Мультиабберрантность мейоцитов можно объяснить только с позиции, во-первых, присутствия дополнительных хромосом, во-вторых, программируемости их перестроек.

Во втором делении картина цитогенетических аномалий повторялась, хотя и с меньшей частотой (рис. и, к). С одной стороны, выбросы ацентриков и высокая частота присутствия микроядер в микроспорах дают основание полагать, что значительная часть цитомиктического хроматина не интегрировалась в состав ядер редуцированных тетрад (рис. к, м). С другой стороны, центрические фрагменты, хромосомы со сбалансированными перестройками, разорванные дицентрики, а также, вероятно, интактные реципиентные хромосомы, могли захватываться ядрами как нередуцированных, так и редуцированных диад и тетрад. В ряде случаев формировался общий ана- телофазный блок с перекрестными хромосомными мостами и ацентриками бивалентной структуры, завершающийся образованием нередуцированной тетраплоидной монады (рис. л). Тонкие хромосомные мосты нередко сохранялись и после цитокинеза, связывая метафазные пластинки хромосом смеж-

ных диад (рис. и–к). Примечательно, что цитомиктическая миграция хроматина могла продолжаться и после окончания мейоза: между микроспорами внутри тетрад или триад (рис. м). Других примеров цитомиктической миграции хромосом на продвинутых стадиях мейоза или после его завершения мы не наблюдали. Итак, мы полагаем, что присутствие в микроспороцитах реципиентных хромосом, значительная часть которых подверглась перестройкам и фрагментации, обуславливает цитогенетические нарушения в мейозе, нередко завершающиеся формированием мета- анафазного блока и реституцией диад.

Известны несколько механизмов образования  $2n$  пыльцевых зерен: реституция первого или второго делений мейоза, а также промежуточная и постмейотическая реституция [11]. У исследуемых видов основным механизмом полиплоидизации микроспор была реституция первого деления путем формирования блока в мета-анафазе. Причем, в большинстве случаев, цитомиктический хроматин сохранял свою бивалентную организацию, что отличает данный механизм от способа формирования нередуцированных мужских гамет, например, у синаптического мутанта *Begonia* [12].

Что касается хромосомного полиморфизма, то основная часть ацентриков, по-видимому, не включается в геном микроспороцитов и микроспор. В то же время дополнительные хромосомы со сбалансированными абберрациями, интактные, центрические и разорванные дицентрические фрагменты могут захватываться ядрами в ходе первого и/или второго деления мейоза. Вместе с тем, это еще не доказывает факта их интеграции в геном микроспор и пыльцевых зерен. В пользу хромосомного полиморфизма микроспор косвенно свидетельствует полиморфизм размера пыльцевых зерен [4–7]. Однако у лилии было обнаружено, что микроспороциты после «ядерных миграций» сохраняли нормальное диплоидное число хромосом [13].

Причины основных цитопатологий мейоза, по-видимому, следует искать в рекомбинантных и репарационных процессах зиготахитены профазы мейоза, которые могут сопровождаться неравным кроссинговером и хромосомными перестройками. Вероятность таких событий возрастает пропорционально увеличению числа повторов нуклеотидных последовательностей негомологических участков ДНК [14].

Действительно, неравный кроссинговер рассматривается сейчас как один из главных механизмов эволюции генома и увеличения его размеров, а также поддержания гетерозиготности природных популяций организмов [14]. Огромный по размеру геном лилейных представляет собой широкую арену для отработки подобных генетических механизмов. В функцию цитомиксиса, как мы предполагаем, может входить межклеточный перенос матрицы для гомологической репарации повреждений ДНК. Чем больше спонтанных, индуцированных и/или программируемых мейозом двойных разрывов ДНК, тем больше хроматина вовлекается в межклеточный транзит. Наблюдаемые последствия цитомиксиса в ходе мейоза, вероятно, связаны с рекомбинацией и гомологической репарацией ДНК в ранней профазе I. Экстра-хроматин инициируют реституцию первого мейотического деления и может интегрироваться в геном микроспороцитов и микроспор, хотя, большая его часть в виде ацентриков или микроядер не включается в состав ядра. Наблюдаемые цитогенетические аномалии микроспорогенеза, на наш взгляд, связаны с механизмами стабилизации мейоза путем усвоения и адаптации или сброса (диминуции) и реутилизации, привнесенной ДНК. Подобного мнения придерживается ряд ученых, считающих, что цитомиксис, допуская большие масштабы потерь и приобретений ДНК, способ-

ствует корректировке генома, адаптации и стабилизации новых полиплоидов [5, 15–16].

### Выводы

- Цитомиктический хроматин у исследуемых видов формирует дополнительные мейотические хромосомы в реципиентных микроспорах.

- Многие реципиентные хромосомы подвергаются перестройкам и фрагментации, сохраняя при этом свою бивалентную организацию.

- Дополнительные хромосомы со сбалансированными абберациями, дицентрические и центрические фрагменты захватываются ядрами диад и, вероятно, могут интегрироваться в геном микроспор. Ацентрики, как правило, не включаются в геном реципиентов.

