

## ЦИТОМИКСИС И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Е. А. Кравец

*Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины*

*04123 Киев, Осиповского, д. 2а*

*E-mail: kravetshelen@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.01.12 г.

Окончательный вариант получен 25.11.12 г.

Ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной сфере растений. Большинство цитологических повреждений характеризовалось неспецифичностью. Основным типом патологии микроспорогенеза является цитомиксис, активизация которого коррелирует с гиперсекрецией каллозных отложений в стенках микроспороцитов. Отмечена негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых пыльцевых зерен (при УФ-В-облучении). Предполагается, что цитомиксис является формой клеточного (предмейотического) отбора у растений с внутриорганизменной генетической неоднородностью (мозаик). Новизна идеи состоит в том, что цитопатология, сопровождающая цитомиксис, рассматривается как механизм индуцированной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых клеток с целью сохранения фертильности мужской репродуктивной сферы. Включение этого механизма носит пороговый характер.

*Ключевые слова:* цитомиксис, микроспорогенез, гиперсекреция каллозы, стерильность пыльцевых зерен, клеточный отбор, мозаичность, УФ-В- и гамма-облучение, *Hordeum distichum* L.

DOI: 10.7868/S0475145013030038

Цитомиксис (ЦМ) представляет собой пространственное, хотя и неординарное, цитологическое явление, происхождение, значение и генетический контроль которого до сих остаются не вполне ясными. По-видимому, первое описание феномена цитомиксиса встречается в работе В. Арнольди (Arnoldi, 1900) по изучению процесса оплодотворения у голосеменных (*Pinus cembra*, *P. peuce*, *P. montana* и *Abiessibirica*). Он описал цитомиксис в эндосперме и стенке архегония как межклеточное перемещение ядер внутри тканей и проникновение ядер эндосперма в цитоплазму яйцеклетки. Годом спустя, цитомиксис был описан М. Кернике в микроспороцитах у *Crocus vernus* (Körnigke, 1901) и Г. Мейхе в эпидермальных тканях *Allium nutans* (Miehe, 1901). Эти исследователи считали цитомиксис артефактом фиксации или травматического вмешательства. Еще через несколько лет, Л. Дигби (Digby, 1909) у *Galtonia candicans* и Р. Гейтс у *Oenothera gigas* (Gates, 1911)

описали перемещение хроматина по цитоплазматическим каналам, соединяющим микроспороциты как спонтанный естественный клеточный процесс. Однако в большинстве ранних и более поздних работ цитомиксис все же рассматривался как патологическое явление (Fraser, 1914; Woodworth, 1931; Morisset, 1978), артефакт фиксации или травматического вмешательства (Takats, 1959; Tarkowska, 1965, 1966), или результат влияния неблагоприятных факторов среды (Naran, 1980; Basavaiah, Morthy, 1987; Soman, Bhavanandan, 1993). Было замечено, что ЦМ (наряду со слиянием микроспороцитов в синцитии) свойственен гибридам (Novwa, 1928; Levan, 1941; Ster, 1946). Между тем, Гейтс, систематизировавший это явление и предложивший термин “цитомиксис”, считал его спонтанным нормальным клеточным процессом (Gates, 1911; Gates, Rees, 1921).

До настоящего время среди исследователей так и не существует однозначного мнения относительно природы и значения ЦМ (de Souza, Pagliarini, 1997; см. обзор Кравец, 2012). Одни рассматривают его как нормальное, но нерегулярное цитологическое явление, сопровождающее микроспорогенез у многих видов покрытосеменных (Gates, 1911; Gates, Rees, 1921, Cheng, Wang, 1956; Servella, 1958; Bahl, Tyagi, 1988; Dagne, 1994), другие склоняются к мысли о его патологической природе. Третьи считают ЦМ нормальным процессом межклеточного взаимодействия, который свойственен многим вегетативным и генеративным тканям растений, и в ходе которого происходит движение и перемещение ядерного материала, клеточных органелл, сигнальных молекул и трофических факторов (Heslop-Harrison, 1966a, 1966b; Zheng et al., 1987; Bellucci et al., 2003; Guo, Zheng, 2004; Ван и др., 2004; Кунах, 2005, 2011; Liu et al., 2007).

Широкая распространенность точки зрения о патологической природе ЦМ основана на его свойственности растениям с выраженной генетической нестабильностью и нарушенным гомеостазом: гаплоидам, анеуплоидам, триплоидам, полиплоидам, инцухтированным линиям, регенерантам, гибридам, мутантам, апомиктам (Камга, 1960; Шкутина, Хвостова, 1966; Романов, Орлова, 1971; Поддубная-Арнольди, 1976; Кравченко, 1977; Mantu, Sharma, 1982; Singhal, Gill, 1985; Шнайдер, 1988; Bedi, 1990; Орлова, 1994; Стельмах и др., 2005; de Oliveira et al., 2004; Lattoo et al., 2006; Сидорчук и др., 2007; Kumar, Singhal, 2008; Singhal, Kumar, 2008; Singhal et al., 2010; Мурсалимов, 2012). Полагают, что ЦМ может свидетельствовать об отдаленности и несовместимости геномов гибридов (Шкутина, Хвостова, 1966; Шкутина, Козловская, 1974), наличии мутаций, в том числе связанных с мужской стерильностью (Nirmala, Kaul, 1994). Деструктивное начало цитомиксиса, как правило, усиливают стрессовые факторы – гибридизация, инцухтирование, физические факторы и химические агенты (например, колхицин), облучение и гербициды (Поддубная-Арнольди, 1976; Кравченко, 1977; Bobak, Herich, 1978; Narain, 1980; Zheng et al., 1987; Dwivedi et al., 1988; Bedi, 1990; Остапенко др., 1993; Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 1997, 2007; Souza, Pagliarini, 1997; Bellucci et al., 2003; Kumar, Singhal, 2008, 2011; Кравец, 2009, 2012).

Возникновение цитомиксиса некоторые ученые связывают с абберациями на предшествующих мейозу митозах, что может приводить к нарушению мейотической сегрегации хромосом. Поэтому генетический контроль регуляции цитомиксиса может осуществляться теми же генами, которые ответственны за сегрегацию хромосом в мейозе (Mantu, Sharma, 1983; Yen et al., 1993), как например *DIF1* у *Arabidopsis thaliana* (Bhatt et al., 1999). Многие исследователи считают, что ЦМ вносит определенный вклад в формообразовательный процесс, увеличивает генетическую гетерогенность – влияет на уровень пloidности, миксоплоидии и гетерозиготности, имеет адаптивную значимость (Zheng et al., 1987; Sapre, Deshpande, 1987; Шнайдер, 1988; Falistocco et al., 1995; Kumar, Singhal, 2008, 2011; Мурсалимов, Дейнеко, 2009; Singhal et al., 2010; Malallah, 2011; Кунах, 2005, 2011).

Нет единого мнения и о последствиях цитомиксиса. Большое количество данных указывают на то, что ЦМ усложняет картину мейоза и может приводить к серьезным генетическим последствиям: генетическому дисбалансу микроспороцитов, образованию синцитиев, цитопластов, полиад, анеуплоидии и полиплоидии микроспор, полиморфизму и стерильности пыльцевых зерен (Поддубная-Арнольди, 1976; Narain, 1980; Bedi, 1990; Singhal, Gill, 1985; Орлова, 1994; Falistocco et al., 1995; Lattoo et al., 2006; Сидорчук и др., 2007; Singhal, Kumar, 2008; Kumar, Singhal, 2008; Singhal et al., 2010). Вместе с тем, у стабильных генотипов, в частности лилии, в период наибольшей “транзиторной” активности хроматина – зиготене–пахитене профазы мейоза при полностью открытых межклеточных каналах – ядерная мембрана оставалась интактной, а микроспороциты, как до, так и после “ядерных миграций” (nuclear transfer), сохраняли нормальное диплоидное число хромосом (Zheng et al., 1987). В недавних публикациях было показано, что в микроспорогенезе у полиплоидных линий табака (3n, 4n) не только ядерная мембрана микроспороцитов при миграции хроматина остается интактной, но и сам “транзиторный” хроматин при перемещении не повреждается (Mursalimov, Deineko, 2012; Мурсалимов, 2012).

В структурном и физиологическом аспектах первопричиной цитомиксиса в микроспороцитах считали неполное формирование клеточных пе-

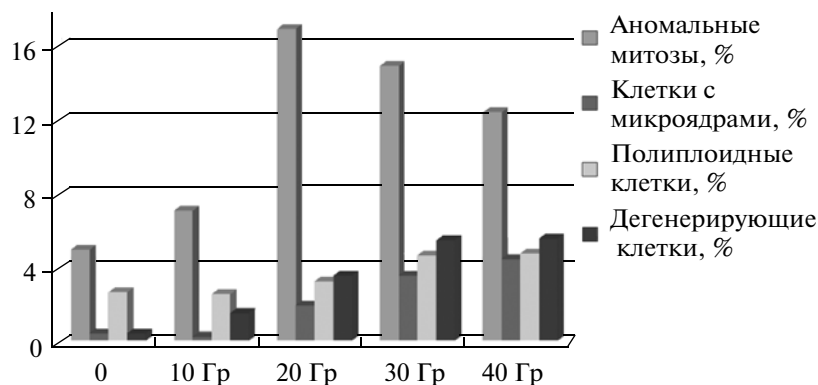
регородок и образование цитомиктических каналов между клетками (Heslop-Harrison, 1966a, b; Risueno et al., 1969; Welan, 1974). Обычно наибольшая цитомиктическая активность наблюдается в ранней профазе мейоза — лептотене—зиготене, хотя цитомиктические каналы могут функционировать или образовываться заново вплоть до завершения мейоза. По цитомиктическим каналам, кроме хроматина, перемещаются органеллы, трофические факторы, сигнальные молекулы, в частности, факторы регуляции клеточного цикла и хромосомной сегрегации в мейозе (Heslop-Harrison, 1966a, b; Welan, 1974; Yen et al., 1993; Herrero, 2003; Guo, Zheng, 2004; Ван и др., 2004; Мурсалимов и др., 2010; Mursalimov, Deineko, 2012). Благодаря межклеточным каналам достигаются однородность клеточной популяции микроспороцитов, синхронизация мейоза, а также выравнивание качественного состояния пыльцевых зерен, необходимое для быстрого и успешного опыления (Heslop-Harrison, 1966a, 1966b; Zheng et al., 1987; Kwiatkowska, 2003; Guo, Zheng, 2004). В частности, Гуо и Зэнг (Guo, Zheng, 2004) полагают, что одна из функций ЦМ связана с элиминацией гетерогенности мужских гамет (в отношении транскрипции, уровня мРНК и белков), снижающей их качество и синхронность развития. Однако такой взгляд на роль цитомиксиса вступает в противоречии с его формообразующей функцией, увеличивающей степень генетического разнообразия и гетерозиготности микроспороцитов.

