

С.Р. МУРСАЛИМОВ, С.И. БАЙБОРОДИН,
Ю.В. СИДОРЧУК, В.К. ШУМНЫЙ, Е.В. ДЕЙНЕКО
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
E-mail: mursalimovsr@gmail.com

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЦИТОМИКТИЧЕСКИХ КАНАЛОВ В МАТЕРИНСКИХ КЛЕТКАХ ПЫЛЬЦЫ *NICOTIANA TABACUM L.*



Проведен электронно-микроскопический анализ формирования цитомиктических каналов в материнских клетках пыльцы растений табака на стадии профазы I мейоза пыльников. Установлено, что цитомиктические каналы в материнских клетках пыльцы табака могут быть сформированы как на основе единичных плазмодесм, так и de novo при участии специфических электронноплотных тел. Обсуждается роль цитомиктических каналов в регуляции микроспорогенеза.

© С.Р. МУРСАЛИМОВ, С.И. БАЙБОРОДИН,
Ю.В. СИДОРЧУК, В.К. ШУМНЫЙ, Е.В. ДЕЙНЕКО, 2010

Введение. Важная роль в регуляции роста и развития растений принадлежит межклеточным цитоплазматическим контактам, осуществляемым через плазмодесмы и цитомиктические каналы. Наиболее распространенным типом межклеточных контактов являются плазмодесмы, которые у растений могут быть простыми и разветвленными [1]. Через плазмодесмы происходит транспорт воды и различных низкомолекулярных веществ, а также факторов, регулирующих рост и развитие растений. Диаметр плазмодесм составляет от 20 до 90 нм, поэтому свободный транспорт через них ограничивается частицами менее 1 кД. Более крупные частицы и клеточные органеллы, такие как пластиды, митохондрии, фрагменты ядра и целые ядра, перемещаются между клетками по цитомиктическим каналам, размеры которых существенно больше по сравнению с плазмодесмами и составляют от 250 до 1750 нм [2]. Перемещение органелл и хроматина из одной клетки в другую по цитомиктическим каналам известно как цитомиксис, наиболее часто описываемый для материнских клеток пыльцы (МКП) высших растений [3–7]. Необходимо подчеркнуть, что плазмодесмы имеют сложную внутреннюю структуру в виде сдавленного эндоплазматического ретикулума (десмотрубочки), располагающегося в центре канала плазмодесмы, тогда как цитоплазматические каналы лишены специализированных структур и заполнены цитоплазмой [2, 8].

Существуют несколько точек зрения о функциональном значении цитомиктических каналов. Через цитомиктические каналы происходит перемещение метаболитов и сигнальных молекул, что обеспечивает синхронизацию мейотических делений в МКП [8].

С применением гистохимических методов установлено, что через цитомиктические каналы происходит одностороннее перемещение питательных веществ и некоторых органелл к активно функционирующим МКП в ущерб более слабым [9]. В таком аспекте перемещение через цитомиктические каналы ядерного материала рассматривается авторами как отклонение от нормы.

Некоторые исследователи считают, что цитомиксис вносит определенный вклад в формообразовательный процесс, так как перемещение фрагментов или целых ядер между генеративными клетками через цитомиктические

кие каналы может приводить к возникновению анеу- и полиплоидных гамет [10, 11].

Следует подчеркнуть, что к настоящему моменту все еще неясным остается вопрос о том, как происходит формирование цитомиктических каналов. Известно, что межклеточные контакты в археспориальных клетках осуществляются в предмейотической интерфазе через плазмодесмы [12], однако не исключено, что в дальнейшем эта функция переходит ко вновь образовавшимся цитомиктическим каналам. Необходимо подчеркнуть, что максимальное число цитомиктических каналов отмечено именно в профазе I мейоза.

