

УДК 581.14+576.32/.36+576.5

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ЦИТОМИКСИСА В МИКРОСПОРОГЕНЕЗЕ ДВУДОЛЬНЫХ (*N. tabacum* L.) И ОДНОДОЛЬНЫХ (*H. distichum* L.) РАСТЕНИЙ

© 2016 г. Ю. В. Сидорчук¹, *, Е. А. Кравец², С. Р. Мурсалимов¹, С. Г. Плоховская², И. И. Горюнова², А. И. Емец², Я. Б. Блюм², Е. В. Дейнеко¹

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10

²Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, 04123, Киев, ул. Осиповского, 2а, Украина

*E-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 16.04.2016 г.

Окончательный текст получен 12.05.2016 г.

Проведено сравнительное исследование температурной индукции цитомиксиса в микроспорогенезе у табака (*N. tabacum* L.) и ячменя (*H. distichum* L.). Показано, что разные режимы термообработки (в период бутонизации табака, 50°C и сухих зерновок ячменя, 48°C) приводили у обоих видов к общему эффекту – возрастанию степени цитомиксиса и сдвигу его максимума на более поздние стадии. Вместе с тем, отмечена специфика в реакции изученных видов. У табака активизация цитомиксиса возрастала значительно, и максимум его проявления сдвигался с зиготены-пахитены профазы на прометафазу-метафазу первого деления мейоза. В последующем ходе мейоза были отмечены типичные для цитомиксиса нарушения структуры хромосом и формирования митотического аппарата, а также активизация цитомиксиса в клетках тапетума. Под воздействием теплового стресса в микроспорогенезе табака нарушалась интеграция содержащих каллозу везикул в состав каллозной оболочки. Холодовая обработка в использованном режиме (7°C) не оказывала влияния на изменение частоты цитомиксиса. Термообработка зерновок ячменя (48°C) способствовала активизации цитомиксиса в сравнении с контролем и смещению его максимума с предмейотической интерфазы на зиготену, а также к смене характера цитомиксисических взаимодействий от парных контактов до образования многоклеточных кластеров. Термообработка индуцировала цитомиксисические взаимодействия и внутри тапетума, а также между микроспороцитами и тапетумом. Однако негативных последствий активизации цитомиксиса на последующих фазах мейоза у ячменя выявлено не было. Предполагается, что тепловой стресс, влияя на метаболизм каллозы и ее интеграцию в состав формирующейся оболочки, приводит к неполному перекрытию цитомиксисических каналов к завершению профазы I и способствует, таким образом, межклеточной миграции хромосом на продвинутых стадиях мейоза.

Ключевые слова: микроспорогенез, цитомиксис, цитомиксисические каналы, плазмодесмы, каллоза, термообработка, *Nicotiana tabacum* L., *Hordeum distichum* L.

DOI: 10.7868/S0475145016060082

ВВЕДЕНИЕ

Цитомиксис – широко распространенный в природе естественный процесс межклеточного взаимодействия, наблюдаемый в вегетативных и генеративных тканях растений и животных (обзоры Kravets, 2012; Lone, Lone, 2013; Mandal et al., 2013; Mursalimov et al., 2013). В широком смысле, под цитомиксисом понимают процесс межклеточного перемещения ядерного материала, оргanelл, сигнальных молекул и трофических факторов, в более узком смысле – только межклеточное перемещение ядра и хромосом. Это явление обнаружено более чем у четырехсот видов покрытосемянных и голосеменных растений (Mursalimov

et al., 2013). Показано, что цитомиксис наблюдается, главным образом, в микроспорогенезе и может оказывать значительное влияние на состав продуктов мейоза (Lone, Lone, 2013; Mandal et al., 2013; Mursalimov et al., 2013). С одной стороны, сопоставление статистических и цитологических данных позволило предположить, что цитомиксис ведет к образованию нередуцированных гамет (Negron-Ortiz, 2007; Singhal et al., 2011; Mursalimov, Deineko, 2015). С другой стороны, возможно, миграция хроматина при цитомиксисе позволяет микроспороцитам гибридных и полиплоидных растений избавиться от “лишней” ДНК, для того чтобы стабилизировать геном и сформиро-

вать сбалансированные и/или редуцированные пыльцевые зерна (Zhou, 2003; Kalinka et al., 2010).

На ультраструктурном уровне показано, что ядро и хроматин не повреждаются при переходе через цитомиктический канал (Mursalimov, Deineko, 2011). Это подтверждают и самые последние исследования динамики теломерных повторов и вариантов модификаций различных типов гистонов в цитомиктических клетках, показывающие, что мигрирующий хроматин сохраняет не только структуру, но и функциональную активность (Mursalimov et al., 2015a, 2015b). Такие данные свидетельствуют в пользу формирующей и эволюционной роли цитомиксиса (Fuentes et al., 2014).

Тем не менее, до настоящего времени среди исследователей нет единого мнения относительно природы и значения цитомиксиса. Одни рассматривают его как нормальный процесс межклеточного взаимодействия, свойственный тканям растений (Bellucci et al., 2003; Wang et al., 2004), другие склоняются к мысли о его патологической природе (Dagne, 1994). По некоторым данным, цитомиксис представляет собой форму клеточного отбора, в ходе которого элиминируются несбалансированные и нерепарируемые микроспороциты, а адаптивные варианты отбираются и сохраняются (Kravets, 2011, 2012, 2013).

Исследование цитомиксиса в природных растительных популяциях осложняется высокой степенью его изменчивости, которая, как предполагается, может модифицироваться факторами внешней среды, в частности, температурой. Показано, что температурный стресс может быть триггером, ускоряющим или замедляющим формирование репродуктивных органов, способным индуцировать цитомиксис и, связанные с ним, аномалии мейоза (Malallah, Attia, 2003; Lattoo et al., 2006; Zinn et al., 2010; Pecrix et al., 2011; Giorno et al., 2013; De Storme, Geelen, 2014). Однако в естественных условиях произрастания растения подвергаются воздействию совокупности факторов среды, что, в значительной степени, маскирует истинные причины возникновения цитомиксиса в тканях растений. Одним из подходов к решению этой проблемы, на наш взгляд, является исследование возможности экспериментальной индукции цитомиксиса в лабораторных условиях. Использование температурного стресса для этой цели может способствовать лучшему пониманию внутриклеточных механизмов цитомиксиса и его роли в реакции генеративных органов, в частности, мужской генеративной системы на внешние воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследований послужили растения табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Petite Nava-

на, линия SR1; работа выполнена в ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и ярового ячменя двухрядного (*Hordeum distichum* L., сорта Камелот и Солнцедар; работа выполнена в ИПБиГ НАН Украины, Киев).

Растения табака выращивали в вегетационных сосудах диаметром 16 см с использованием гидропоники в контролируемых условиях при температуре 24°C, освещении 10000 люкс и световом периоде 18/6 часов. Растения ячменя культивировали в условиях открытого грунта.

Термообработка

Для индукции цитомиксиса в микроспорогенезе термообработку молодых растений табака на стадии бутонизации проводили при различных температурных режимах: 1) 7°C в течение 48 часов; 2) 42°C в течение 24 часов; 3) 50°C в течение 5 часов. Варианты 1 и 2 проводили в условиях термостатированной освещенной комнаты, а вариант 3 – в термостате без освещения. В качестве контроля использовали растения, выращенные при 24°C. В каждом варианте обработки использовали по три растения. Для индукции цитомиксиса в микроспорогенезе ячменя, термообработку воздушно-сухих семян проводили в двух температурных режимах: 1) 38°C в течение 12 часов; 2) 48°C в течение 6 часов. После обработки материал высеивали и выращивали в условиях открытого грунта. В качестве контроля для посева использовали зерновки, хранившиеся при температуре 22°C.

Выбор режимов температурной и временной обработки проводили согласно данным литературы (Генкель, 1982; Smart et al., 1991; Mason et al., 2011; Pecrix et al., 2011; de Storme et al., 2012; Barton et al., 2014), а также в соответствии с собственными предварительными наблюдениями.

Световая микроскопия

Для светооптического исследования использовали общепринятую цитологическую методику. Бутоны табака фиксировали в ацетоалкоголе (1 : 3) в течение 48 часов. Колосья ячменя, длиной 1.2–1.5 см, фиксировали в смеси Бродского (формалин : этанол : ледяная уксусная кислота – 3 : 1 : 0.3) в течение 6 час. После фиксации материал промывали в 70% этаноле и сохраняли при 4°C.

Микроспороциты табака окрашивали 6% ацетокармином, микроспороциты ячменя – ацетогематоксилином (1%) с железо-амонийными квасцами (0.5%). При необходимости перед окраской фиксированный материал ячменя подвергали мацерации в смеси целлюлазы и пектолиазы (2% + + 10%, соответственно) в течение 15–20 минут. Для визуализации и анализа поведения ядрышек в микроспороцитах ячменя использовали дифференциальное окрашивание нитратом серебра в

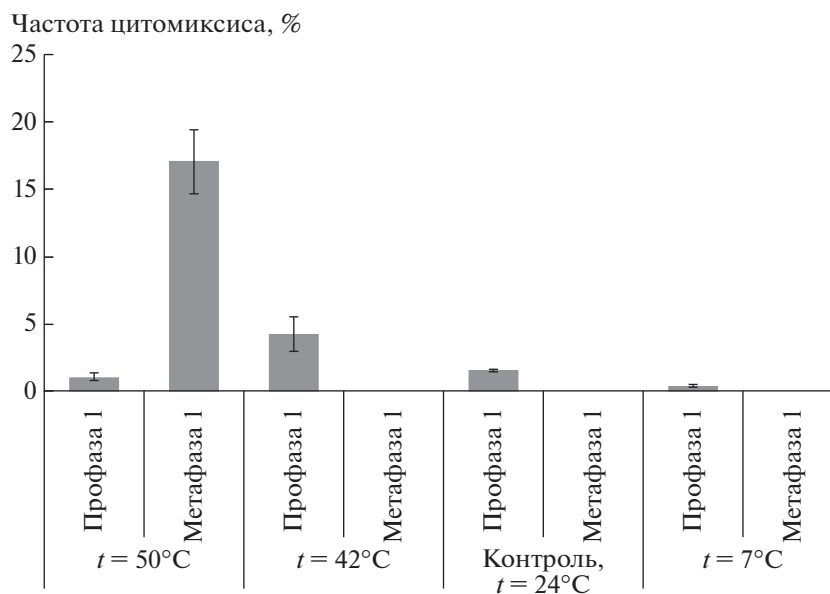


Рис. 1. Частота проявления цитомиксиса в микроспороцитах на стадиях первого деления мейоза (профаза и метафаза) у растений табака линии SR1 при различных режимах температурного воздействия.