Сходные с цитомиксисом явления наблюдаются и при сперматогенезе у низших растений и животных и овогенезе животных. У низших растений цитоплазматические каналы сохраняются в течение всего сперматогенеза до поздних этапов дифференциации сперматозоидов (Rezaglia, Garbary, 2001; Kwiatkowska, 2003). У животных межклеточные мосты (так называемые “intercellular bridges” или “ring canals”) образуются в ходе первого митотического деления сперматогониев и сохраняются на протяжении нескольких предмейотических митозов, мейоза вплоть до последних стадий спермиогенеза (Carlson, Handel, 1988; Necht, 2000; Ventela et al., 2003). Число цитоплазматических каналов в синцитиально связанных группах клеток определяет, как полагают, направленную дифференцировку гамет. У покрытосеменных растений спермии и вегетативное ядро в пыльцевом зерне и пыльцевой трубке образуют

ассоциацию (male germ unit), в которой остаются связанными между собой межклеточными каналами (Dumas et al., 1985; Russel, 1991; Mogensen, 1992). Следовательно, цитомиксис сопровождает дифференциацию клеток половых путей и гаметогенез у растений и животных, обеспечивая информационный контакт между клетками. Наконец, исследования на живом материале фертильной трансгенной линии табака 2В-СФР показали, что в интактных тканях корневого апекса, эпидермисе листьев, тканях пыльника и завязи происходят активные межклеточные перемещения ядерного материала и цитоплазматических органелл, никак не связанные ни с травматическим вмешательством, ни фиксацией или другими негативными воздействиями (Liu et al., 2007). Учитывая все вышесказанное, цитомиксис можно характеризовать как широко распространенное и неоднозначное явление цитологического, генетического, физиологического и информационного характера, свойственное вегетативным и генеративным тканям как в норме, так и при патологии, и усиливающееся при воздействии стрессовых факторов разной природы. Активность и морфологическая картина цитомиксиса варьируют в широких пределах. Патологическая природа цитомиксиса проявляется у растений с выраженной генетической нестабильностью и нарушенным гомеостазом. Однако цитопатологию, которая сопровождает цитомиксис у этих растений, можно рассматривать и с точки зрения индукции клеточной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых микроспороцитов. Одним из путей в таком подходе является использование мутагенных факторов, в частности, радиации. Целью данного исследования было изучение влияния УФ-В и гамма-облучения на мужскую репродуктивную систему, анализ дозовых зависимостей индукции цитомиксиса, корреляции между цитомиксисом и фертильностью микроспор и пыльцевых зерен и, как следствие, оценка роли цитомиксиса в репродуктивном потенциале растений.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования — ячмень двурядный (*Hordeum distichum* L.,  $2n = 14$ ), сорт Скарлет французской селекции. Воздушно сухие зерновки облучали на гамма-установке “Исследователь”, а трехсуточные проростки — ультрафиолетовой лампой *Philips TL 20 W* (используя свето-



**Рис. 1.** Дозовые зависимости индексов различных цитопатологий в корневой меристеме проростков ячменя после гамма-облучения сухих семян; по оси  $x$  – доза гамма-облучения, по оси  $y$  – уровень патологий, %.

фильтр, отсекающий коротковолновой участок спектра). Дозы гамма-облучения составляли 10, 20, 30 и 40 Гр при мощности  $3.3 \text{ сГр мин}^{-1}$ , УФ-В – 0.5, 2.2 и 4.3  $\text{кДж/м}^2$  при интенсивности  $0.5 \text{ Вт/м}^2 \text{ сек}$ . После тестирования ростовых и цитогенетических параметров (рис. 1) для дальнейшей работы были отобраны две дозы гамма-облучения – 20 и 40 Гр. Через сутки после облучения проростки высаживали в грунт для изучения развития репродуктивных органов. Фиксацию колосьев проводили от стадии дифференциации спорогенной ткани до созревания пыльцы. Для фиксации использовали смесь Навашина, окраски временных препаратов – ацетокармин. Свежие пыльники окрашивали смесью флуоресцентных красителей: анилинового голубого, флуоресцеина, пропидиума йодида и DAPI (AB + FDA + PI + DAPI) в следующих концентрациях: AB  $2.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , FDA  $2.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , PI  $1.0 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , DAPI  $0.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ; затем отмывали в фосфатном буфере и помещали в раствор сахарозы (15%). Свежеприготовленные препараты анализировали с помощью ультрафиолетового микроскопа (Axiostar, Carl Zeiss, Germany). После просмотра в ультрафиолете (в спектре поглощения длины волны в  $461 \text{ нм}$  – для DAPI и анилинового голубого и  $617 \text{ нм}$  – для флуоресцеина и пропидиума йодида) препараты визуализировали ацетокармином для анализа в видимом участке спектра.

Степень активности ЦМ определяли по числу охваченных цитомиксисом микроспороцитов (посредством хроматиновых петель и мостов) в поле зрения. Объем выборок при анализе мейоза и тетрад микроспор составлял около 20 пыльни-

ков на стадию. Для каждого варианта было исследовано в среднем 50–70 пыльников с микроспороцитами и по 20 пыльников для анализа развития пыльцевых зерен. Статистическую обработку данных проводили с использованием функций программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Микроспорогенез*

Микроспорогенез проходит по свойственному злакам сукцессивному типу с образованием тетрад изобилатерального строения (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; и др.). Особенностью злаков является однослойное расположение микроспороцитов (МСЦ) вдоль поверхности тапетума (Романов, 1970; Батыгина, 1974). МСЦ обычно лежат вдоль тапетума плотно сомкнутыми рядами, однако некоторые из них в процессе роста сдавливаются и утрачивают контакты с клетками тапетума и соседними клетками микроспороцитов, вытесняясь в полость пыльника. Такие МСЦ, как правило, запаздывают или останавливаются в развитии, но иногда могут вступать в мейоз и завершать свое функционирование. Таким способом, по-видимому, регулируется избыточность МСЦ (см. ниже). В начале профазы мейоза на стадии лептотены на клеточных стенках МСЦ начинается отложение каллозы. В норме в ходе микроспорогенеза синтез каллозы прогрессирует, достигая максимума на стадии формирования тетрад микроспор (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Pacini, 1994; Nishikawa et al., 2005). В дальнейшем под воздействием каллазы происходит растворение каллозных оболочек и освобождение микроспор из тетрад.

Основным типом патологии в микроспорогенезе при воздействии ультрафиолетовой и гамма-радиации является цитомиксис. По активности его целесообразно подразделять на слабый (локальный), интенсивный и деструктивный (патологический) (Кравченко, 1977). Локальный цитомиксис не сопровождается характерной для цитомиксиса (в привычном понимании этого термина) цитопатологией. Морфологическая картина локального цитомиксиса выражается в объединении МСЦ в ранней профазе мейоза в группы с помощью цитомиктических каналов (без участия “блуждающего” хроматина). Интенсивный цитомиксис характеризуется типичной цитопатологией через появление в профазе и последующих фазах мейоза “блуждающего”, или транзитного, хроматина, его “текучести” в виде тяжей, фрагментов ядра, хромосом и микроядер, а также разрушенных клеток, ядер и активизации цитолитических процессов. Деструктивный цитомиксис – патологический процесс, охватывающий почти все содержимое пыльника или большую его часть (особенно дистальную часть микроспорангия). Для него характерно разрушение подавляющего большинства клеток и ядер МСЦ, заполнение полости пыльника агглютинированным хроматином и нарушения в ходе мейоза сохраняющихся микроспороцитов. Деструктивный цитомиксис, по сути, является не столько способом коммуникации МСЦ, как сколько способом их автолиза. Иногда активизацию цитомиксиса (переход от интенсивного к деструктивному) можно наблюдать в направлении продольного градиента внутри одного и того же микроспорангия.