- Основным механизмом полиплоидизации микроспороцитов и микроспор у исследуемых видов является реституция первого деления через формирование блока в мета-анафазе.

- Цитогенетические аномалии микроспорогенеза, обусловленные активизацией цитомиксиса в профазе, могут отражать механизмы стабилизации мейоза путем усвоения и адаптации либо диминуции и реутилизации привнесенной ДНК.

### Литература

1. Mursalimov S., Permyakova N., Deineko E., Houben A., Demidov D. Cytomixis doesn't induce obvious changes in chromatin modifications and programmed cell death in tobacco male meiocytes // *Front. Plant. Sci.* – 2015. – V. 6 (846). doi: 10.3389/fpls.2015.b.00846.
2. Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Baiborodin S.I., Deineko E.V. Distribution of telomeres in the tobacco meiotic nuclei during cytomixis // *Cell Biol. Int.* – 2015. – V. 39 (4). – С. 491–495.
3. Lattoo S.K., Khan S., Bamotra S., Dhar A.K. Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications // *J. Biosci.* – 2006. – V. 31. – P. 629–637.
4. Ghaffari S.M. Occurrence of diploid and polyploidy microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytomixis // *Afr. J. Biotech.* – 2006. – V. 5. – P. 1450–1453.
5. Reis A.C., Sousa S.M., Viccini L.F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba* // *Plant Syst. Evol.* – 2015. – V. 302 (1). – P. 121–127.
6. Singhal V.K., Kumar P. Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of *Himalayan poppy* (*Meconopsis aculeate* Royle) // *J. Biosci.* – 2008. – V. 33. – P. 371–380.
7. Falistocco E., Tosti N., Falcinelli M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes // *J. Heredity.* – 1995. – 86. – P. 448–453.
8. Malallah G.A. Cytomixis and its possible evolutionary role in a kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (Brassicaceae) // *Comp. Cytogen.* – 2011. – V. 5 (3). – P. 143–161.
9. Kravets E.A. Cytomixis and its role in the regulation of plant fertility // *Rus. J. Dev. Biol.* – 2013. – V. 44 (3). – P. 113–128.
10. Kravets E.A., Sidorchuk Yu.V., Horyunova I.I., Plohovskaya S.H., Mursalimov S.R., Deineko E.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Intra- and intertissular cytomictic interactions in the microsporogenesis of mono- and dicotyledonous plants // *Cytol. Genet.* – 2016. – V. 50 (5). – P. 267–277.
11. Ramanna M.S., Jacobsen E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – a review // *Euphytica.* – 2003. – V. 133. – P. 3–18.
12. Dewitte A., Eeckhaut T., Van Huylenbroeck J., Van Bockstaele E. Meiotic aberrations during 2n pollen formation in *Begonia* // *Heredity.* – 2010. – V. 104. – P. 215–223.

13. Zheng G.C., Yang Q.R., Zheng Y.R. The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in lily // *Caryologia*. – 1987. – 40. – P. 243–259.
14. Cai X., Xu S.S. Meiosis-driven genome variation in plants // *Curr. Genomics*. – 2007. – V. 8. – P. 151–161.
15. Zhou S.Q. Viewing the difference between the diploid and the polyploid in the light of the upland cotton aneuploidy // *Hereditas*. – 2003. – V. 38. – P. 65–72.
16. Kalinka A., Achrem M., Rogalska S.M. Cytomixis-like chromosomes/chromatin elimination from pollen mother cells (PMCs) in wheat-rye allopolyploids // *Nucleus*. – 2010. – V. 53. – P. 69–83.

**KRAVETS E.A., PLOHOVSKAYA S.H., HORYUNOVA I.I., YEMETS A.I., BLUME Ya.B.**

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

**IMPACT OF CYTOMIXIS ON THE MICROSPOGENESIS AND FORMATION OF UNREDUCED POLLEN GRAINS IN MONOCOTS**

**Aim.** Despite significant progress in the investigation of cytomixis its functional role and effect on the course of meiosis as well as mechanisms of 2n pollen grains formation is still not completely clear. We have studied the destination of cytomictic chromatin as well the mechanisms of unreduced microspores formation in species of monocots with spontaneous cytomixis. **Methods.** Light and fluorescent microscopy. **Results.** The cytomictic chromatin forms additional meiotic chromosomes in the recipient microsporocytes. Many of these meiotic chromosomes undergo rearrangement and fragmentation but retain their bivalent organization. **Conclusions.** Cytogenetic anomalies of microsporogenesis caused by activation of cytomixis in prophase may reflect meiosis stabilization mechanisms by assimilation and adaptation or diminution and reutilization of the introduced DNA. The main mechanism of polyploidization of microsporocytes and pollen grains in studied monocots is the restitution of the first meiotic division via the formation of a meta-anaphase I block.

**Keywords:** cytomixis, microsporogenesis, additional (recipient) chromosomes, meta-anaphase I block, *Lilium croceum* Chaix., *Allium cepa* L., *Allium fistulosum* L.