Хеслоп-Харрисон и др. [8] считают, что цитоплазматические каналы формируются *de novo*, и для того чтобы говорить о происхождении цитомиктических каналов из плазмодесм нет достаточных оснований. Однако в более поздних работах Ван и др. [2, 13] утверждают, что цитомиктические каналы все же могут быть образованы при слиянии плазмодесм. Таким образом, плазмодесмы и цитомиктические каналы могут быть взаимосвязаны.

Скорее всего, существует видоспецифичность в способах образования цитомиктических каналов, а также их числа и размеров. В связи с этим цель настоящей работы связана с изучением особенностей формирования и ультраструктурной организации цитомиктических каналов в МКП *Nicotiana tabacum* L. методами электронной микроскопии.

Материалы и методы. Материалом для исследований послужила линия табака SR1 (*Nicotiana tabacum* L.). Подготовку пыльников, содержащих МКП на стадии профазы I мейоза, для электронно-микроскопического исследования проводили по общепринятой методике с фиксацией в растворе глутарового альдегида и четырехоксида осмия и последующей заливкой в эпоксидную смолу «Аралдит». Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut UCT («Leica», Швейцария), срезы анализировали на микроскопах Libra120 («Carl Zeiss», Германия) и JEM-100S («JEOL», Япония). Измерение ширины межклеточных каналов выполнено с помощью программы iTEM («Carl Zeiss», Германия), при этом плазмодесмы и цитомиктические каналы отличали друг от друга по наличию или отсутствию внутри ка-

нала цистерн сдавленного эндоплазматического ретикулума (десмотрубочки). Электронно-микроскопический анализ был выполнен на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Результаты исследований и их обсуждение. На основании проведенного морфометрического анализа установлено, что ширина плазмодесм в МКП табака на стадии лептотена–зиготена варьировала от 30,97 до 87,55 нм, а цитомиктических каналов на стадиях лептотена–диплотена – от 43,71 до 620,77 нм (таблица). Наблюдаемая вариабельность по ширине межклеточных каналов в некоторой степени ожидаема, так как при ультрамикротомировании прохождение среза вдоль канала определяется случайным образом. Сравнение средних значений убедительно доказывает, что ширина цитомиктических каналов более чем в четыре раза превышает ширину плазмодесм ($255,73 \pm 13,03$ и $59,02 \pm 1,94$ соответственно). Как видно из представленных в таблице данных, минимальные значения размеров цитомиктических каналов практически перекрываются с областью значений размеров плазмодесм. Полученные данные дают основание выдвинуть предположение о том, что с началом микроспрогеноза отдельные плазмодесмы могут быть преобразованы в цитомиктические каналы.

На рисунке, а представлены плазмодесмы и цитомиктический канал, расположенные в одном поле зрения (отмечены стрелками). Несмотря на то, что размер цитомиктического канала (80,0 нм) попадает в область, соответствующую размерам плазмодесмы (от 30,97 до 87,55 нм), внутренняя структура каналов различна. В то время, как во внутреннем пространстве плазмодесм можно наблюдать сдавленные цистерны ЭПР (рисунок, б), внутреннее пространство цитомиктического канала заполнено цитоплазмой (рисунок, в), по электронной плотности не отличающейся от цитоплазмы соседних клеток. Возможно, что этот канал был образован при разрушении внутренней структуры плазмодесмы гидролитическими ферментами с последующим увеличением размеров. Предположение подтверждается микрофотографиями (рисунок, г), на которых видно перемещение пластид между

МКП через межклеточные каналы, размеры которых лежат в интервале размеров плазмодесм (43,71 и 54,64 нм, нижний и верхний соответственно). В данном случае такое перемещение возможно только при разрушении внутренней структуры плазмодесм. Возможно, что дальнейшее увеличение плазмодесм на стадиях зиготены–пахитены повлечет ее преобразование в цитомиктический канал, по которому будет происходить перемещение ядерного материала (цитомиксис).

На стадии пахитены плазмодесмы между МКП закрыты отложениями каллозы. Именно на этой стадии в МКП табака вблизи клеточной стенки были обнаружены специфические электронноплотные тела (рисунок, *d, e*).