#### *Контроль. Локальный цитомиксис*

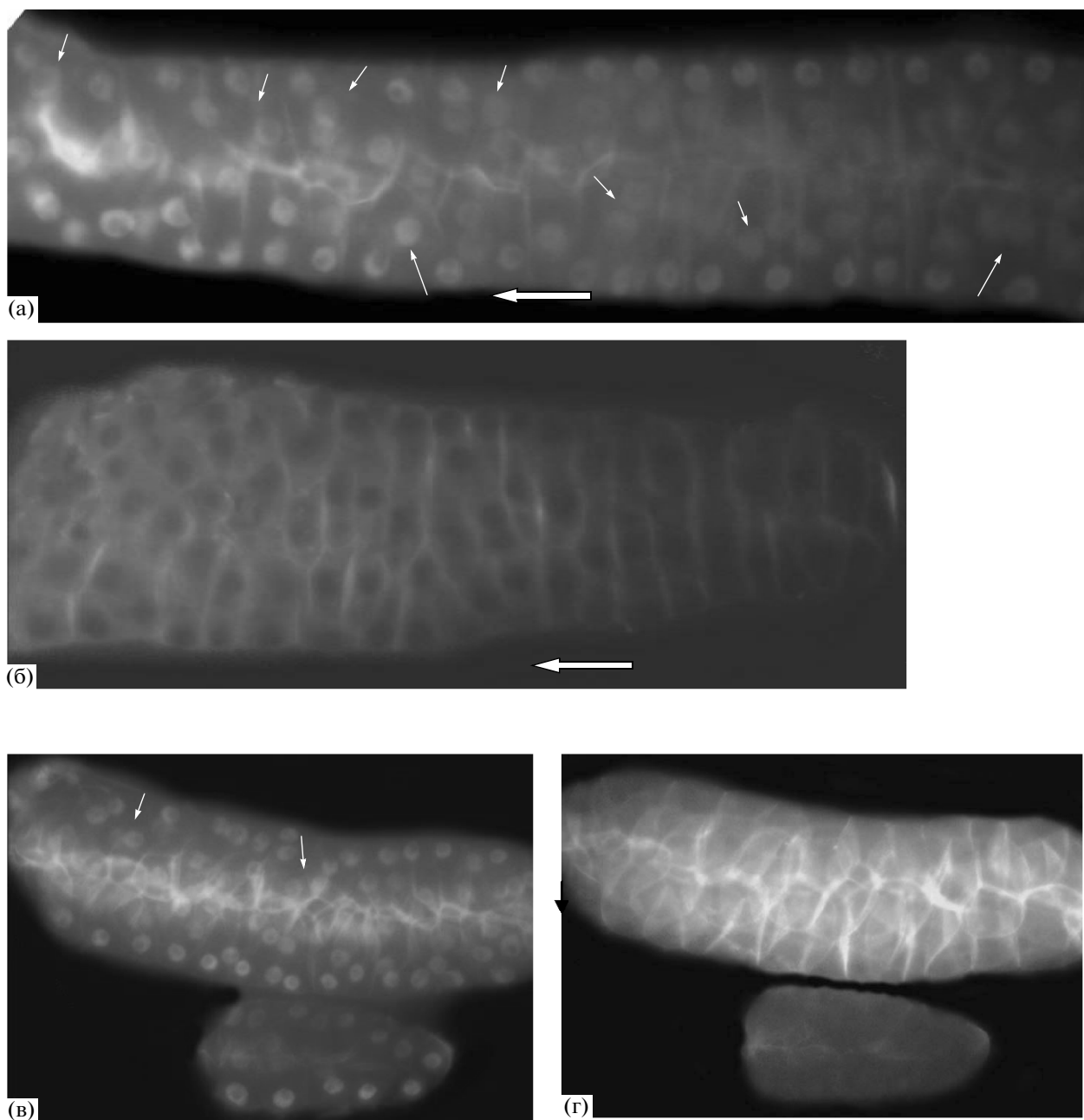
У контрольных растений в премейотической интерфазе и ранней профазе мейоза МСЦ часто объединяются парами или группами, формируя цепочки из соединенных в поперечном направлении относительно продольной оси микроспорангия клеток. В лептотене–зиготене петли хроматина образуют “протуберанцы”, которые иногда заходят в цитоплазматические каналы. Такие контакты не влекут за собой негативных последствий. МСЦ в ходе мейоза сохраняют тесные контакты с клетками тапетума. Со стороны тапетума каллоза в МСЦ обычно не откладывается. На противоположной стороне МСЦ, обращенной к

полости микроспорангия, формируются утолщения каллозы – так называемые, каллозные гребни. Следом за профазой, последующие фазы мейоза проходят без нарушений с образованием правильных тетрад микроспор. Локальный цитомиксис мы не оценивали как нарушение. Интенсивный и деструктивный цитомиксис в нормально развитых колосьях и колосках не встречались.

#### *Воздействие УФ-В и гамма-облучения. Интенсивный цитомиксис*

В вариантах с УФ и гамма-облучением, наряду с локальным, наблюдается интенсивный цитомиксис, который проявляется в возрастании активности и временной протяженности цитомиксиса. Как отмечалось выше, переход от локального к интенсивному цитомиксису может происходить и в пределах одного и того же пыльника (рис. 2а, 2б). Возрастание активности цитомиксиса часто сопровождается потерей контактов МСЦ с клетками тапетума, продвижением их вглубь микроспорангия и появлением мощных каллозных отложений на поверхности МСЦ (рис. 2а–2д). По-видимому, возрастание активности цитомиксиса, потеря контактов МСЦ с клетками тапетума и гиперсекреция каллозы – процессы, которые коррелируют между собой. Гиперсекреция каллозных отложений была характерна для МСЦ во всех вариантах опытов. Группы поврежденных МСЦ, охваченные интенсивным или деструктивным цитомиксисом, отделяются и “запечатываются” в пыльнике каллозными отложениями (каллозными пробками) (рис. 2д, 2е).

Интенсивный цитомиксис характеризуется типичной “ядерной” патологией: в МСЦ появляется “липкость” или “текучесть” хроматина, возникает “блуждающий”, или транзитный хроматин, в виде тяжей, перетекающих фрагментов ядра, хромосом, микроядер (рис. 3а–3г). Цитомиктическая активность иногда проявляется еще до начала мейоза в ходе последних митотических делений спорогенных клеток, а также в премейотической интерфазе и продолжается в течение всего последующего хода мейоза (рис. 3б, 3в). Наличие у ячменя микроядер в МСЦ, появление которых связано с цитомиктической активностью спорогенных клеток, не препятствовало их вступлению в мейоз. Аналогично, у пшеницы микроядра смещались в периферическую цитоплазму МСЦ и, по-видимому, выталкивались из клетки



**Рис. 2.** Гиперсекреция каллозы в профазе 1-го деления мейоза в микроспорогенезе: а, б – градиент отложения каллозы, совпадающий с градиентом активизацией цитомиксиса в микроспорангии (стрелками указаны микроспороциты, утратившие контакты с тапетумом и соединенные между собой; внизу стрелкой – направление градиента активности цитомиксиса); в, г – нормальный процесс отложения каллозы (нижний фрагмент пыльника) и усиленный, совпадающий с активизацией цитомиксиса (верхний пыльник) (стрелками указаны микроспороциты, потерявшие контакт с тапетумом); д – нормальные микроспороциты (указаны белыми стрелками в верхней части пыльника) и микроспороциты, потерявшие контакт с тапетумом (нижняя часть пыльника) (черными стрелками указаны области каллозных отложений); е – “запечатывание” каллозой микроспороцитов, подвергающихся автолизу (черными стрелками указаны синцитии, белой – нормальные микроспороциты); окраска смесью флуоресцентных красителей, микроскопия в разных спектрах поглощения УФ; а–г – УФ-В 4.3 кДж/м<sup>2</sup>; б, д – гамма облучение, 20 и 40 Гр; е – деструктивный цитомиксис в колосьях подгонов. Окраска смесью флуоресцентных красителей.

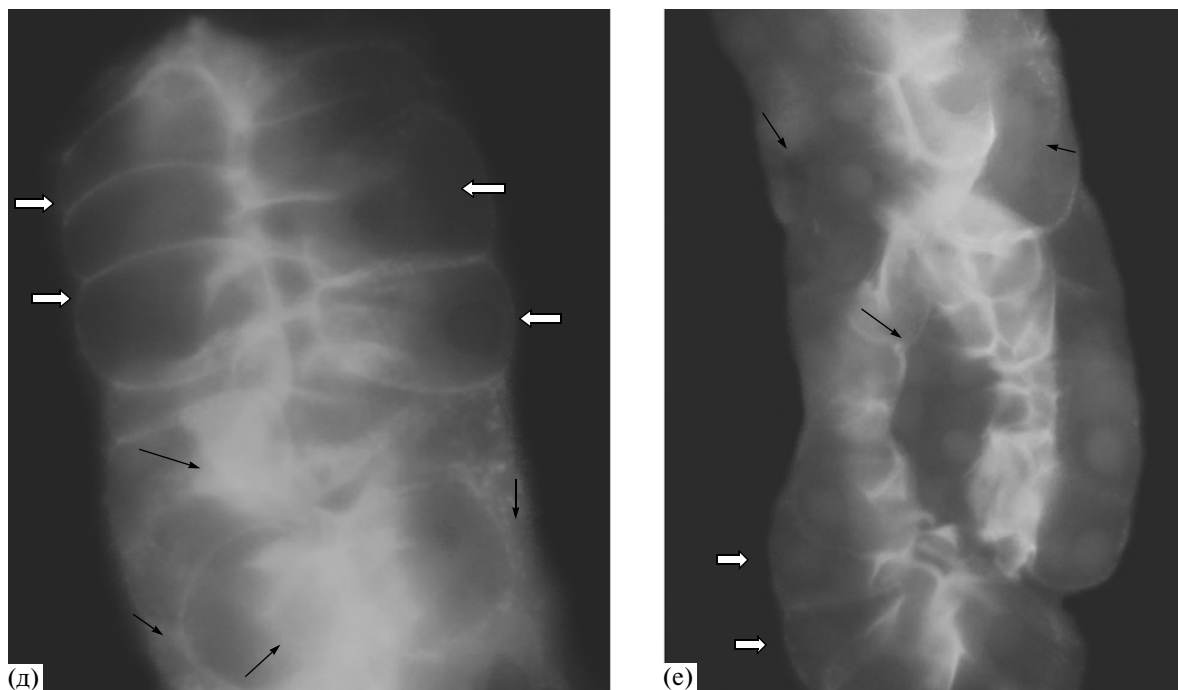


Рис. 2. Окончание.