сочетании с ацетогематоксилином или без него (Hizume et al., 1980). Давленные препараты микроспороцитов табака и ячменя готовили по общепринятой методике.

У табака анализировали пыльники из трех бутонов каждого растения, оценку частоты цитомиксиса проводили в 1500–2500 клеток. У ячменя для цитологического анализа использовали по 3–4 колоса из каждого варианта обработки, анализировали пыльники из 3-х–5-х колосков для каждого колоса. Частоту цитомиксиса в пыльниках ячменя оценивали на выборках из 150–600 клеток. Полученные данные на рис. 1 и 3 (диаграммы) представлены в виде средних значений частоты цитомиксиса (%) и соответствующих им ошибок среднего значения.

Препараты микроспороцитов ячменя анализировали с помощью светового и флуоресцентного микроскопов AxioStar и Axioskop (Zeiss); фотографии получали с использованием камеры AxioCam MRc5 (Zeiss) и программы Adobe Photoshop CS 2015. Препараты микроспороцитов табака анализировали на микроскопе Axioskop 2 plus (Zeiss), фотографии получали с использованием камеры AxioCam HRc (Zeiss). Программное обеспечение – AxioVision 4.7 (Zeiss).

Конфокальная микроскопия

Каллозные оболочки окрашивали красителем “Calcofluor White”* (Fluka, #18909) при 10-ти кратном разведении в 2× SSC буфере (0.3 M NaCl, 0.03 M citrate Na, pH 7.0). Хромосомы окрашивали PI (Propidium Iodide, Invitrogen, #P-3566). Пе-

ред окрашиванием PI пыльники обрабатывали DNase-free RNase в концентрации 100 мг/мл в 2× SSC буфере (0.3 M NaCl, 0.03 M citrate Na, pH 7.0) в течение 20 минут при 37°C. Микроскопирование каллозных оболочек, окрашенных “Calcofluor White”, проводили при длине волны 360 нм, а хромосом, окрашенных PI – при длине волны 535 нм. Для микроскопирования использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (LSM 780 NLO, Carl Zeiss). Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индукция цитомиксиса в микроспорогенезе табака

На рис. 1 представлены данные изменения частоты цитомиксиса в микроспороцитах растений табака при различных режимах температурного воздействия. Цитомиксис в микроспороцитах контрольных растений (24°C) выявлялся только на стадии профазы I с частотой $1.5 \pm 0.1\%$ (рис. 1). При снижении температуры до 7°C цитомиксис в микроспороцитах исследуемой линии табака также обнаруживался только на стадии профазы I (рис. 1). Однако частота его проявления при данных температуре и экспозиции была ниже, чем в норме и составила всего $0.3 \pm 0.1\%$.

При повышении температуры до 42°C частота цитомиксиса в микроспороцитах табака в профазе I мейоза несколько возросла и составила $4.2 \pm 1.3\%$ (рис. 1). Следует отметить, что при

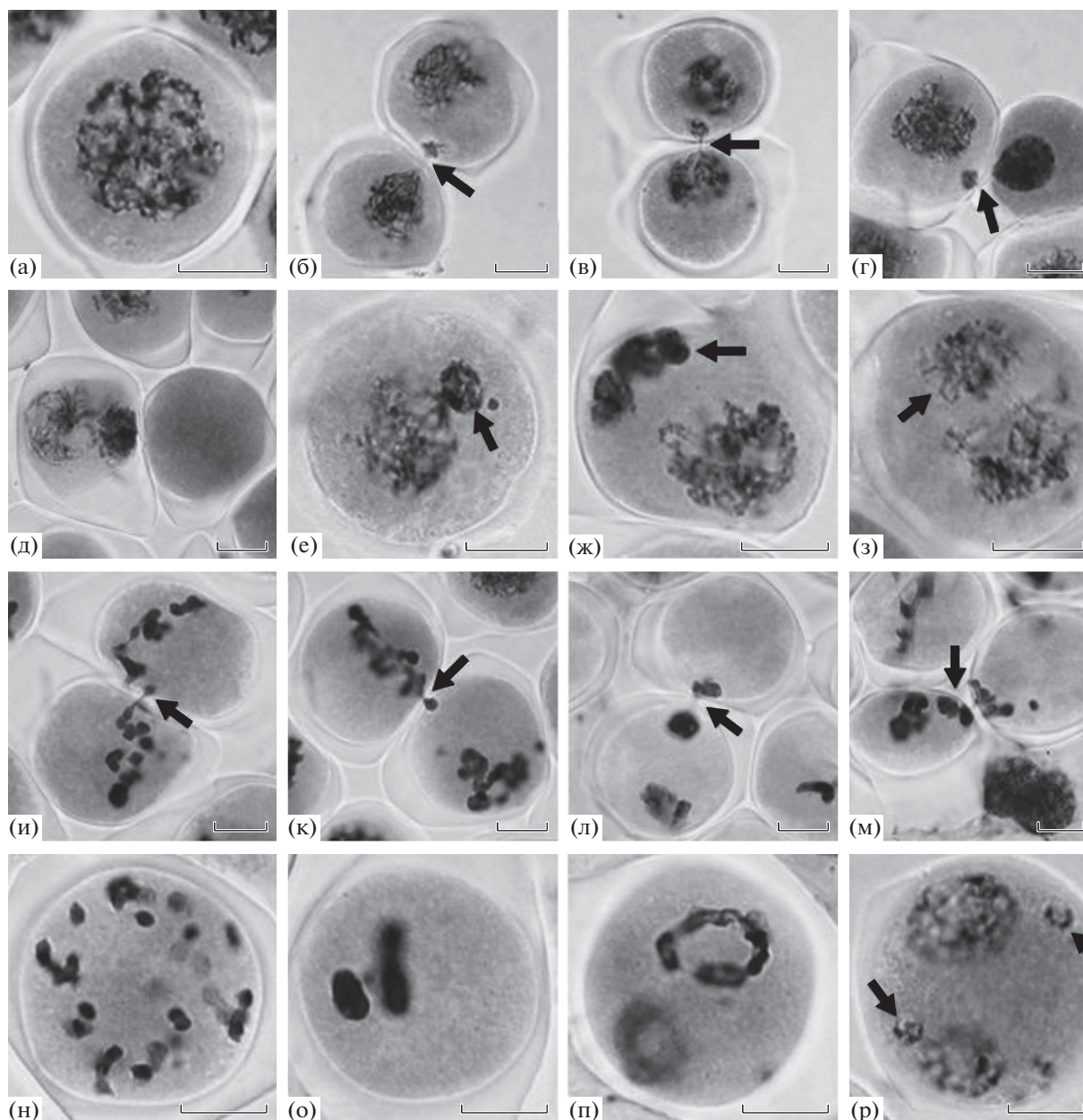


Рис. 2. Цитологическая картина цитомиксиса и его последствий в микроспороцитах растений табака после термообработки: а–з – микроспороциты на стадии профазы I; и–р – прометафазы I – интеркинеза; а – микроспороцит в норме; б–г – цитомиксис в микроспороцитах; д – перемещение целого ядра в реципиентную клетку и формирование цитопласта; е, ж – пикнотизированные микроядра в реципиентных клетках; з – микроядро с хроматином в степени конденсации соответствующей стадии средней профазы; и–м – цитомиксис на стадии прометафазы–метафазы I; и, к – перемещение хромосом по одиночному цитомиктическому каналу; л – образование цитопласта; м – перемещение хромосом по нескольким цитомиктическим каналам; н – нарушения формирования метафазной пластинки и веретена первого деления; о – слипание хромосом на стадии прометафазы I; п – слипание хромосом и образование кольцевидных структур в анафазе–телофазе I; р – микроспороцит на стадии интеркинеза с микроядрами. Обозначения: стрелками указаны перемещения хроматина и микроядра. Окрашивание: ацетокармин. Масштабная линейка 10 мкм.

этом температурном режиме цитомиксис на стадии метафазы I выявлялся лишь в единичных случаях.