Выявленные в районе каллозных оболочек МКП табака электронноплотные тела близки к «серым сферическим телам» (grey spheroidal bodies). Подобные серые сферические тела встречаются в МКП различных видов покрытосеменных [14, 15], однако о ферментативной активности этих структур ранее не сообщалось. Сходные с электронноплотными телами сферосоноподобные вакуоли были выявлены ранее в стеблевых апексах березы (*Betula pubescens*) [16]. Авторами установлено, что сферосоноподобные вакуоли играют важную роль в восстановлении симпластической связи между клетками после периода покоя, поскольку выявленный в их составе фермент эндо- β -1,3-глюканаза способен разрушать каллозные пробки, закрывающие плазмодесмы [16].

Зоны лизиса каллозной оболочки, наблюдаемые в районе местоположения специфических электронноплотных тел, свидетельствуют об их ферментативной активности. Вероятно, что выявленные нами в районе каллозных оболочек электронноплотные тела содержат в себе гидролитические ферменты, растворяющие каллозную оболочку [17, 18], а также другие ферменты, участвующие в растворении многослойной клеточной стенки при образовании цитомиктических каналов.

К настоящему времени накоплены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что цитомиктические каналы могут быть преобразованы из плазмодесм. На ультраструктурном уровне Ван и др. [2, 13] установили, что в стенках как генеративных, так и со-

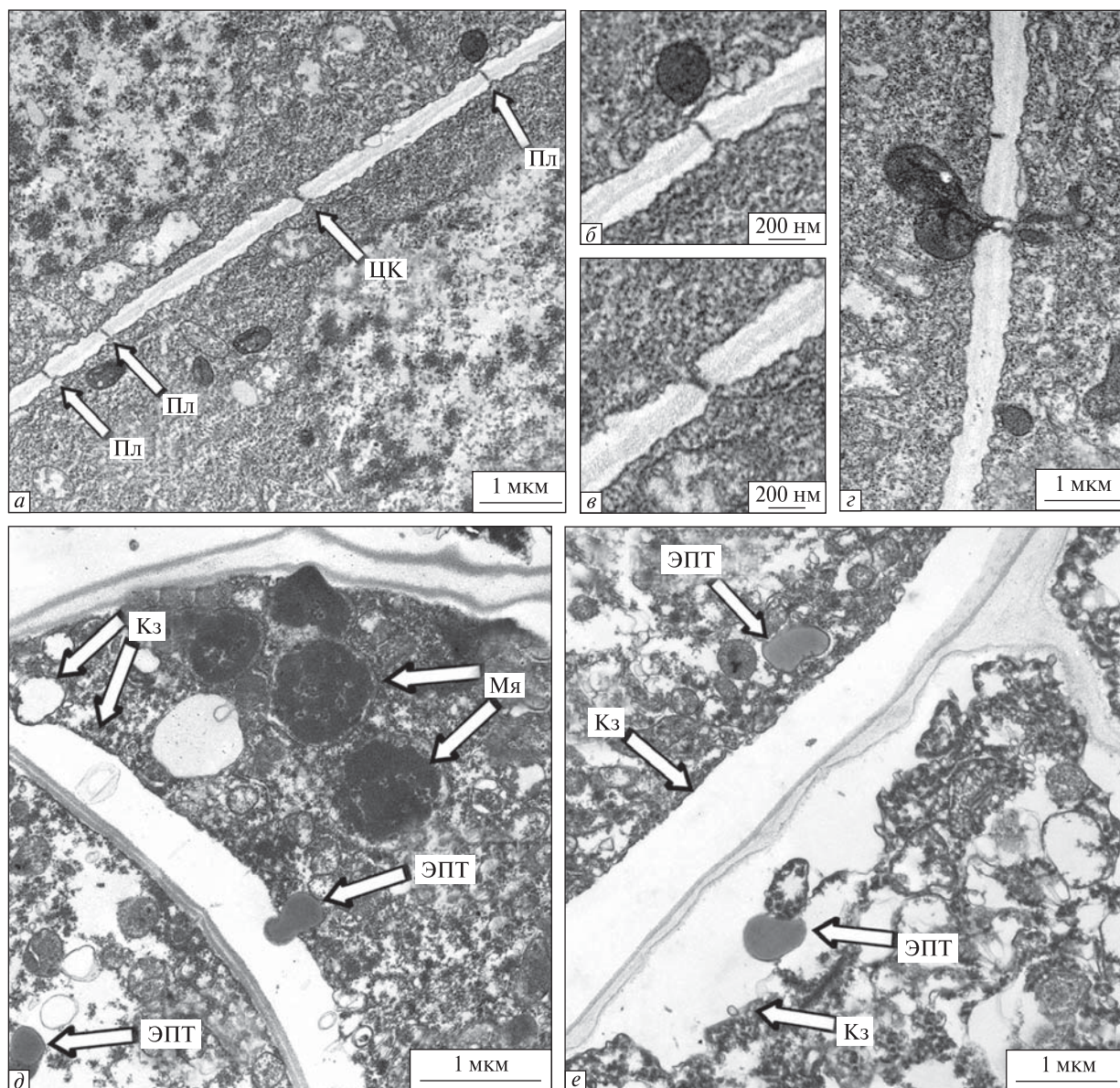
Сравнительный морфометрический анализ размеров межклеточных каналов в МКП табака в профазе мейоза I (лептотена – диплотена)