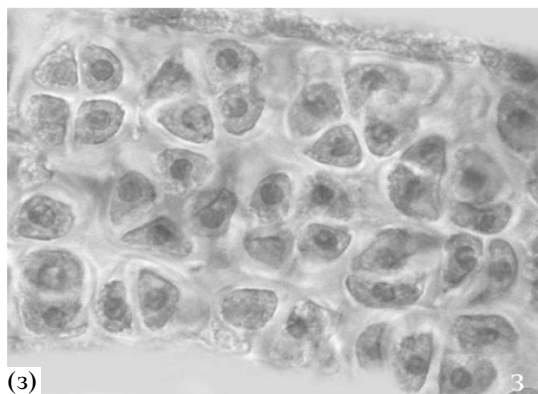
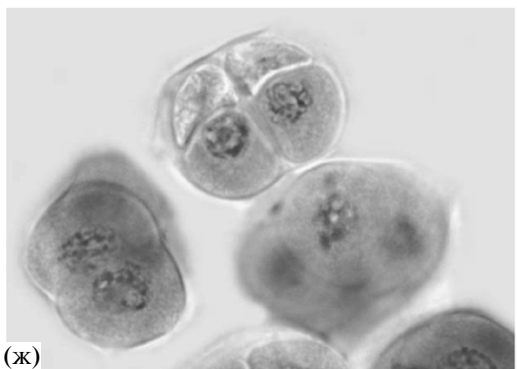
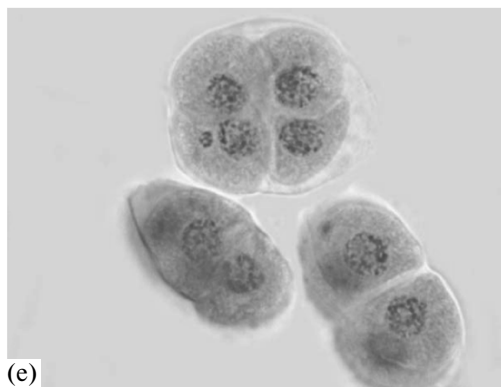
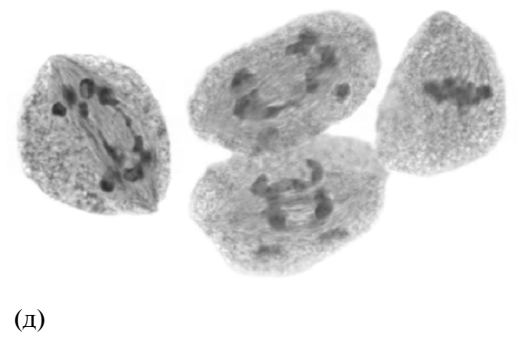
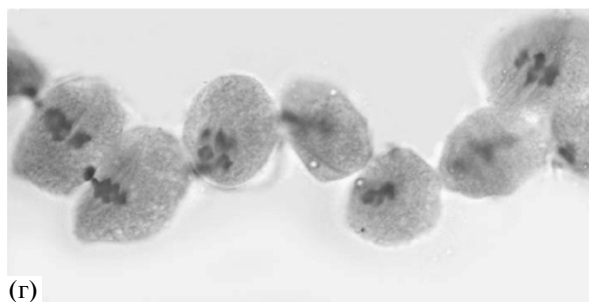
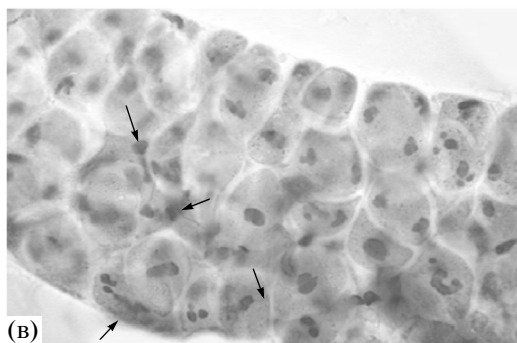
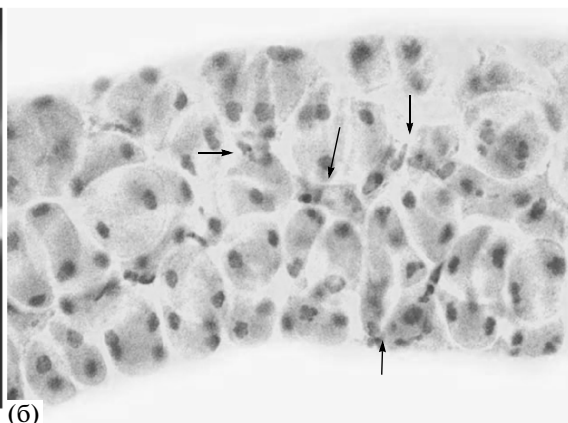
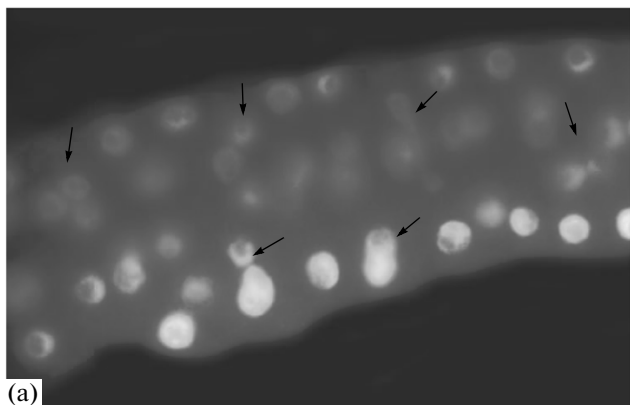
до конца профазы мейоза (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 2007).

В поздней профазе мейоза в ядрах некоторых МСЦ часть хромосом обособливалась и слипалась. Возможно, именно эти хромосомы отторгались и в дальнейшем мигрировали по клеткам. В метафазе “транзиторный” хроматин иногда перетекал по одиночным, реже двойным мостам, в виде тяжей, отдельных хромосом или микроядер от клетки к клетке. Интенсивный ЦМ охватывал соседние клетки, часто, продольные группы МСЦ, усложняя и задерживая прохождение фаз мейоза (рис. 3г). “Транзиторный” хроматин, по-видимому, не включается в состав ядра клеток, через которые мигрирует, хотя, может влиять на спорогенез. Полагают, что он отторгается клеткой-реципиентом путем заложения перегородок с образованием мелких клеток (Романов, Орлова, 1971; Tarkowska, 1973). В последующем ходе мейоза встречались аномалии (мосты, униваленты, фрагменты), указывающие на образование хромосомных aberrаций (рис. 3д). У ячменя основная масса сверхкомплексного и мигрирующего хроматина оставалась в межклеточном пространстве или в составе дегенерирующих микроспорцитов (рис. 3б, 3в).

Биохимические причины появления “липкости” хромосом связывают с дефектом функционирования одного или двух типов специфических негистоновых белков (ДНК-топоизомеразы II и периферических белков), которые необходимы для сегрегации хроматид (Gaulden, 1987). Изменение функционирования этих белков вызваны мутациями в структурных генах или непосредственным воздействием мутагенов на эти белки. Липкость хромосом, как полагает автор, является причиной хромосомных aberrаций вследствие физического растяжения и разрывов хроматид при расхождении в анафазе.

Большая часть МСЦ во всех вариантах опыта заканчивала мейоз с образованием правильных, реже, генетически несбалансированных тетрад (рис. 3е–3з). Следует заметить, что интенсивный цитомиксис — организованный, а никак не хаотичный процесс, в ходе которого, в целом, сохраняется порядок прохождения мейоза и не нарушаются функции мейотического аппарата деления.

У исследуемого генотипа ячменя цитомиксис охватывал около 20% МСЦ при максимальной дозе УФ облучения и до 23% при гамма-воздействии. Дозовые зависимости индукции цитомиксиса в микроспорогенезе характеризовались не-





линейностью (рис. 4а–4г). Цитомиксис заметно усиливался при максимальной дозе УФ-В – 4.3 кДж/м<sup>2</sup>; а при 20 Гр активность ЦМ была выше, чем при 40 Гр. Между активностью цитомиксиса и частотой патологий в тетрадах микроспор наблюдалась положительная корреляция (0.4–0.6). Следовательно, цитомиксис может быть причиной образования несбалансированных тетрад, однако оба эти типа нарушений могут быть и следствием другой, общей причины – мутагенеза, индуцированного воздействием радиации.

#### *Деструктивный цитомиксис*

Деструктивный цитомиксис встречался в контроле и во всех вариантах опыта вне связи с воздействием облучения в используемом диапазоне доз. Он наблюдался в редуцированных пыльниках недоразвитых колосков и в колосьях подгонов. Вероятно, его появление связано с нарушением трофики развивающегося пыльника, что, в свою очередь, могло индуцироваться высокими температурными условиями среды. Деструктивный цитомиксис характеризуется, как отмечалось, появлением большого количества “неорганизованного” и агглютинированного хроматина в полости пыльника, гиперсекрецией каллозы, образующей мощные отложения, и множественными нарушениями в прохождении мейоза (рис. 5а, 5б). Причем, число нарушений по мере прохождения мейоза обычно возрастало. Вследствие этого, количество нормальных тетрад микроспор и фертильной пыльцы в таких пыльниках было резко сниженным (рис. 5в, 5г). Как отмечает Кравченко (1977), и мы разделяем эту точку зрения, деструктивный ЦМ может служить формой устранения нежизнеспособной или ненужной клеточной системы.