Воздействие на растения табака температурой 50°C вело не только к увеличению частоты цитомиксиса до $17.0 \pm 2.4\%$, но и, в отличие от других

вариантов температурной обработки, к изменению стадии его максимального проявления от профазы I к прометафазе–метафазе I мейоза. Цитомиктические миграции хроматина в микроспороцитах растений, после высокотемпературного воздействия при 50°C, выявлялись и на ста-

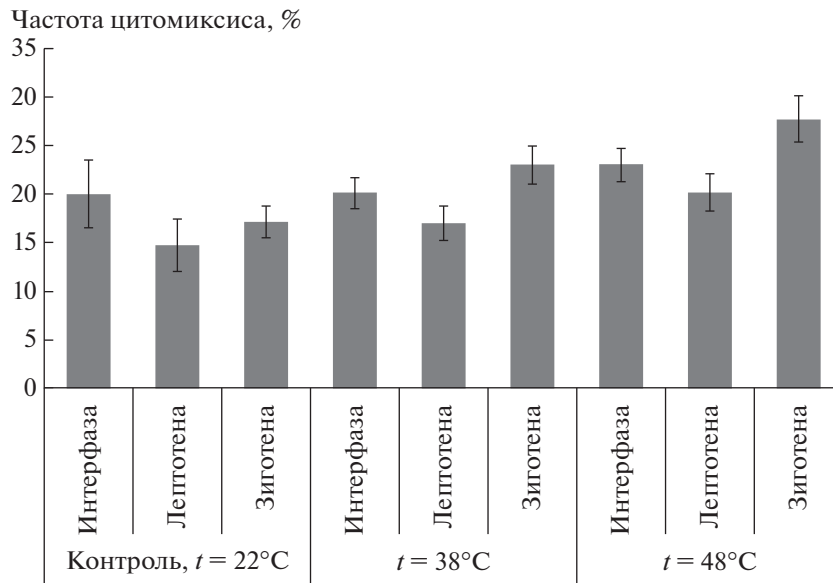


Рис. 3. Частота проявления цитомиксиса в предмейотической интерфазе и в профазе I микроспорогенеза у ячменя при различных режимах температурной обработки зерновок.

дии профазы I, однако, частота этого явления оставалась примерно на уровне контроля – 1.0 ± 0.3% (рис. 1).

Исследование цитологической картины цитомиксиса в микроспороцитах на стадии профазы первого деления мейоза у растений табака, после термообработки при 50°C, представлено на рисунке 2 (2а–2з). Как правило, профазное ядро занимало центральное положение в клетке (рис. 2а). При цитомиксисе оно смещалось к периферии клетки в направлении цитомиктического канала или каналов, объединяющих соседние микроспороциты (рис. 2б–2г). В проводимом нами исследовании в большинстве случаев перемещение ядер происходило по единичным цитомиктическим каналам (рис. 2б, 2в) и иногда сопровождалось пикнозом ядра донорной клетки (рис. 2г). В некоторых случаях ядро донорной клетки полностью перемещалось в реципиентную клетку, в результате чего формировался цитопласт (безъядерная клетка) и двуядерный микроспороцит (рис. 2д).

Наиболее часто детектируемыми последствиями цитомиксиса на стадии профазы I были микроядра, как пикнотизированные (рис. 2е, 2ж), так и со степенью конденсации хроматина, соответствующей ядру донорной клетки (рис. 2з). Наличие реципиентных микроспороцитов с несколькими микроядрами свидетельствовало о возможности миграции ядер по нескольким цитомиктическим каналам одновременно (рис. 2ж).

В результате стрессового воздействия на исследуемые растения температурой 50°C цитомиксис наблюдался как в профазе, так и метафазе

первого деления мейоза, причем на стадии метафазы I частота его проявления резко возрастала (рис. 1). Поскольку на стадии прометафазы I мейоза ядерная оболочка в микроспороцитах дезинтегрируется, в процесс цитомиксиса вовлекаются уже не ядра, а хромосомы (рис. 2и–2м). В подавляющем большинстве случаев на стадиях прометафазы-метафазы первого деления мейоза наблюдалось перемещение хромосом по одиночному цитомиктическому каналу (рис. 2и, 2к), при этом цитомиксис характеризовался высокой степенью выраженности, то есть большим числом переходящих хромосом, что приводило к образованию цитопластов (рис. 2л). В редких случаях наблюдалось массовое перемещение хромосом одновременно по нескольким цитомиктическим каналам (рис. 2м).

Следует подчеркнуть, что высокотемпературное воздействие помимо увеличения частоты проявления цитомиксиса оказывало отрицательное воздействие на структуру хромосом в прометафазе-метафазе и анафазе-телофазе первого деления мейоза, вызывая их слипание (рис. 2о, 2п). Отмечено отрицательное влияние высокой температуры также на процессы построения веретена деления (рис. 2н). Нарушения построения веретена деления приводило к аномальной сегрегации хромосом в анафазе I и, с большой долей вероятности, к образованию микроядер в телофазе I-интеркинезе (рис. 2р).

Таким образом, повышение температуры обработки растений табака приводило к смещению максимальной частоты проявления цитомиксиса

от стадии профазы к прометафазе-метафазе первого деления и сопровождалось нарушениями структуры и распределения хромосом в ходе мейоза, а также аномалиями динамики цитоскелета.

Индукция цитомиксиса в микроспорогенезе ячменя

Цитомиксис в микроспороцитах ячменя в норме быстротечен и наблюдается в премейотической интерфазе и на ранних стадиях (лептотена, зиготена) профазы мейоза (рис. 3). В контроле частота таких взаимодействий в интерфазе ($20.0 \pm 3.5\%$) была выше, чем в лептотене и зиготене профазы мейоза (14.7 ± 2.7 и $17.1 \pm 1.7\%$, соответственно). После термообработки зерновок у растений ячменя на стадии микроспорогенеза прослеживалась следующая тенденция: с увеличением температуры обработки повышалась частота цитомиктических взаимодействий и в интерфазе и на исследуемых стадиях профазы мейоза, со смещением максимума этих взаимодействий к зиготене (рис. 3). Соответственно, максимальная частота цитомиктических событий в микроспорогенезе растений ячменя наблюдалась в варианте с тепловой обработкой в 48°C , достигая $23.0 \pm 1.7\%$ (115% от контроля) в премейотической интерфазе, $20.1 \pm 1.9\%$ (136% от контроля) в лептотене и $27.7 \pm 2.4\%$ (162% от контроля) в зиготене (рис. 3).

Таким образом, в микроспороцитах ячменя температурный стресс индуцировал повышение частоты цитомиксиса и смещение его максимума с премейотической интерфазы к зиготене профазы.

В цитологической картине цитомиксиса в микроспорогенезе ячменя можно было выделить два основных типа межклеточных цитомиктических взаимодействий: “петельный” и “капельный”, которые с разной частотой встречались как в контроле, так и в опытных вариантах. При “петельном” типе взаимодействий в интерфазе, лептотене или зиготене часть хромосом в ядрах микроспороцитов “расплеталась” и выбрасывалась (выпетливалась) навстречу ядру соседней клетки (рис. 4а–4в), обеспечивая прямые парные взаимодействия ядер, посредством ядерных “мостиков” (рис. 4в). Наиболее вероятным следствием такого парного ядерного взаимодействия было включение в состав реципиентного ядра цитомиктического хроматина, в состав которого могло входить и ядрышко из ядра донорской клетки, причем, цитомиктический хроматин мог входить в состав ядра клетки-реципиента, сохраняя свою обособленность (рис. 4ж).

Характерным признаком начала цитомиктических контактов являлась поляризация клетки — смещение ядра на периферию к месту расположения цитомиктического канала (каналов) с последующим перемещением хроматина (рис. 4д). Ядра микроспороцитов, не участвовавшие в цитомик-

сисе, сохраняли центральное положение в клетке и обычную зиготенную структуру (рис. 5ж). Иногда наблюдались микроспороциты, у которых выпетливания хроматиновых нитей навстречу друг другу происходили без парной поляризации ядер (рис. 4г). Интересен тот факт, что даже при стандартных методах фиксации и окрашивания в микроспороцитах вокруг мигрирующего хроматина иногда выявлялась светлая зона, образованная ядерной оболочкой, которая отграничивала хроматин от цитоплазмы (рис. 4е). Это указывало на то, что хроматин между микроспороцитами ячменя мигрировал в составе ядра.

Если “петельный” тип цитомиксиса доминировал у контрольных растений, то в опытных вариантах с термоиндукцией преобладал “капельный” (посредством микроядер) тип взаимодействия. Мигрирующий хроматин в ядрах цитомиктических микроспороцитов формировал “капельные” структуры, которые в виде микроядер “запускались” в миграцию по одному или нескольким цитомиктическим каналам (рис. 4з–4л). При этом, наряду с парными контактами (рис. 4з), формировались сложные варианты цепочечных взаимодействий, в которых одна клетка, сама являясь донором, могла одновременно служить реципиентом для нескольких соседних (рис. 4и, 4к). В цитомиксисе могло вовлекаться до 12 и более микроспороцитов, формировавших многоклеточные кластеры (рис. 4к, 4л). Интересно отметить, что при “капельном” взаимодействии собственное ядро микроспороцита-реципиента обычно дистанцировалось от мигрирующего генетического материала, что наиболее заметно при образовании цепочечных контактов (рис. 4л).

В цепочечных взаимодействиях микроядра перемещались по клеткам, создавая впечатление, что объем убывающего хроматина компенсировался входящим, в результате чего цепочечные контакты характеризовались очевидным продольным градиентом цитомиксиса (рис. 4к, 4л). Микроядра цитомиктического хроматина, в одних случаях, сохраняли тонкий хромосомный скелет, даже пройдя через цитомиктический канал (рис. 4з), в других подвергались компрессии (рис. 4и–4л). При “капельном” типе цитомиксиса, также как и при “петельном”, в составе хроматина могло мигрировать ядрышко (или его часть), которое, несмотря на сильное сжатие в цитомиктическом канале, восстанавливало свою структуру в составе микроядра (рис. 4и). Участие ядрышек в цитомиктических миграциях свидетельствует о сохранении функциональной активности транзитного хроматина и его вероятный вклад в белковый синтез клеток-реципиентов.