Вид межклеточных каналов	Количество проанализированных каналов	Ширина межклеточного канала, нм		
		min	max	среднее
Плазмодесмы	67	30,97	87,55	59,02 ± 1,94
Цитомиктические каналы	95	43,71	620,77	255,73 ± 13,03

матических клеток формирование цитомиктических каналов может происходить при слиянии нескольких плазмодесм, расположенных в непосредственной близости друг от друга. Именно в этих районах авторы выявили гидролитические ферменты, способные разрушать клеточную стенку [13]. Однако, как установлено нами, цитомиктические каналы могут быть сформированы и из отдельных плазмодесм.

Следует отметить, что продолжительность функционирования цитоплазматических каналов, образованных на основе плазмодесм, весьма ограничена. Плазмодесмы и цитомиктические каналы закупориваются каллозой, интенсивно откладывающейся на внутренней поверхности клеточной стенки МКП в ходе профазы I мейоза. Далее цитомиктические каналы образуются *de novo* без связи с плазмодесмами. На лилии Давида показано, что ферменты, локально растворяющие каллозный слой, выделяются непосредственно из цистерн гладкого ЭПР, которые располагаются параллельно клеточной стенке [13]. В разрушении каллозной оболочки, возможно, могут принимать участие и другие клеточные структуры, как, например, выявленные нами специфические электронноплотные тела.

Сигнальные молекулы, перемещающиеся по цитомиктическим каналам, могут принимать участие в синхронизации мейотических делений [8, 19, 20]. Однако существуют данные, позволяющие предположить, что их роль в организации клеточного деления более значима. Установлено, что переходу клеток от митотических делений к мейотическим предшествует преобразование простых первичных плазмо-



Образование цитомиктических каналов в МКП табака в профазе мейоза I: *a* – образование цитомиктических каналов на основе плазмодесм на стадии лептотены (Libra120); *b* – плазмодесма (увеличено); *c* – цитомиктический канал (увеличено); *d* – перемещение пластид через разрушенные плазмодесмы из одной МКП в другую на стадии лептотены (Libra120); *d*, *e* – электронноплотные тела в районе каллозной оболочки в МКП табака на стадии пахитены (JEM 100S); Пл – плазмодесма; Цк – цитомиктический канал; ЭПТ – электронноплотные тела; Кз – каллоза; Мя – микроядро

десм в разветвленные комплексные [21]. Модифицированные плазмодесмы в отличие от первичных служат селективными каналами передачи различных факторов, регулирующих рост и развитие растения [22, 23]. Это связано с тем, что у модифицированных плазмодесм увеличивается пропускающая способность [23] и появляются специфические белки, выступающие переносчиками сигнальных молекул [22]. Таким образом, переход клеток археспориальной ткани от митотических делений к мейотическим сопровождается уве-

личивается пропускающая способность [23] и появляются специфические белки, выступающие переносчиками сигнальных молекул [22]. Таким образом, переход клеток археспориальной ткани от митотических делений к мейотическим сопровождается уве-

личением контактов между МКП через преобразование плазмодесм в более сложные структуры [21].