#### *Развитие пыльцевого зерна (ПЗ)*

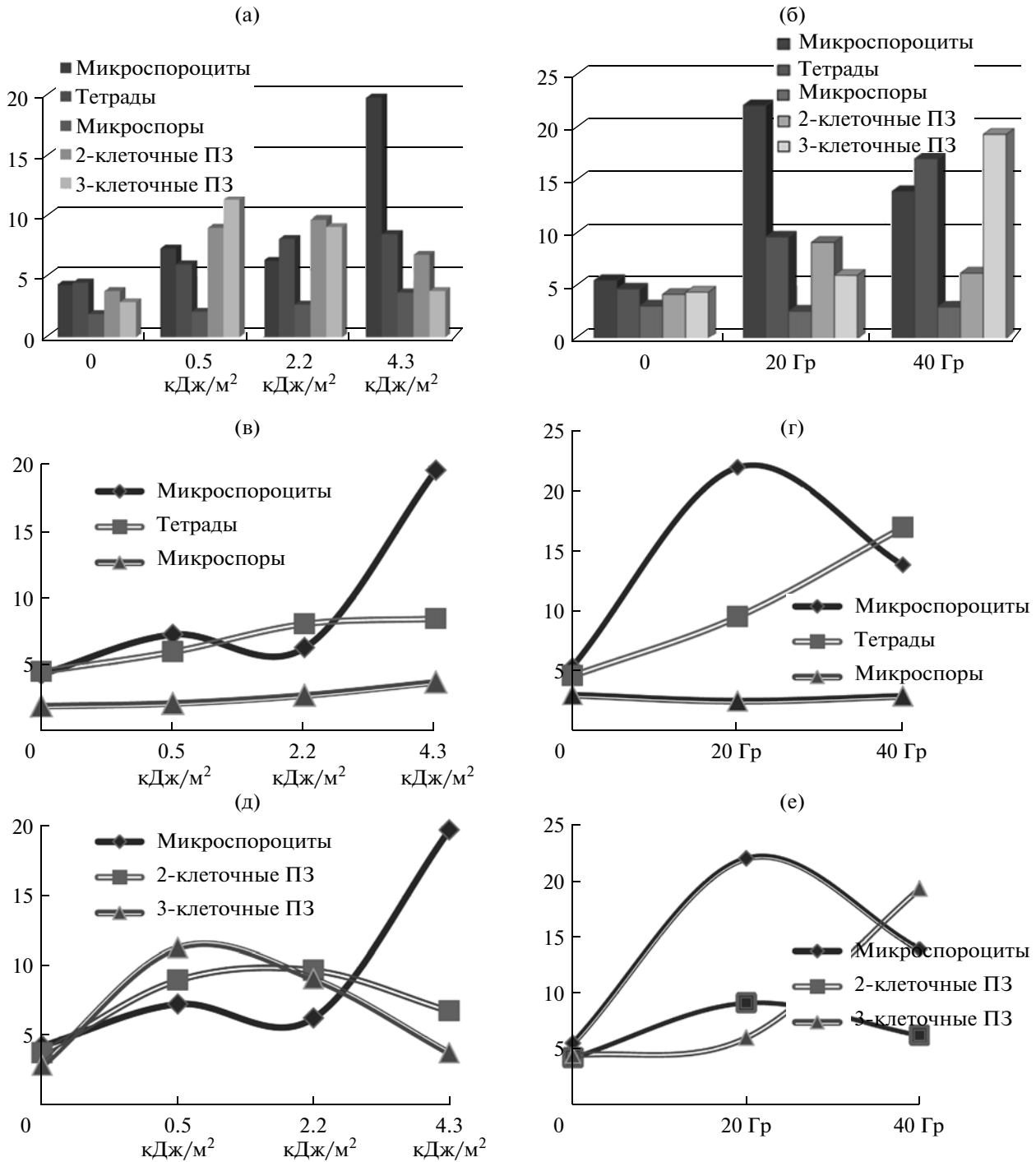
В норме развитие мужского гаметофита у ячменя, как и у большинства злаков, начинается с этапа освобождения микроспоры из оболочки

микроспороцита и включает в себя этапы завершения формирования спородермы, роста и поляризации микроспоры (Романов, 1970; Батыгина, 1974; и др.). Затем следует первый асимметричный митоз, поляризация двухклеточного ПЗ, второе митотическое деление, которые сопровождаются синтезом цитоплазмы, а затем, и отложением запасных веществ в цитоплазме вегетативной клетки (Романов, 1970; Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Mascarenhas, 1989; и др.). Зрелое ПЗ содержит пару стреловидных спермиев и ядро вегетативной клетки, цитоплазма которой заполнена амилопластами (рис. 6а).

Большинство нарушений микрогаметогенеза при УФ- и гамма-облучении характеризовались неспецифичностью: возрастали гетерогенность ПЗ по размерам, частота изменения полярности микроспоры и двухклеточного ПЗ, “рассинхронизация” их развития в пыльцевой камере, увеличивался процент “малоплазменных” ПЗ (рис. 6б–6в). Так, нарушение поляризации микроспоры приводило к изменению ориентации оси деления в ходе первого митоза и образованию пары симметричных ядер или клеток вместо разновеликих генеративной и вегетативной клеток (рис. 6г).

Как отмечалось нами в более ранних работах (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 1997, 2007), гамма-облучение может индуцировать и специфические нарушения микрогаметогенеза, связанные с поздней инактивацией спермиев в ПЗ. В этом случае пыльцевые зерна нормальной морфологии содержали дегенерирующие (скрученные и агглютинированные) спермии (рис. 6д), что, возможно, было обусловлено их генетической несбалансированностью. Причины появления “малоплазменных” ПЗ связаны с нарушением синтеза цитоплазмы в микроспоре или вегетативной клетке. Полагают, что нарушение синтеза цитоплазмы – следствие мутации специфических генов ПЗ, экспрессия которых усиливается после первого митоза, или мутации, обуславливающей мужскую цитоплазматическую стерильность (Mascarenhas, 1990; Nirmala, Kaul, 1994). Спермии

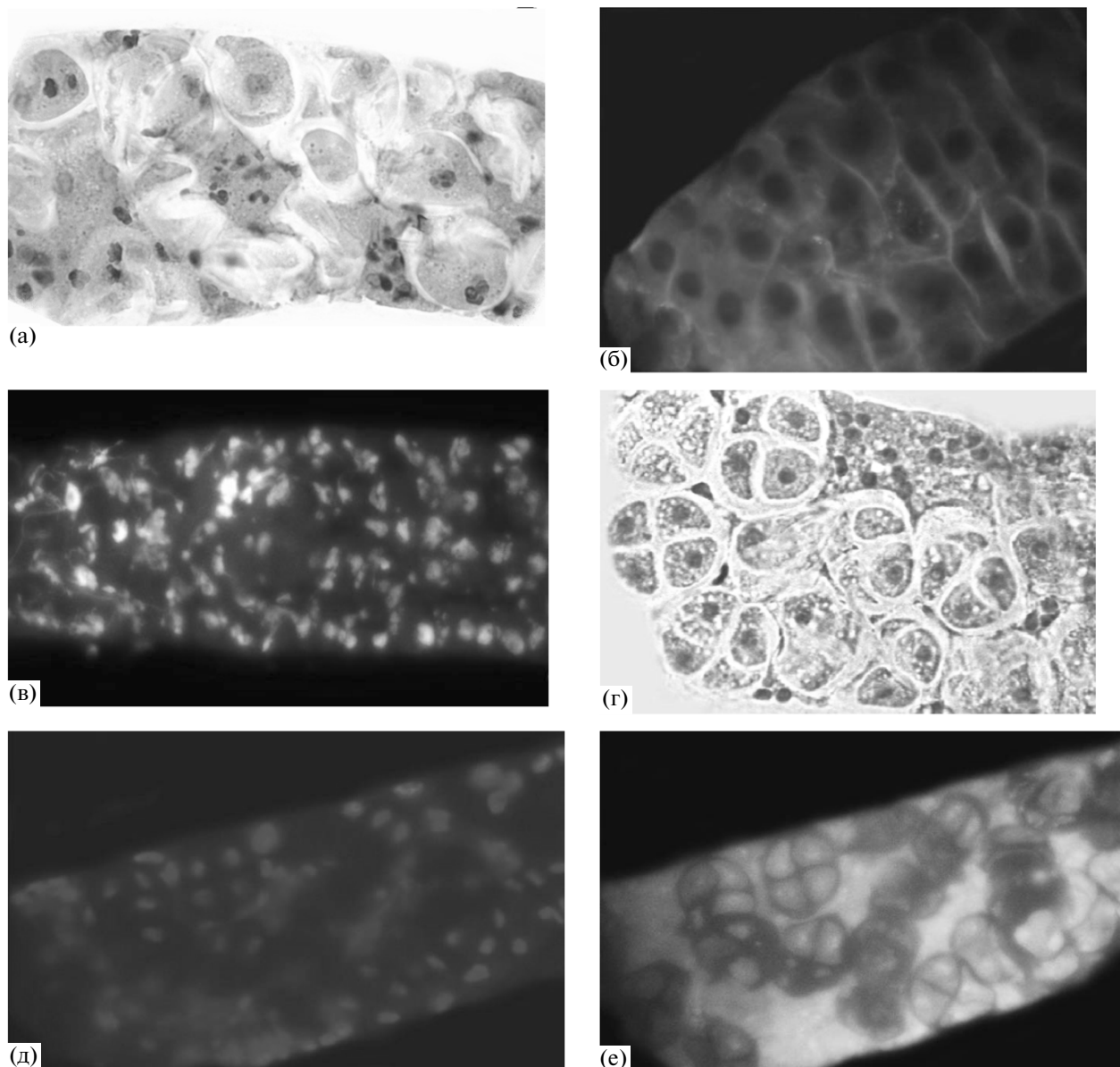
**Рис. 3.** Микроспорогенез. Интенсивный цитомиксис: а – профазы I (стрелками указаны микроспороциты, утратившие контакты с тапетумом и объединившиеся в группы) (2.2, 4.3 кДж/м<sup>2</sup>), б–в – телофазы II (4.3 кДж/м<sup>2</sup>) (стрелками указана локализация “блуждающего” хроматина в межклеточном пространстве и в составе дегенерирующих микроспороцитов); г – группировка микроспороцитов в продольном направлении (вдоль продольной оси микроспорангия) в метафазе I (20 Гр); д – метафаза I, образование мостов, ацентрические фантомы (40 Гр); е, ж – нормальные и несбалансированные тетрады микроспор (40 Гр и 4.3 кДж/м<sup>2</sup>); з – пыльник с тетрадами микроспор (20 Гр); а – окраска DAPI, б, в, з – визуализация ацетокармином, г–ж – окраска ацетокармином.