В пахитене у ячменя цитомиксис, в большинстве случаев, прекращался, а поляризованное ядро после парных контактов возвращалось на

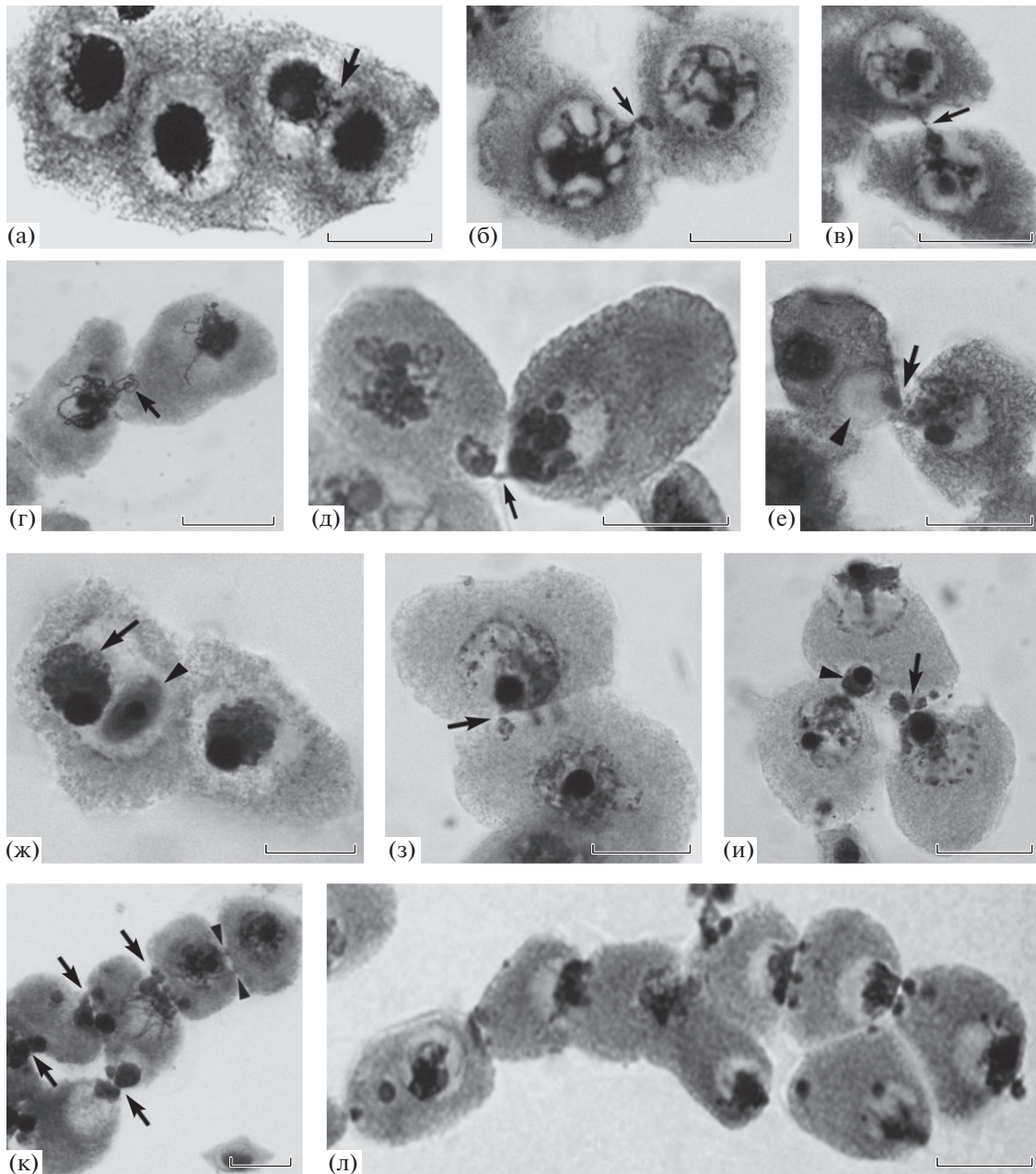


Рис. 4. Парные “петельные” и “капельные” взаимодействия в лептотене-зиготене мейоза у растений ячменя в контроле (а–г) и после термообработки (д–л): а–г — “петельные” ядерные взаимодействия в премейотической интерфазе (а), лептотене (б, в), зиготене (г); д, е — поляризация клетки и транслокация ядра; ж — индивидуализация цитомиктического хроматина в составе ядра клетки-реципиента в зиготене профазы (длинная стрелка — собственный хроматин в ядре реципиентной клетки, короткая стрелка — цитомиктический хроматин с ядрышком); з–л — типы “капельного” взаимодействия: з — перемещение хроматина по нескольким цитомиктическим каналам одновременно с формированием трех микроядер; и — одна клетка является реципиентом для двух других и донором для следующей; к, л — цепочечные цитомиктические взаимодействия вдоль продольного градиента в пыльнике. Обозначения: стрелками указаны перемещения хроматина и микроядра. Окрашивание: ацетогематоксилин (а–е, к, л), ацетогематоксилин + нитрат серебра (ж), нитрат серебра (з–и). Масштабная линейка 10 мкм.

свою прежнюю позицию в центре микроспорозита, продолжая мейотическое деление. Судьбу микроядер, сформировавшихся в результате “капельного” цитомиксиса, проследить трудно. Вполне возможно, что одна часть микроядер

элиминировалась в ходе последующих стадий мейоза, а другая — объединялась с ядром донорной клетки, компенсируя потерю хроматина, либо служила для ядер источником “экстра” — хроматина (рис. 4ж).

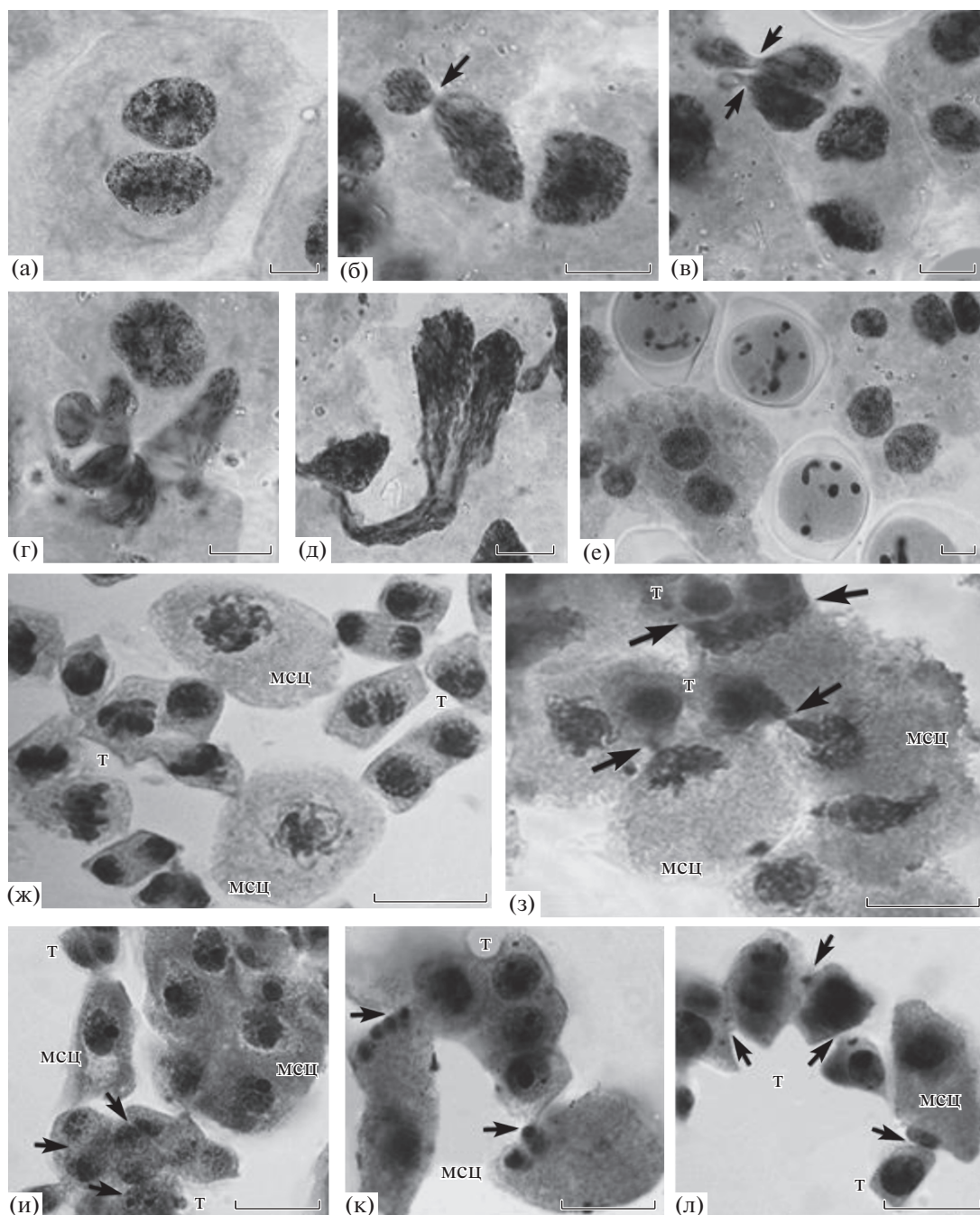


Рис. 5. Влияние термообработки на индукцию цитомиксиса в тапетуме и на цитомиктические взаимодействия между клетками тапетума и микроспороцитами у табака (а–е) и ячменя (ж–л). а – двуядерная клетка тапетума табака; б, в – цитомиктическая миграция ядер между клетками тапетума табака; г, д – формирование хроматиновых тяжей; е – отсутствие цитомиктических контактов между клетками тапетума и микроспороцитами табака; ж, и – микроспороциты и клетки тапетума в пыльниках ячменя без термоиндукции; з, к, л – микроспороциты и клетки тапетума в пыльниках ячменя после термоиндукции. Окрашивание: ацетокармин. Обозначения: мсц – микроспороциты; т – тапетум; стрелками указаны цитомиктические взаимодействия. Масштабная линейка 10 мкм.