В МПК табака модифицированные плазмодесмы нами не обнаружены, возможно, что их роль выполняют цитомиктические каналы. При преобразовании первичных плазмодесм в цитомиктические каналы их ширина, как установлено нами, увеличивается более чем в четыре раза. Такие преобразования плазмодесм обеспечивают возможность перемещения различных сигнальных факторов между МКП, которые инициируют и регулируют прохождение мейоза. Максимальное количество цитоплазматических каналов отмечается в ранней профазе I [24], однако к концу профазы они закрываются каллозой. Вторичное образование цитомиктических каналов *de novo*, в том числе и при растворении каллозной оболочки электронноплотными телами, вероятно, связано с сохранением необходимости передачи регуляторных сигналов между МКП. Вторичное образование цитомиктических каналов между МКП у *N. tabacum* происходит менее активно, и на более поздних стадиях цитомиксис между МКП встречается гораздо реже, чем в профазе I [24].

Выводы. Полученные нами данные позволяют утверждать, что в МКП табака формирование цитомиктических каналов происходит двумя способами, которые дополняют друг друга (на основе единичных плазмодесм и *de novo* при участии выявленных нами специфических электронноплотных тел). Возможно, что образование широких цитомиктических каналов в МКП компенсирует отсутствие комплексных разветвленных плазмодесм, обнаруживаемых в соматических тканях. Можно предположить, что формирование цитомиктических каналов посредством растворения каллозных оболочек гидролитическими ферментами, локализованными в электронноплотных телах, обеспечивает то количество межклеточных контактов, которое необходимо для регуляции мейоза в условиях, когда их образование на основе плазмодесм уже невозможно (после отложения каллозы).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ: 08-04-01046 «а».

S.R. Mursalimov, S.I. Baiborodin,

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

CHARACTERISTICS OF THE CYTOMICISTIC CHANNEL FORMATION IN *NICOTIANA TABACUM* L. POLLEN MOTHER CELLS

The cytomictic channels in pollen mother cells of tobacco can be formed by two distinct ways: on the basis of plasmodesmata and *de novo* without any relation to ones. Cytomictic channels formation it was shown to be possible on the basis of single plasmodesma. It is not unlikely that special electron-dense bodies involve *de novo* formation of the channels. Also the role of cytomictic channels in the pollen development regulation is discussed.

C.P. Мурсалимов, С.И. Байбородин,

Ю.В. Сидорчук, В.К. Шумный, Е.В. Дейнеко

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ЦИТОМІКТИЧНИХ КАНАЛІВ У МАТЕРИНСЬКИХ КЛІТИНАХ ПИЛКУ *NICOTIANA TABACUM* L.