**Рис. 4.** Дозовые зависимости индукции различных цитопатологий на последовательных этапах развития пыльника: а, в, д – дозовые зависимости количества нарушений после УФ-В облучения; б, г, е – дозовые зависимости количества нарушений при гамма-облучении; по оси x – доза радиации, по оси y – уровень патологий, стерильности ПЗ, %.

в “малоплазменных” ПЗ останавливались в развитии, не заканчивая своей дифференцировки. По морфологическим признакам дегенерация ядра микроспоры, генеративной клетки, спермиев и ядра вегетативной клетки в ПЗ осуществлялась по типу апоптоза (рис. 6е). Действительно, экспозиция

УФ-В, также как и гамма-облучение, может инициировать апоптозные процессы в растительных клетках (Lytvyn et al., 2010). Пыльцевая продуктивность, или наполненность пыльников, в вариантах с УФ облучением, как правило, не отличалась от контроля, сохраняясь относительно

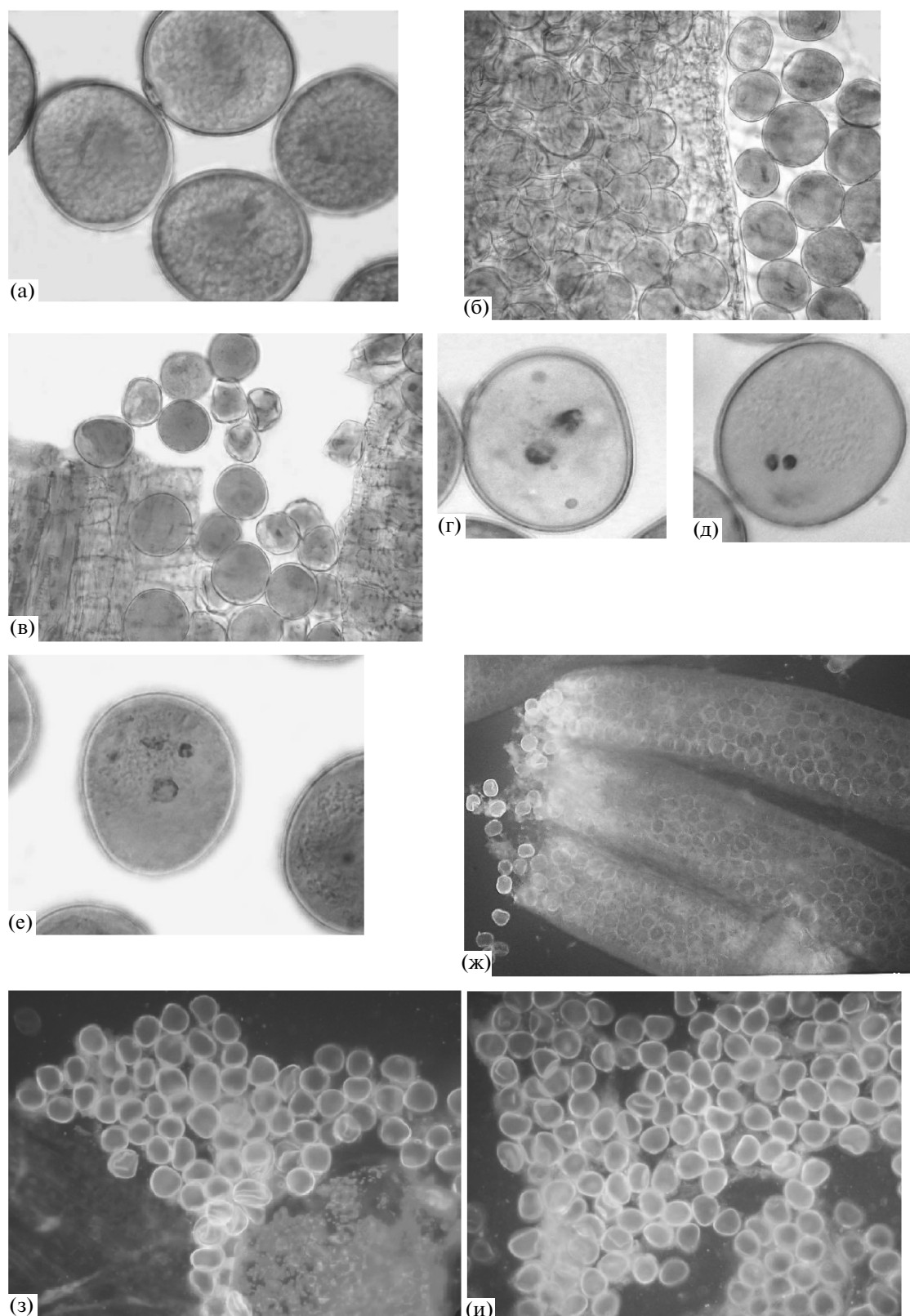


**Рис. 5.** Микроспорогенез. Деструктивный цитомиксис: а – метафаза I, утолщение каллозных стенок, образование синктиев; б – гиперсекреция каллозы в профазе мейоза; в – метафаза II; г–е – редуцированные пыльники на стадии тетрад; а, г – визуализация ацетокармином, б – анилиновый голубой, в, д, е – смесь флуоресцентных красителей, микроскопия в разных спектрах поглощения УФ.

высокой (рис. 6ж). Визуально, по степени аккумуляции каллозы на оболочках микроспор и ПЗ, между опытными вариантами и контрольными растениями также не выявлено существенных различий (рис. 6з, би).

Дозовые зависимости индукции нарушений в ходе развития ПЗ характеризовались нелинейностью (рис. 4д–4е). Зависимость стерильности зрелой пыльцы от дозы УФ носила отрицательный, а

от гамма-облучения – положительный характер. С возрастанием дозы ультрафиолета число аномальных пыльцевых зерен сначала возрастало (до 11.3%), а затем снижалось (до 9 и 3.8%) (рис. 4а, 4д). При максимальной экспозиции ультрафиолета уровень стерильности пыльцы приближался к контролю. Отмечена положительная корреляция между цитомиксисом и числом патологий на стадии тетрад (0.7) и микроспор (0.9). Однако



**Рис. 6.** Зрелые пыльцевые зерна (ПЗ): а – нормальные (контроль), б, в – полиморфизм ПЗ (б – 2.2 кДж/м<sup>2</sup>, в – 40 Гр); г – двуядерное “малоплазменное” ПЗ (20 Гр); д – поздняя дегенерация спермиев в зрелом ПЗ (40 Гр); е – морфологические признаки апоптозной гибели спермиев и ядра вегетативной клетки при дегенерации ПЗ (40 Гр); ж – наполненные (продуктивные) пыльники в опытном варианте (4.3 кДж/м<sup>2</sup>); з, и – флуоресценция каллозы в оболочке зрелого ПЗ (з – контроль, и – 4.3 кДж/м<sup>2</sup>); а–е – окраска ацетокармином, ж–и – смесь флуоресцентных красителей.

между интенсивностью ЦМ и стерильностью ПЗ наблюдалась отрицательная корреляция ( $-0.32$ ).

При гамма-воздействии дозовые зависимости носили иной характер (рис. 4б, 4е). Положительная корреляция между ЦМ и патологиями в тетрадах ( $0.4$ ) сменялась на отрицательную между ЦМ и стерильностью микроспор ( $-0.9$ ). Уровень стерильность двуклеточных ПЗ увеличивался до 9% (при 20 Гр), а затем снижался до 6% (при 40 Гр), в то время как стерильность трехклеточных ПЗ возрастала с 6 до 19%. Заметная разница между показателями стерильности дву- и трехклеточных ПЗ объясняется заметным вкладом в стерильность зрелых ПЗ случаев поздней инактивации спермиев. Между интенсивностью ЦМ и стерильностью двуклеточных ПЗ наблюдалась высокая положительная корреляция ( $0.99$ ), а с трехклеточными ПЗ – слабopоложительная ( $0.09$ ).

Итак, ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной сфере растений. Большинство цитологических повреждений характеризовалось неспецифичностью и проявлялось в виде активизации ЦМ, гиперсекреции каллозы в микроспорогенезе, возрастании полиморфизма микроспор и ПЗ, “рассинхронизации” гаметогенеза, увеличения числа “малоплазменных” ПЗ. Специфические нарушения, индуцированные гамма-облучением, состояли в поздней инактивации спермиев в зрелом ПЗ. Отмечена негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых ПЗ (при УФ-В-облучении).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной системе растений, большая часть из которых характеризовалась неспецифичностью. Особенностью развития микроспороцитов в опытных вариантах была гиперсекреция каллозных отложений. Основным типом патологии микроспорогенеза является активизация цитомиксиса. Структурно-функциональные аспекты инициации цитомиксиса еще во многом остаются не ясными. Мы отмечали, что усиление активности цитомиксиса сопровождалось прерыванием контактов между МСЦ и тапетумом, увеличением толщины каллозных отложений на клеточных стенках микроспороцитов и образованием камер с мощными каллозными пе-

регородками в тех частях пыльника, которые были охвачены интенсивным и/или деструктивным цитомиксисом.