Индукция цитомиксиса в клетках тапетума

В пыльниках табака к прометафазе мейоза тапетум состоит преимущественно из двуядерных клеток, границы которых иногда трудно определить (рис. 5а). В норме у табака цитомиксис в

клетках тапетума – явление редкое, тем не менее, термообработка (50°C) вела к повышению частоты его проявления и интенсификации процесса межклеточных взаимодействий в данном типе ткани (рис. 5б–5д). Цитологическая картина ци-

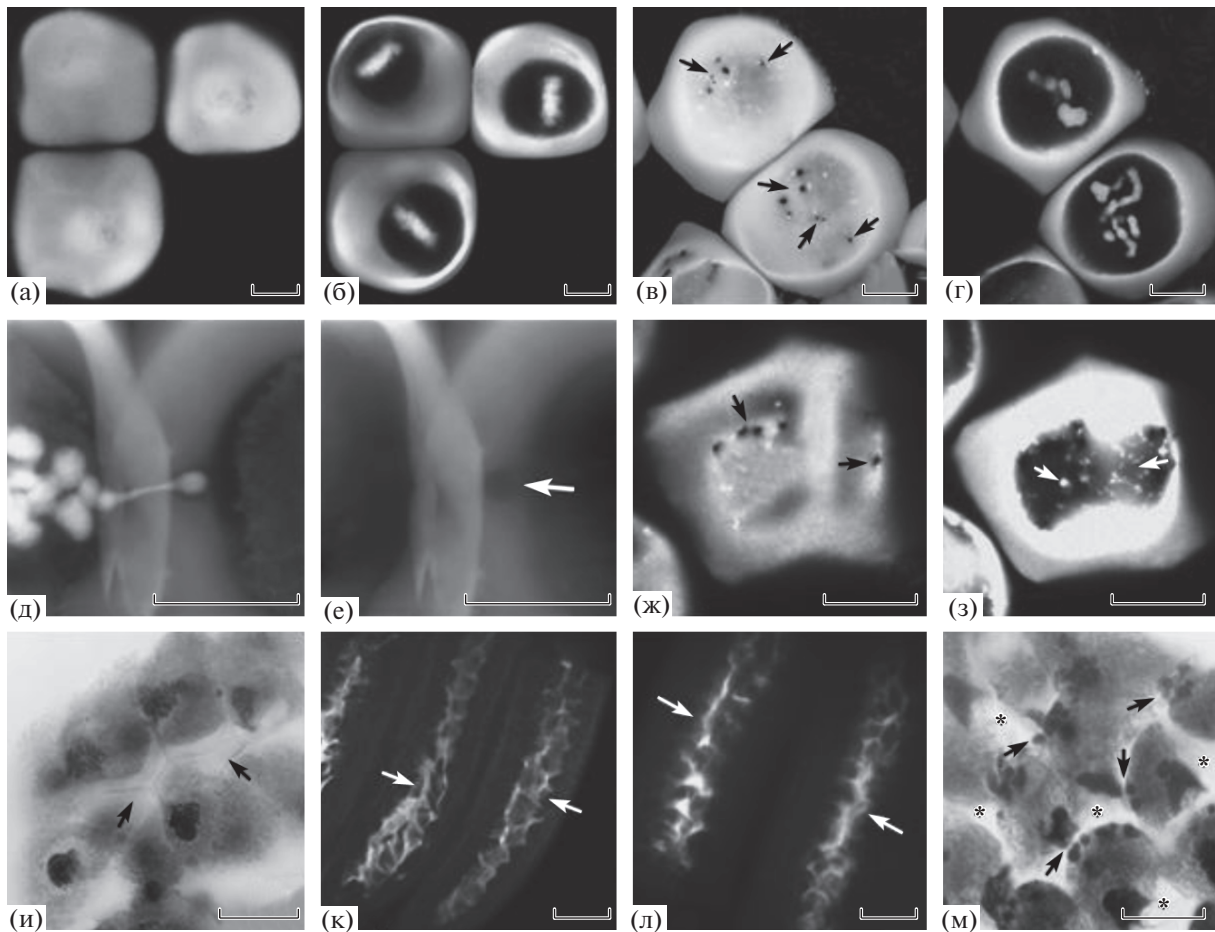


Рис. 6. Каллозные оболочки и цитомиктические каналы в микроспороцитах табака (а–з) и ячменя (и–м) в норме и при термообработке: а, б – норма (контроль, SR1, без термообработки), а – поверхность каллозной оболочки микроспороцитов на стадии метафазы I, крупные цитомиктические каналы отсутствуют; б – те же самые клетки, более глубокий оптический срез, показаны метафазные пластинки; в–з – микроспороциты растений после термообработки (50°C), в – поверхность каллозных оболочек в прометафазе – метафазе I, указаны кластеры цитомиктических каналов; г – те же самые клетки, более глубокий оптический срез, хромосомы на стадии соответствующей прометафазе – метафазе I; д – миграция бивалента на стадии прометафазы I по цитомиктическому каналу; е – каллозные оболочки соседних клеток, указан цитомиктический канал, по которому происходит миграция бивалента (д); ж – поверхность каллозной оболочки микроспороцита на стадии метафазы I, указаны цитомиктические каналы; з – та же самая клетка, более глубокий оптический срез, указаны скопления каллозных везикул под каллозной оболочкой; и, к – каллозные гребни в норме; л, м – каллозные гребни в варианте с термообработкой; м – активизация цитомиксиса в микроспороцитах ячменя. Обозначения: стрелками указаны цитомиктические каналы (в, е, ж) и скопления каллозных везикул (з), каллозные гребни (и–м), звездочками – отложения каллозы при интенсификации цитомиксиса (м). Конфокальная микроскопия (а–з), световая микроскопия (и, м), флуоресцентная микроскопия (к, л). Масштабная линейка 10 мкм.

томиксиса в клетках тапетума табака была представлена двумя типами изменений в форме мигрирующих ядер. В части клеток ядра мигрировали, приобретая характерную гантелевидную форму с перетяжкой в месте прохождения по цитомиктическим каналам (рис. 5б, 5в). В другой части клеток наблюдалось массовое формирование хроматиновых тяжей различной степени выраженности (рис. 5г, 5д), что служило маркером деструктивного цитомиксиса, сопровождавшегося интенсивной миграцией ядер в прилегающей части генеративной ткани пыльника и последую-

щей деградацией таких клеток. Как правило, клетки тапетума колокализовались с группами микроспороцитов (рис. 5е), однако, перемещения ядер из клеток тапетума в микроспороциты и наоборот никогда не наблюдалось.

В пыльниках ячменя в ранней профазе мейоза в клетках тапетума завершаются эндомитозы (рис. 5ж), и концу зиготены они становятся двудерными. Как в контроле (рис. 5и), так и в варианте с термообработкой (рис. 5з, 5к, 5л), наблюдаются цитомиктические взаимодействия внутри тапетума и между клетками тапетума и микроспо-

роцитами, которые коррелируют с активностью цитомиксиса в микроспороцитах и, по-видимому, являются нормой для ячменя. Обычно в тапетуме, синхронно с активизацией цитомиксиса в микроспороцитах, можно было наблюдать различные формы ядерных слияний (рис. 5и–5л). В межклеточных взаимодействиях клетки тапетума преимущественно выполняют роль акцепторов хроматина (рис. 5з).

Каллозная оболочка при термообработке

Необходимым условием цитомиксиса является наличие между микроспороцитами открытых цитомиктических каналов, по которым происходит миграции ядер и хроматина. В микроспорогенезе высших растений количество и активность таких каналов регулируется отложениями каллозы.

У табака формирование каллозной оболочки начинается уже в ранней профазе первого деления мейоза, а к стадии метафазы I она перекрывает большую часть цитомиктических каналов, максимально отделяя микроспороциты друг от друга и от слоя питающей ткани, тапетума (рис. 5е, рис. 6а, 6б). Повышение частоты цитомиксиса при термоиндукции в промета- и метафазе I позволило предположить возможную связь этого явления с изменениями в механизме формирования каллозной оболочки и/или динамики цитомиктических каналов на данных стадиях мейоза. Исследование микроспороцитов в контроле выявило практически полное отсутствие цитомиктических каналов в каллозной оболочке на стадиях промета- и метафазы I (рис. 6а, 6б). На тех же стадиях мейоза в каллозных оболочках микроспороцитов у термообработанных растений табака обнаруживались многочисленные цитомиктические каналы (рис. 6в, 6г). Это давало бивалентам возможность миграции из одного микроспороцита в другой (рис. 6д, 6е). Распределение цитомиктических каналов в каллозной оболочке имело тенденцию к кластеризации, то есть к образованию групп (рис. 6в, 6ж). Необходимо отметить, что многочисленные кластеры цитомиктических каналов обнаруживались и на более поздних стадиях мейоза.