Проведено електронно-мікроскопічний аналіз формування цитоміктичних каналів у материнських клітинах пилку рослин *Nicotiana tabacum* L. на стадії профазі I мейозу пиляку. Встановлено, що цитоміктичні канали в материнських клітинах пилку тютюну можуть бути сформовані як на основі одиничних плазмодесм, так і *de novo* за участі специфічних електроннощільних тіл. Обговорюється роль цитоміктичних каналів у регуляції мікроспорогенезу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ehlers K., Kollmann R. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning // *Protoplasma*. – 2001. – **216**. – P. 1–30.
2. Ван С.Ю., Юй Ч.Х., Лу С., Ван Ч.И., Чжэн Г.Ч. Ультраструктура и возможное происхождение цитоплазматических каналов, обеспечивающих связь между клетками вегетативных тканей пыльников // *Физиология растений*. – 2004. – **51**, № 1. – С. 110–120.
3. Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. // *J. Heredity*. – 2003. – **94**, № 6. – P. 512–516.
4. Haroun S.A., Al Shehri A.M., Al Wadie H.M. Cytomixis in the microsporogenesis of *Vicia faba* L. (*Fabaceae*) // *Cytologia*. – 2004. – **69**, № 1. – P. 7–11.
5. Lattoo S.K., Khan S., Vamotra 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. – **31**, № 5. – P. 629–637.
6. Bhat T.A., Parveen S., Khan A.H. MMS-induced cytomixis in pollen mother cells of broad bean (*Vicia faba* L.) // *Turk. J.* – 2006. – **30**. – P. 273–279.

7. Singhal V.K., Kumar P. Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Mecconopsis aculeata* Royle) // J. Biosci. – 2008. – **33**. – P. 371–380.
8. Heslop-Harrison J. Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes // Ann. Bot. – 1966. – **30**. – P. 592–600.
9. Миляева Э.Л. К вопросу о цитомиксисе в процессе микроспорогенеза // Бюл. Гл. бот. сада АН СССР. – 1965. – **59**. – С. 53–57.
10. Malallah G., Attia T. Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (Brassicaceae) // Bot. J. Linn. Soc. – 2003. – **143**. – P. 169–175.
11. 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.
12. Hasenkampf C.A., Taylor A.A., Siddiqui N.U., Riggs C.D. Meiotin-1 gene expression in normal anthers and in anthers exhibiting prematurely condensed chromosomes // Genome. – 2000. – **43**. – P. 604–612.
13. Wang X.-Y., Guo G.-Q., Nie X.-W., Zheng G.-C. Cytochemical localization of cellulase activity in pollen mother cells of *David lily* during meiotic prophase I and its relation to secondary formation of plasmodesmata // Protoplasma. – 1998. – **204**. – P. 128–138.
14. Fernandez M.C., Rodrigues-Garcia M.I. Pollen wall development in *Olea europaea* L. // New Phytol. – 1988. – **108**. – P. 91–99.
15. Echlin P., Godwin H. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. 2. Pollen grain development through the callose special wall stage // J. Cell Sci. – 1968. – **3**. – P. 175–186.
16. Rinne P.L.H., Kaikuranta P.M., Van der Schoot C. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy // Plant J. – 2001. – **26**, № 3. – P. 249–264.
17. Frankel R., Shamay I., Nitsan J. Timing of callase activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia* // Biochem. Genet. – 1969. – **3**. – P. 451–455.
18. Chasan R. Breaching the callose wall // Plant Cell. – 1992. – **4**. – P. 745–746.
19. Ehlers K., Kollmann R. Synchronization of mitotic activity in protoplast-derived *Solanum nigrum* L. microcalluses is correlated with plasmodesmal connectivity // Planta. – 2000. – **210**. – P. 269–278.
20. Kwiatkowska M., Maszewski J. Changes in ultrastructure of plasmodesmata during spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. // Planta. – 1985. – **166**. – P. 46–50.
21. Kwiatkowska M., Maszewski J. Changes in the occurrence and ultrastructure of plasmodesmata in antheridia of *Chara vulgaris* L. during different stages of spermatogenesis // Protoplasma. – 1986. – **132**. – P. 179–188.
22. Ding B., Haudenschild J.S., Willmitzer L., Lucas W.J. Correlation between arrested secondary plasmodesmal development and onset of accelerated leaf senescence in yeast acid invertase transgenic tobacco plants // Plant J. – 1993. – **4**, № 1. – P. 179–189.
23. Waigmann E., Zambryski P. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells // Plant Cell. – 1995. – **7**. – P. 2069–2079.
24. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. с мутантным фенотипом // Цитология. – 2007. – **49**, № 10. – С. 870–875.

Поступила 10.12.08