Функции каллозы в генеративной сфере растений многообразны. Известно, что она действует как молекулярный фильтр, несет защитную, влагосберегающую и изолирующую функции, локализует распространение цитолитических процессов, участвует в углеводном метаболизме, обеспечивая микроспоры углеводами, и входит в состав экзины (Heslop-Harrison, 1966a, b; Барская, Балина, 1971; Поддубная-Арнольди, 1976; Pacini, 1994; Nishikawa et al., 2005; и др.). Нарушение синтеза каллозы рассматривается как один из механизмов возникновения отклонений в процессе микроспорогенеза и формирования ПЗ под воздействием стресса (Dubois et al., 1990; Lalonde et al., 1997; Mamun et al., 2006). Нарушения синтеза и/или гидролиза каллозы, наблюдаемое у растений с цитоплазматической мужской стерильностью, а также под влиянием неблагоприятных экологических факторов (водного дефицита, высокой температуры и др.) подтверждают важную роль метаболизма каллозы в мужской репродукции (De Vries, 1970; Lalonde et al., 1997; Mamun et al., 2006; Попова и др., 2008). Один из механизмов нарушений метаболизма каллозы может быть связан с изменением ритма энзиматической активности каллозы, которая синтезируется клетками тапетума (Tsuchiya et al., 1995). Нарушения синтеза и гидролиза каллозы в условиях абиотического стресса могут быть результатом отклонений в общем углеводном обмене, что отмечено рядом авторов на основе анализа генной экспрессии у стерильных и фертильных линий риса (Kong et al., 2007). Исходя из результатов нашего исследования, добавим, что нарушения метаболизма каллозы в МСЦ, а также переключение трофических связей последних с тапетальных клеток на окружающие клетки МСЦ посредством цитомиктических каналов (в случае прерывания контакта с тапетумом) вероятно является важной функциональной составляющей феномена цитомиксиса.

Количественный анализ индукции нарушений в ходе микроспорогенеза выявил нелинейность дозовых зависимостей при облучении ультрафиолетом и гамма-облучением. Как ни парадоксально, но повреждения, индуцированные малыми дозами ультрафиолета, не устранялись ни репарацией, ни клеточным отбором, и сохранялись во многих клеточных поколениях. Они оставались недоступными действию гаплонтного отбора, определяя относительно высокий (9–11%) процент стерильности ПЗ. Только с повышением экспозиции УФ-В “включались” восстановительные механизмы, среди которых заметную

роль играл цитомиксис. Перегиб дозовой кривой и формирование дозонегативного участка дают основание говорить о пороговом эффекте в реакции на ультрафиолет, обусловленном, вероятно, числом повреждений ДНК и других макромолекул, запускающих репарационные процессы и клеточный отбор. Известно, что в ответ на возрастание уровня цитогенетических повреждений сначала активизируются системы репарации ДНК, а затем — апоптозной гибели клеток с нерепарируемыми повреждениями (Календо, 2000). В отношении гамма-облучения пороговый уровень повреждения формировался при дозе около 20 Гр (см. рис. 1).

Отрицательная корреляция между цитомиксисом и стерильностью ПЗ при УФ-В облучении и между цитомиксисом и стерильностью микроспор при гамма-воздействии, вероятно, указывают на функцию ЦМ как клеточного (внутриорганизменного) отбора. Позитивная корреляция между активностью цитомиксиса и числом анеуплоидных микроспороцитов (Malallah, 2011) также свидетельствует в пользу такого предположения. Согласно данным литературы, зависимость между цитомиксисом и жизнеспособностью пыльцы носит как негативный (Sapre, Deshpande, 1987), так и позитивный характер (Falistocco et al., 1995), или чаще, слабопозитивный (Bellucci et al., 2003; Singhal et al., 2008; Kumar, Singhal, 2008), что предполагает влияние другого, кроме цитомиксиса, фактора на жизнеспособность пыльцы. Таким фактором, в общем случае, по-видимому, является внутриорганизменная генетическая гетерогенность и, как следствие, геномная нестабильность мутантов, гибридов, анеуплоидов и полиплоидов. Популяция микроспороцитов у таких растений чаще всего представляет генетическую мозаику (Орлова, 1976). Радиация повышает генетическую гетерогенность растений и, таким образом, активизирует клеточный отбор. Мы полагаем, что цитомиксис является формой клеточного (предмейотического) отбора, который активизируется с превышением порогового уровня повреждения (или дисбаланса) микроспороцитов. Нерегулярность цитомиксиса косвенно подтверждает данное предположение. Новизна выдвигаемой идеи состоит в том, что цитопалогия и клеточная гибель, сопровождающие цитомиксис у растений с нарушенным гомеостазом, рассматриваются как механизм индуцированной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых клеток. Включение этого механизма носит пороговый характер.

Связь клеточного отбора с восстановительными процессами после облучения впервые была отмечена нами при исследовании микроспороге-

неза в потомстве мягкой пшеницы, подвергшейся воздействию острого и хронического облучения в зоне ЧАЭС. Мы установили, что интенсивный цитомиксис, охватывающий и предмейотический митоз, обычно наблюдался в тех линиях, где число нарушений в последующем ходе мейоза было меньшим, и, наоборот, у линий с большим количеством цитопатологий активность цитомиксиса была ниже (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 2007). Дальнейшие исследования ЦМ у ржи и ячменя при использовании острого облучения подтвердили эту зависимость (Кравец, 2008, 2009, и др.). Действительно, с активизацией ЦМ обычно растет и количество аномалий в мейозе, но при завершении микроспорогенеза и в ходе гаметогенеза число нарушений, как правило, снижается и фертильность пыльцы сохраняется относительно высокой. Из устного сообщения (Козуб и др., неопубл. данные), при облучении сухих семян пшеницы (*Triticum aestivum*, сорт Безостая 1) в высоких дозах (200 Гр) в микроспорогенезе наблюдались сильнейшая активизация цитомиксиса с множественными нарушениями мейоза, тем не менее, фертильность пыльцы сохранялась, а озерненность колосьев оказывалась даже более высокой, чем при использовании меньших доз облучения. Поскольку продуктивность пыльцы обычно значительно перекрывает ее реальную потребность, цитомиксис (невзирая на присущее ему более или менее выраженное деструктивное начало) скорее способствует сохранению фертильности ПЗ, чем ее потере.

Итак, мы полагаем, что благодаря цитомиксису, популяция МСЦ в ходе мейоза избавляется от избыточной генетической неоднородности и мутационного груза. Кроме того, посредством цитомиксиса может осуществляться регуляция численности функционирующих МСЦ и устраняться их избыточность, что подтверждается преимущественной приуроченностью цитомиксиса к видам с крупными пыльниками и многочисленными МСЦ (Herrero, 2003). В этом понимании нам близка точка зрения на цитомиксис как на выживание одной части популяции МСЦ за счет гибели другой (Миляева, 1965; Кравченко, 1977). Действительно, стерилизация части спорогенных клеток и МСЦ, которые становятся источником дополнительного питания для сохраняющихся МСЦ — нередкое явление у покрытосеменных растений (Магешвари, 1954). Можно ожидать, что стерилизации подвергаются как наиболее удаленные МСЦ дистальной части пыльника, так и генетически несбалансированные клетки. В предыдущих работах мы уже рассматривали роль феномена клеточного отбора и, близкого по смыслу термина “клеточная конкуренция”, в восстановительных и адаптивных процессах расте-

ний после облучения (Кравец, 2008, 2009, 2011). Суть феномена клеточной конкуренции (логически обоснованной еще А. Вейсманом (Weismann, 1892) в современной интерпретации состоит в том, что внутри многоклеточного организма различия по темпам пролиферации между aberrantными и нормальными клетками приводят к элиминации медленно пролиферирующих клеток. Как правило, гибель aberrantных репродуктивных клеток происходит в течение нескольких, обычно 3–5, клеточных поколений (Ганасси, 1976). У генетических мозаик, применительно к морфогенезу, такую конкуренцию выигрывают “генетически здоровые” клетки дикого типа, которые вытесняют мутантные клоны (Díaz, Moreno, 2005; Wei, Baker, 2007; Tyler et al., 2007). За последние десятилетия гипотеза клеточной конкуренции получила широкое развитие и ее, наряду с морфогенетическим апоптозом, стали рассматривать как тип клеточной гибели, имеющий решающее значение для обеспечения нормального развития и поддержания здорового состояния различных органов (Gallant, 2005; Moreno, 2006). Реализация клеточной конкуренции осуществляется через, так называемый автономный апоптоз, который в отличие от морфогенетического апоптоза, не запускается “сверху” (т.е. не программируется), а инициируется внутри самой клеточной популяции (Takashi, O’Connor, 2004).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитомиксис можно охарактеризовать как широко распространенное, но не регулярное явление цитологического, генетического, физиологического и информационного характера, свойственное вегетативным и генеративным тканям как в норме, так и при патологии. На сегодняшний день среди исследователей так и не существует однозначного мнения относительно его природы и значения. Интерпретация проявлений цитомиксиса и оценка его биологической роли осложняются значительным варьированием активности этого феномена и, связанными с ней, различными цитологическими и генетическими последствиями. Деструктивные последствия цитомиксиса усиливают разнообразные стрессовые факторы. Важную роль цитомиксис играет в репродуктивной сфере растений. Обеспечивая информационный контакт между клетками, он одновременно сопровождает избирательную дифференциацию клеток половых путей и элиминацию избыточных клеток как у растений, так и животных. Благодаря цитомиксису, достига-