Исследование серии оптических срезов микроспороцитов табака, подвергнутых тепловой обработке, позволило выявить внутри них скопления гранул, флуоресцирующих в спектре, характерном для каллозы (рис. 6ж, 6з). Эти гранулы представляли собой каллозные везикулы, находившиеся непосредственно под каллозной оболочкой. В клетках контрольных растений ничего подобного не наблюдалось (рис. 6а, 6б). Вероятно, скопление свободных содержащих каллозу везикул было вызвано нарушением их интеграции в состав каллозной оболочки в результате теплового стресса, что в свою очередь привело к

появлению большого количества открытых цитомиктических каналов, на той стадии мейоза, когда они должны быть закрыты отложениями каллозы.

У ячменя синтез каллозы в микроспорогенезе имеет собственную специфику. С началом микроспорогенеза каллоза откладывается на оболочке микроспороцитов асимметрично: в направлении полости пыльника ее толщина возрастает, формируя так называемые каллозные гребни; а со стороны тапетума она в норме отсутствует (рис. 6и, 6к). С интенсификацией цитомиксиса после тепловой обработки, каллозные гребни, как правило, утолщаются, отложения каллозы становятся более нерегулярными и неравномерными (рис. 6л, 6м). Однако, в целом, динамика отложения каллозы незначительно отличалась от таковой в контрольном варианте. Хотя каллозная оболочка затрудняет межклеточный обмен, ее утолщение не является непреодолимым препятствием для миграции ядер по цитомиктическим каналам, особенно с интенсификацией цитомиксиса (рис. 6м).

ОБСУЖДЕНИЕ

В современной научной литературе представлено всего несколько работ, посвященных проблеме индукции цитомиксиса в микроспорогенезе путем воздействия на растения мутагенами или γ -излучением (Bhat et al., 2006; Rai et al., 2010; Srivastava, Kumar, 2011; Kumar, Yadav, 2012; Kumar, Srivastava, 2013). В этих экспериментах авторам удалось индуцировать в основном только формирование цитоплазматических мостов между микроспороцитами, а также их прямые слияния. Однако в исследовании, проведенном на ячмене двурядном (*H. distichum* L.) было достоверно показано влияние УФ и γ -излучения на интенсификацию ядерных миграций в микроспороцитах на стадии ранней профазы, а также сопутствующую этому процессу гиперсекрецию каллозы (Kravets, 2011, 2013).

Исследований, посвященных влиянию температурного стресса на индукцию собственно цитомиксиса, в научной литературе немного. В основном они касаются влияния летних повышенных температур, совместно с засухой, на состояние репродуктивной системы растений. Высокие температуры индуцировали появление цитомиксиса в микроспорогенезе у ряда видов (de Souza, Pagliarini, 1997; Malallah, Attia, 2003; Kumar, Tripathi, 2009; Pecrix et al., 2011; Mandal et al., 2013). Так, температурный стресс (36°C, в течение 48 ч) у нескольких видов рода *Rosa* на этапе формирования репродуктивных побегов обуславливал появление аномалий мейоза, таких как нарушения сегрегации хромосом, формирования и ориентации веретен деления, и, в том числе, цитомиксис (Pe-

crix et al., 2011). У *Corchorus fascicularis* воздействие температурой выше 39°C приводило к интенсификации цитомиксиса и связанных с ним аномалий мейоза. Причем, эти аномалии ограничивались лишь первым делением мейоза и не снижали уровня фертильности пыльцы (Mandal et al., 2013). Гипертермия может влиять на конформацию хроматина и формирование хромосом и бивалентов в профазе мейоза, вызывая типичные для цитомиксиса нарушения в ходе мейоза (Kumar, Tripathi, 2009).

Как показывают наши исследования, термообработка растений табака (50°C), приводила к увеличению уровня цитомиксиса со сдвигом максимальной частоты его проявления от профазы к метафазе первого деления. Термообработка зерновок ячменя (48°C) способствовала активизации цитомиксиса, смещению его максимума от предмейотической интерфазы к зиготене, а также к изменению характера цитомиктических взаимодействий от парных “петельных” до сложных цепочечных контактов “капельного” типа. Возможно, термообработка также увеличивала продолжительность зиготены. Последнее представляется весьма вероятным, поскольку воздействию высоких температур на растения ячменя может приводить к преждевременному началу профазы первого деления мейоза (Oshino et al., 2007). Несмотря на заметное возрастание частоты цитомиксиса в зиготене, на последующих стадиях мейоза уровень цитомиксиса у растений ячменя не превышал спонтанный (контроль).

Пониженные температуры также могут индуцировать цитомиксис и связанные с ним аномалии. Так, у пшеницы понижение температуры до 0–2°C в период колошения ведет к повышению уровня цитомиксиса на стадии профазы от 1.6% (контроль) до 11.3% (Barton et al., 2014). Однако, согласно полученным нами данным, понижение температуры воздействия на такой теплолюбивый вид как *N. tabacum* до 7°C не приводило к повышению уровня цитомиксиса на какой-либо стадии мейоза.

Цитологическая картина цитомиктических взаимодействий между микроспорами табака при термоиндукции, как в профазе, так и метафазе первого деления мейоза, в целом совпадала с той, что была показана для случаев его спонтанного проявления (Сидорчук и др., 2007; Mursalimov, Deineko, 2015). Она усложнялась лишь дополнительными нарушениями, такими как слипание хромосом, нарушение их сегрегации, а также аномалиями динамики цитоскелета, возникающими в ответ на температурные воздействия.

В более ранних работах по исследованию цитомиксиса у злаков было дифференцировано три типа цитомиктических взаимодействий между

микроспорами: слабые (“петельные”), интенсивные и деструктивные (Кравец и др., 2009; Kravets, 2013). Предполагалось, что “петельные” взаимодействия являются типичными для спонтанного цитомиксиса, и для ячменя являются физиологической нормой. “Петельные” цитомиктические взаимодействия, по-видимому, свойственны злакам, поскольку аналогичная цитологическая картина наблюдалась в мейозе пырея и пшенично-пырейных гибридов (Li et al., 2009). Однако в мейозе термообработанных растений ячменя были выявлены клетки, в которых “петельные” взаимодействия вели к образованию ядерных “мостиков” между ядрами донорных и реципиентных клеток, как это было показано для растений табака (Mursalimov, Deineko, 2011). Прямым следствием такого взаимодействия могло быть перемещение добавочного хроматина в ядро реципиентной клетки.

“Капельный” тип цитомиктических взаимодействий, то есть с участием микроядер, в микроспорогенезе ячменя при термообработке превалировал над “петельным”. При этом, возрастала степень активности цитомиксиса с образованием сложных цепочечных контактов между микроспорами, позволяющих проследить продольный градиент цитомиксиса. При “капельном” взаимодействии собственное ядро микроспоры обычно дистанцируется от чужеродного генетического материала. Возможно, его просто механически относит к стенке возросшим тургором цитоплазмы. Это позволяет предположить, что цепочечные взаимодействия выравнивают тургорное неравновесие между микроспорами. Весьма интересно отметить, что цепочечные взаимодействия с очевидным продольным градиентом ядерных миграций являются характерными и для интенсивного цитомиксиса в микроспорогенезе растений табака в случаях его спонтанного проявления (Сидорчук и др., 2007). Однако в микроспорогенезе термоиндуцированных растений ядерные или хромосомные миграции с образованием цепочек клеток не выявлялись. Причины этого не вполне понятны.

Температурный стресс может воздействовать на микроспорогенез и опосредованно, например, через тапетум. Тапетум – питающая ткань, непосредственно контактирующая с микроспорами, от физиологического состояния и активности которой напрямую зависит развитие микроспор, молодых микроспор и в целом фертильность мужской генеративной сферы (Scott et al., 2004; Feng, Dickinson, 2010; Zhang et al., 2011; Zhang, Yang, 2014). Согласно современным представлениям, тапетум весьма чувствителен к воздействию внешних стрессовых факторов, в том числе и температурных (Parish et al., 2012; De Storme, Geelen, 2014). Установлено, что воздействие на растения теплового стресса, ведет к преждевре-

менной деградации клеток тапетума и мужской стерильности (Ku et al., 2003; Abiko et al., 2005; Oshino et al., 2007; Harsant et al., 2013). Понижение температуры культивирования растений до уровня, соответствующего холодному стрессу, ведет к задержке процесса естественной деградации тапетальной ткани и формированию abortивной пыльцы (Oda et al., 2010). На клеточном уровне стрессовые повреждения тапетума могут проявляться в виде значительной вакуолизации, деградации цитоплазмы, гипертрофии митохондрий, или формирования ядер чрезмерно высокого уровня пloidности в результате нарушений анафазного расхождения хромосом (Ku et al., 2003; Oshino et al., 2007; Lavania et al., 2014). Однако информации о влиянии стрессовых температур на проявление цитомиксиса в клетках тапетума в современной научной литературе не представлено. В проведенных нами исследованиях усиление межклеточных ядерных миграций в тапетуме у табака и ячменя было одним из очевидных последствий термоиндукции цитомиксиса. У ячменя с активизацией цитомиксиса в микроспороцитах, синхронно, наблюдалось и усиление взаимодействий между микроспороцитами и клетками тапетума, а также внутри тапетума с образованием синцитиев и многоядерных конгломератов. Анализ цитомиктической миграции хроматина на световом уровне указывал на то, что, в большинстве случаев, акцепторами перемещающегося хроматина были клетки тапетума. Вероятно, таким образом, через клеточную конкуренцию, устраняются избыточные и поврежденные микроспороциты.

Исследования последних лет выявили ведущую роль молекулярных регуляторов и сигнальных молекул, таких как рецептор-подобные киназы, гликопротеины, транскрипционные факторы, гормоны, в обеспечении двунаправленных структурных и метаболических связей между тапетальной и спорогенной тканью на всех этапах микроспорогенеза (Zhao et al., 2002; Feng, Dickinson, 2010; Zhang et al., 2011; Zhang, Yang, 2014). Вполне возможно, что стрессовые воздействия на такие молекулярные регуляторы могут активировать межклеточные цитомиктические взаимодействия, хотя причины и значение этого явления не вполне понятны. Отсутствие межклеточных цитомиктических взаимодействий в микроспорогенезе табака в ответ на стрессовое воздействие свидетельствует, вероятно, о лучшей сбалансированности и устойчивости процессов дифференциации генеративной и соматической тканей пыльника. На субклеточном уровне, раннее образование каллозной оболочки микроспороцитов может способствовать ограничению клеточных контактов между тапетальной и спорогенной тканью в пыльниках табака (Mursalimov, Deineko, 2012).

Замещение первичной клеточной стенки микроспороцитов каллозной оболочкой является

особенностью микроспорогенеза растений (Scott et al., 2004). Известно, что функции каллозы в генеративной сфере растений очень многообразны. Она действует как молекулярный фильтр, несет защитную, влагосберегающую и изолирующую функции, локализирует распространение цитолитических процессов, участвует в углеводном метаболизме, обеспечивая микроспоры углеводами, и входит в состав экзины (Барская, Балина, 1971; Pacini, 1994; Nishikawa et al., 2005). Нарушение синтеза каллозы рассматривается как один из механизмов возникновения отклонений в микроспорогенезе и формировании пыльцевых зерен при воздействии стресса (Lalonde et al., 1997; Mamun et al., 2006). В ходе мейоза каллоза закрывает существующие плазмодесмы и цитомиктические каналы и изолирует микроспороциты друг от друга к началу метафазы первого деления, регулируя таким образом динамику межклеточных контактов (Wang et al., 2002; Mursalimov, Deineko, 2012). Этот процесс обеспечивается эндоплазматическим ретикулумом, продуцирующим заполненные каллозой везикулы, которые посредством экзоцитоза добавляют каллозу между плазмалеммой и первичной клеточной стенкой (Mursalimov, Deineko, 2012).

Выявленные нами в микроспороцитах термообработанных растений свободные каллозные везикулы, вероятно, являлись результатом нарушений процесса их включения в формирующуюся оболочку. Однако следует отметить, что эти нарушения не были фатальными, поскольку каллозная оболочка все равно формировалась, что подтверждалось данными как рутинной световой, так и конфокальной микроскопии. Разница состояла лишь в том, что ослабление синтеза или интеграции каллозы под воздействием повышенной температуры вело к неполному закрытию цитомиктических каналов на стадии прометафазы-метафазы I. Это, в свою очередь, увеличивало возможности миграции хромосом на продвинутых стадиях мейоза. Весьма интересно отметить, что, несмотря на кластерное распределение цитомиктических каналов в каллозной оболочке, миграция ядер и хромосом в микроспороцитах термоиндуцированных растений табака происходила чаще всего по единичному каналу. Это позволяет предположить, что наличие открытых цитомиктических каналов является условием необходимым, но не достаточным для инициации межклеточных перемещений.

У ячменя, как и у большинства злаков, с началом микроспорогенеза каллоза откладывается на микроспороцитах асимметрично, формируя так называемые гребни. Показано, что ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост патологий мужской репродуктивной сферы, и в том числе гиперсекрецию каллозы в стенке микроспороцитов (Kravets, 2013).

Предполагалось, что каллозные отложения ограничивают распространение литического процесса в пыльнике. В данной работе термообработка зерновок ячменя не приводила к появлению значительных отклонений в процессе формирования каллозных оболочек микроспороцитов. Образование каллозных гребней между микроспороцитами не являлось препятствием для цитомиксиса, о чем свидетельствовало наличие цитомиктических каналов в толще каллозных отложений. Происхождение этих каналов: сформировались ли они в ходе естественного процесса или являлись результатом каких-либо воздействий на динамику отложения каллозы, обусловленных температурным воздействием, остается пока неизвестным. По-видимому, каллозная оболочка не столько блокирует, сколько ограничивает и/или регулирует цитомиктическую миграцию, являясь условием индивидуализации микроспороцитов — их отделения от соматических тканей и переключения программы развития.

Метаболизм каллозы в ходе микроспорогенеза находится под весьма сложным генетическим контролем как со стороны клеток тапетума, так и со стороны самих микроспороцитов, а также общих по отношению к ним регуляторов экспрессии таких генов, как например, ген *cdm1* арабидопсиса (Lu et al., 2014). Нарушения синтеза и гидролиза каллозы в условиях абиотического стресса могут быть результатом отклонений в общем углеводном обмене, как было отмечено на основе анализа генной экспрессии у стерильных и фертильных линий риса (Kong et al., 2007). Вполне возможно, что в проведенных нами экспериментах температурный стресс мог влиять на экспрессию генов, детерминирующих ферментативные процессы синтеза и/или гидролиза каллозы. Однако это предположение требует проведения дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Термообработка повышенными температурами в период бутонизации табака (50°C) приводила к значительному увеличению частоты цитомиксиса и смещению его максимума с зиготены-пахитены профазы на прометафазу-метафазу первого деления мейоза, а также к активизации цитомиксиса в клетках тапетума. Под воздействием теплового стресса в микроспороцитах табака нарушалась интеграция содержащих каллозу везикул в состав каллозной оболочки. Холодовая обработка в использованном режиме (7°C) не оказала влияния на изменение частоты цитомиксиса. Термообработка зерновок ячменя (48°C) также способствовала активизации цитомиксиса, смещению его максимума от предмейотической интерфазы к зиготене, а также к смене характера цитомиктических взаимодействий с “петельно-

го” на “капельные”. У ячменя с активизацией цитомиксиса формировались сложные варианты цепочечных взаимодействий микроспороцитов, в которых одна клетка одновременно служила донором для одних клеток и реципиентом для нескольких других. Термообработка активизировала цитомиктические взаимодействия и внутри тапетума, а также между микроспороцитами и тапетумом. Отсутствие цитомиктических взаимодействий между микроспороцитами и тапетумом у табака, вероятно, отражает лучшую сбалансированность процессов дифференциации соматических и генеративных тканей микроспорангия по сравнению с ячменем. Значительного влияния термообработки в использованном режиме на синтез каллозной оболочки в микроспороцитах ячменя отмечено не было. Показано, что каллозная оболочка ограничивает и регулирует цитомиктическую миграцию в пыльнике. Тепловой стресс влияет на метаболизм каллозы и ее интеграцию в состав формирующейся оболочки, что может приводить к неполному перекрытию цитомиктических каналов к завершению профазы I. Это, в свою очередь, способствует миграции хромосом на продвинутых стадиях мейоза. Следовательно, в механизмах термоиндукции цитомиксиса могут быть задействованы гены, детерминирующие ферментативные процессы синтеза и/или гидролиза каллозы.

Работа выполнена при поддержке проекта “Изучение формирования и функционирования цитомиктических каналов в вегетативных и генеративных клетках растений” в рамках совместного конкурса научных проектов НАН Украины и Российского Фонда Фундаментальных Исследований 2014–2015 г. (грант НАН Украины № 46-04-14 и грант РФФИ № 14-04-90414-Укр_а для российской стороны). Работа также была частично поддержана бюджетным проектом № 0324-2015-0005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барская Е.И., Балина Н.В. О роли каллозы в пыльниках растений // Физиология растений. 1971. Т. 18. № 4. С. 716–721.
- Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений / А.П. Генкель. — М.: Наука, 1982. 279 с.
- Кравец Е.А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов у *Hordeum distichum* L. при воздействии облучения // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 1. С. 11–22.
- 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. Т. 49. № 10. С. 870–875.
- Abiko M., Akibayashi K., Sakata T. et al. High-temperature induction of male sterility during barley (*Hordeum vulgare* L.) anther development is mediated by transcrip-

- tional inhibition // *Sex Plant Reprod.* 2005. V. 18. P. 91–100.
- Barton D.A., Cantrill L.C., Law A.M.K. et al. Chilling to zero degrees disrupts pollen formation but not meiotic microtubule arrays in *Triticum aestivum* L. // *Plant Cell Env.* 2014. doi 10.1111/pce.12358
- Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. // *J. Hered.* 2003. V. 94. P. 512–516.
- Bhat T.A., Parveen S., Khan A.H. MMS-induced cytomixis in pollen mother cells of broad bean (*Vicia faba* L.) // *Turk. J. Bot.* 2006. V. 30. P. 273–279.
- Dagne K. Meiosis in interspecific in *Guizotia* Cass. (Compositae) // *Hereditas.* 1994. V. 121. P. 119–129.
- De Souza A.M., Pagliarini M.S. Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae) // *Cytologia.* 1997. V. 62. P. 25–29.
- De Storme N., Copenhaver G.P., Geelen D. Production of diploid male gametes in arabidopsis by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays // *Plant Physiology.* 2012. V. 160. P. 1808–1826.
- De Storme N., Geelen D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms // *Plant, Cell and Environment.* 2014. V. 37. P. 1–18.
- Feng X., Dickinson H.G. Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the Arabidopsis anther // *Development.* 2010. V. 137. P. 2409–2416.
- Fuentes I., Stegemann S., Golczyk H. et al. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species // *Nature.* 2014. V. 511. № 7508. P. 232–235.
- Giorno F., Wolters-Arts M., Mariani C. et al. Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen // *Development Plants.* 2013. V. 2. P. 489–506.
- Harsant J., Pavlovic L., Chiu G. et al. High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon* // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. № 10. P. 2971–2983.
- Hizume M., Sato S., Tanaka A. A highly reproducible method of nucleolus organizer regions staining in plants // *Stain Technol.* 1980. V. 55. № 2. P. 87–90.
- 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.
- Kong J., Li Z., Tan Y.P. et al. Different gene expression patterns of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of rice // *Physiol. Plant.* 2007. 130. № 1. P. 136–147.
- Kravets E. The role of cell selection for pollen grain fertility after treatment of barley sprouts (*Hordeum distichum* L.) with UV-B irradiation // *Acta Biologica Slovenica.* 2011. V. 54. P. 23–32.
- Kravets E. Nature, Significance, and Cytological Consequences of Cytomixis // *Cytology and Genetics.* 2012. V. 46. № 1. P. 188–195.
- Kravets E. Cytomixis and Its Role in the Regulation of Plant Fertility // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2013. V. 44. № 3. P. 113–128.
- Ku S.J., Yoon H., Suh H.S. et al. Male-sterility of thermo-sensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum // *Planta.* 2003. V. 217. P. 559–565.
- Kumar G., Srivastava N. Induced cytotoxic variations in pollen mother cells of *Sesbania cannabina* Poir // *J. Central European Agriculture.* 2013. V. 14. № 3. P. 19–27.
- Kumar G., Tripathi R. Influence of heat stress on genome of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) // *J. Environmental Biology.* 2009. V. 30. № 3. P. 405–408.
- Kumar G., Yadav R.S. Induction of cytomixis affects microsporogenesis in *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2012. V. 43. № 4. P. 209–214.
- Lalonde S., Dwight U., Beebe H., Saini S. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic stage water deficit // *Sex. Plant Rep.* 1997. 10. № 1. P. 40–48.
- Lattoo S.K., Khan S., Bamotra S. et al. Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.: an additional strategy and possible implications // *J. Biosciences.* 2006. V. 31. P. 629–637.
- Lavania U.C., Basu S., Kushwaha J.S. et al. Seasonal temperature variations influence tapetum mitosis patterns associated with reproductive fitness // *Genome.* 2014. V. 57. P. 1–5.
- Li X.F., Song Z.Q., Feng D.S. et al. Cytomixis in *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum* and its hybrids with wheat // *Cereal Research Communications.* 2009. V. 37. № 3. P. 353–361.
- Lone F.A., Lone S. Cytomixis – a well known but less understood phenomenon in plants // *Int. J. Rec. Sci. Res.* 2013. V. 4. № 4. P. 347–352.
- Lu P., Chai M., Yang J. et al. The Arabidopsis callose defective microspore 1 gene is required for male fertility through regulating callose metabolism during microsporogenesis // *Plant Physiology.* 2014. V. 164. P. 1893–1904.
- Malallah G.A., Attia T.A. Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diploptaxis harra* (Brassicaceae) // *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2003. V. 143. P. 169–175.
- Mamun E.A., Alfred S., Cantrill L.C. et al. Effects of chilling on male gametophyte development in rice // *Cell Biol. Inter.* 2006. 30. № 1. P. 583–591.
- Mandal A., Datta A.K., Gupta S. et al. Cytomixis a unique phenomenon in animal and plant // *Protoplasma.* 2013. V. 250. P. 985–996.
- Mason A.S., Nelson M.N., Yan G. et al. Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures // *BMC Plant Biology.* 2011. V.11:103. doi 10.1186/1471-2229-11-103
- Mursalimov S., Deineko E. An ultrastructural study of microsporogenesis in tobacco line SR1 // *Biologia.* 2012. V. 67. P. 369–376.
- Mursalimov S., Permyakova N., Deineko E. et al. Cytomixis doesn't induce obvious changes in chromatin modifications and programmed cell death in tobacco male meiocytes // *Front. Plant Sci.* 2015a. V. 6:846. doi 10.3389/fpls.2015b.00846

- Mursalimov S.R., Deineko E.V. How cytomixis can form unreduced gametes in tobacco // *Plant Syst. Evol.* 2015. V. 301. P. 1293–1297.
- Mursalimov S., Sidorchuk Yu., Deineko E. New insights into cytomixis: specific cellular features and prevalence in higher plants // *Planta.* 2013. V. 238. № 3. P. 415–423.
- Mursalimov S.R., Deineko E.V. An ultrastructural study of cytomixis in tobacco pollen mother cells // *Protoplasma.* 2011. V. 248. P. 717–724.
- Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Baiborodin S.I. et al. Distribution of telomeres in the tobacco meiotic nuclei during cytomixis // *Cell Biol. Int.* 2015b. V. 39. № 4. P. 491–495.
- Negron-Ortiz V. Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands // *Am. J. Bot.* 2007. V. 94. P. 1360–1370.
- Nishikawa S.I., Zinkl G.M., Swanson R.G. et al. Callose (β ,1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // *Plant Biol.* 2005. 22. № 5. P. 1345–1352.
- Oda S., Kaneko F., Yano K. et al. Morphological and gene expression analysis under cool temperature conditions in rice anther development // *Genes Genet Syst.* 2010. V. 85. № 2. P. 107–120.
- Oshino T., Abiko M., Saito R. et al. Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high temperature injury in barley plants // *Molecular Genetics and Genomics.* 2007. V. 278. P. 31–42.
- Pacini E. Cell biology of anther and pollen development // Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer: Acad. publ., 1994. P. 83–96.
- Parish R.W., Phan H.A., Iacuone S. et al. Tapetal development and abiotic stress: a centre of vulnerability // *Functional Plant Biology.* 2012. V. 39. P. 553–559.
- Pecrix Y., Rallo G., Folzer H. et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 10. P. 3587–3597.
- Rai P.K., Kumara G., Tripathi A. Induced cytotoxic diversity in maize (*Zea mays* L.) inbred // *Cytology and Genetics.* 2010. V. 44. № 6. P. 334–338.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G. Stamen structure and function // *The Plant Cell.* 2004. V. 16. P. S46–S60.
- Singhal V.K., Rana P.K., Kumar P. et al. Persistent occurrence of meiotic abnormalities in a new hexaploid cytotype of *Thalictrum foetidum* from Indian cold deserts // *Biologia.* 2011. V. 66. P. 458–464.
- Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W. et al. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium* // *The Plant Cell.* 1991. V. 3. P. 647–656.
- Srivastava P., Kumar G. EMS-induced cytotoxic variability in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // *Cytology and Genetics.* 2011. V. 45. № 4. P. 44–49.
- Wang X.Y., Nie X.W., Guo G.Q. et al. Ultrastructural characterization of the process of cytoplasmic channel formation between pollen mother cells of David lily // *Caryologia.* 2002. V. 55. P. 161–168.
- Wang X.Y., Yu C.H., Li X. et al. Ultrastructural aspects and possible origin of cytotoxic channels providing intercellular connection in vegetative tissues of anthers // *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. V. 51. № 1. P. 97–106.
- Zhang D., Luo X., Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development // *J. Genet. Genomics.* 2011. V. 38. № 9. P. 379–390.
- Zhang D., Yang L. Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther // *Current Opinion in Plant Biology.* 2014. V. 17. P. 49–55.
- Zhao Da-Zh., Wang G.-F., Speal B. et al. The excess microsporocytes 1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther // *Genes and Development.* 2002. V. 16. P. 2021–2031.
- Zhou S.Q. Viewing the difference between the diploid and the polyploid in the light of the upland cotton aneuploidy // *Hereditas.* 2003. V. 138. P. 65–72.
- Zinn K.E., Tunc-Ozdemir M., Harper J.F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links // *J. Experimental Botany.* 2010. V. 61. № 7. P. 1959–1968.

Efficiency of the Induction of Cytomixis in the Microsporogenesis of Dicotyledonous (*N. tabacum* L.) and Monocotyledonous (*H. distichum* L.) Plants by Thermal Stress

Yu. V. Sidorchuk^{a, *}, E. A. Kravets^b, S. R. Mursalimov^a, S. G. Plokhovskaya^b,
I. I. Goryunova^b, A. I. Emets^b, Y. B. Blume^b, and E. V. Deineko^a

^aInstitute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

^bInstitute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 04123 Ukraine

Received April 16, 2016; in final form, May 12, 2016

The efficiencies of the induction of cytomixis in microsporogenesis by thermal stress are compared in tobacco (*N. tabacum* L.) and barley (*H. distichum* L.) It has been shown that different thermal treatment schedules (budding tobacco plants at 50°C and air-dried barley grains at 48°C) produce similar results in the species: the frequency of cytomixis increases, and its maximum shifts to later developmental stages. However, the species show differences in response. The cytomixis frequency increase in tobacco is more pronounced, and its maximum shifts from the zygotene–pachytene stages of meiotic prophase I to prometaphase–metaphase I.

Later in the meiosis, aberrations in chromosome structure and mitotic apparatus formation typical of cytomixis are noted, as well as cytomixis activation in tapetum cells. Thermal stress disturbs the integration of callose-bearing vesicles into the callose wall. Cold treatment at 7°C does not affect cytomixis frequency. Incubation of barley seeds at 48°C activates cytomixis in comparison to the control, shifts its maximum from the premeiotic interphase to zygotene, and changes the habit of cytomicotic interactions from pairwise contacts to the formation of multicellular clusters. Thermal treatment induces cytomicotic interactions within the tapetum and between microsporocytes and the tapetum. However, later meiotic phases show no adverse consequences of active cytomixis in barley. It is conjectured that heat stress affects callose metabolism and integration into the forming callose wall, thereby causing incomplete closure of cytomicotic channels and favoring intercellular chromosome migration at advanced meiotic stages.

Keywords: microsporogenesis, cytomixis, cytomicotic channels, plasmodesmata, callose, thermal stress, *Nicotiana tabacum* L., *Hordeum distichum* L.