ются пространственная непрерывность и объединение МСЦ в единую ценоцитную систему пыльника, синхронизация мейоза и одновременность созревания ПЗ в пределах микроспорангия. С другой стороны, ЦМ вносит определенный вклад в формообразовательный процесс, влияет на генетическое разнообразие, увеличивает уровень гетерозиготности и миксоплоидию, имеет адаптивное значение. Зависимость между цитомиксисом и жизнеспособностью пыльцы носит чаще всего слабopозитивный характер. Выявленная негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых ПЗ (при УФ-В-облучении) у ячменя позволяет полагать, что цитомиксис у видов с внутриорганизменной генетической гетерогенностью служит инструментом клеточного отбора. Активизация цитомиксиса, по-видимому, связана с превышением порогового уровня повреждения (или генетического дисбаланса) микроспороцитов. Функциональное назначение цитомиксиса состоит также в обеспечении дополнительной трофики МСЦ – с его помощью может осуществляться регуляция численности одних (функционирующих) микроспороцитов за счет гибели других. Вероятно, в общем случае цитомиксис представляет собой форму переноса информации в соответствии с продольным градиентом пыльника, благодаря чему происходит отбор (индуцируется гибель) поврежденных и избыточных микроспороцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барская Е.И., Балина Н.В.* О роли каллозы в пыльниках растений // Физиология растений. 1971. 18. № 4. С. 716–721.
- Батыгина Т.Б.* Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206 с.
- Ван С.Ю., Юй Ч.Х., Ли С., Ван Ч.И., Чжен Г.Ч.* Ультраструктура и возможное происхождение цитоплазматических каналов, обеспечивающих связь между клетками вегетативных тканей пыльников // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 1. С. 110–120.
- Ганасси Е.Э.* Радиационное повреждение и репарация хромосом. М.: Наука, 1976. 103 с.
- Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П.* Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // Цитология и генетика. 1996. Т. 30. № 3. С. 36–45.
- Календо Г.С.* Различные уровни радиозащиты в популяции опухолевых клеток // Радиационная биология. Радиационная экология. 2001. Т. 41. № 5. С. 519–527.

- Кравец Е.А. Клеточный отбор в онтогенезе растений и его значение для формирования адаптации к облучению // Научны труды Николаевского гос. ун-та им. Петра Могилы. 2008. Вып. 89. Т. 102. С. 98–104.
- Кравец Е.А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 1. С. 11–22.
- Кравец Е.А. Цитомиксис, его природа, значение и цитологические последствия // Цитология и генетика. 2012. № 3. С. 75–85.
- Кравченко Л.Н. Особенности мейоза у пшеницы и ее гибридов. Кишинев: Штиинца, 1977. 159 с.
- Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 723 с.
- Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Жебраковские чтения. III. Минск: Право и экономика, 2011. 56 с.
- Магешвари П. Эмбриология покрытосеменных. М.: ИЛ, 1954. 439 с.
- Миляева Э.Л. К вопросу о цитомиксисе в процессе микроспорогенеза // Бюллетень Гл. бот. Сада АН СССР. 1965. Вып. 59. С. 53–57.
- Мурсалимов С.Р. Исследование цитомиксиса в микроспорогенезе табака (*Nicotiana tabacum* L.) разного уровня ploидности. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2012. 18 с.
- Мурсалимов С.Р., Байбородин С.И., Сидорчук Ю.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Особенности формирования цитомиксисических каналов в материнских клетках пыльцы *Nicotiana tabacum* L. // Цитология и генетика. 2010. Т. 44. № 1. С. 19–24.
- Мурсалимов С.Р., Дейнеко Е.В. Цитомиксис в образцах из природных популяций *Dactylis glomerata* L. (POACEAE) // Информационный Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 772–777.
- Орлова И.Н. Цитомиксис. В кн. Эмбриология цветковых растений. Т. 1. СПб.: 1994. С. 115–117.
- Орлова И.Н. Причины мозаичности спорогенной ткани по числам хромосом в микроспороцитах гексаплоидных тритикале // Генетика. 1976. Т. 12. № 12. С. 7–13.
- Остапенко Е.К., Виленский Е.Р., Науменко В.Д., Бубряк И.И., Гродзинский Д.М. Генетические нарушения в пыльцевых клетках ячменя ваху в условиях радиоактивного загрязнения после Чернобыльской аварии // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 5. С. 11–19.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 507 с.
- Попова А.Ф., Иваненко Г.Ф., Устинова А.Ю., Заславский В.А. Локализация каллозы в микроспорах и пыльцевых зернах растений *Sium latifolium* L. в условиях разного водного режима // Цитология и генетика. 2008. 42. № 6. С. 3–7.
- Романов И.Д. Особенности развития пыльцы злаков и значение их для некоторых генетических исследований // Генетика. 1970. Т. 6. № 10. С. 11–25.
- Романов И.Д., Орлова И.Н. Цитомиксис и его последствия в микроспороцитах *Triticale* // Генетика. 1971. Т. 7. № 12. С. 5–13.
- Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) мутантным фенотипом // Цитология. 2007. Т. 49. № 10. С. 870–875.
- Стельмах О.А., Кравец Е.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Особенности репродуктивного развития мутантов *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к изопропил-N-фенилкарбамату // Цитология и генетика. 2005. Т. 39. № 6. С. 15–23.
- Шкутина Ф.М., Хвостова В.В. Цитологический анализ пшенично-ржаных амфидиплоидов // Экспериментальная полиплоидия в селекции растений. М., 1966. С. 261.
- Шкутина Ф.М., Козловская В.Ф. Цитомиксис в мейозе у некоторых гибридных гибридных форм злаков подтрибы *Triticinae* // Генетика. 1874. Т. 10. № 5. С. 5–12.
- Шнайдер Т.М. Особенности мейоза у отдаленных гибридов пшеницы, полученных с участием мутанта *ph* // Цитология и генетика. 1988. Т. 22. № 3. С. 18–22.
- Arnoldi M. Beitrage zur Morphologie der Gymnospermen. IV. Was sind die "Keimblaschen" Oder "Hofmeisters-Korperchen" in der Eizelle der Abietineen? // Flora. 1900. V. 87. S. 194–204.
- Bahl J.R., Tyagi B.R. Cytomixis in pollen mother cells of *Papaver dubium* L. // Cytologia. 1988. V. 53. P. 771–775.
- Basavaiah D., Morthy T.C.S. Cytomixis in pollen mother cells of *Urochloa panicoides* P. Beauv. (*Poaceae*) // Cytologia. 1987. V. 52. P. 69–74.
- Bhatt A.M., Lister C., Page T., Fransz P., Findlay K., Jones G.H., Dickinson H.G., Dean C. The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family // Plant J. 1999. V. 19. P. 463–472.
- Bedi Y.S. Cytomixis in woody species // Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.). 1990. V. 100. P. 233–238.
- Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in the Pollen Mother Cells of *Medicago sativa* L. // J. Heredity. 2003. V. 94. № 6. P. 512–516.
- Bobak M., Herich R. Cytomixis as a manifestation of pathological changes after the application of trifluraline // Nucleus. 1978. V. 21. P. 22–26.
- Caetano-Pereira C.M., Pagliarini M.S. Cytomixis in maize microsporocytes // Cytologia. 1997. V. 62. P. 351–355.
- Carlson J.G., Handel M.A. Intracellular bridges and factors determining their patterns in the grasshopper testis // J. Morphol. 1988. V. 196. P. 173–185.
- Dagne K. Meiosis in interspecific in *Guizotia* Cass. (Compositae) // Hereditas. 1994. V. 121. P. 119–129.
- Díaz B., Moreno E. The competitive nature of cells // Exp. Cell Res. 2005. 306. P. 17–322.
- Digby L. Observation on "chromatin bodies" and their relation to the nucleolus in *Galtonia candicans* Decsne // Ann. Bot. 1909. V. 23. P. 491–502.



- Dubois T., Guedira M., Dubois J., Wasseur J.* Direct somatic embryogenesis in root of *Cichorium*: is callose an early-marker? // *Ann. Bot.* 1990. 65. № 5. P. 539–545.
- Dumas C., Knox R.B., Gaude T.* The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica* // *Protoplasma.* 1985. V. 124. P. 168–174.
- Dwivedi N.K., Sikdar A.K., Jolly M.S., Susheelamma B.N., Suryanarayana N.* Induction of tetraploidy in colchicine-induced mutant of mulberry. 1. Morphological and cytological studies in cultivar Kanva-2 // *Indian J. Genet.* 1988. V. 48. P. 305–311.
- Falistocco E., Tosti N., Falcinelli M.* Cytomixis in pollen mother cells of Diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes // *J. Heredity.* 1995. V. 86. P. 448–453.
- Fraser A.C.I.* The behavior of the chromatin in the meiotic division of *Vicia faba* // *Ann. Bot.* 1914. V. 28. P. 633–642.
- Gallant P.* Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation // *Cancer Research.* 2005. 65. P. 6485–6487.
- Gates R.R.* Pollen formation in *Oenotera gigas* // *Ann. Bot.* 1911. V. 25. P. 909–940.
- Gates R.R., Rees E.M.* A cytological study of pollen development in *Lactuca* // *Ann. Bot.* 1921. V. 35. P. 365–398.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Kolomietz O.D.* Haplontic cell selection as reactive and adaptive action of plants at conditions of chronic irradiation // *Proc. Int. sem. Environment protection.* Uzhorod, 1997. V. 2. P. 7–10.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Khvedinich O.A., Kolomietz O.D.* Effect of chronic irradiation on reproductive system of winter wheat / Current problems of radiation research. Proc. 35th annual Meeting of the Europ. Rad. Res. Society. Kyiv. 2007. P. 26–41.
- Cheng K.C., Wang Y.C.* The general occurrence and regularity of the intercellular migrating chromatin 25 substance in the pollen mother cells of certain angiosperms // *Acta Bot. Sin.* 1956. V. 5. P. 363–376.
- Gallant P.* Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation // *Cancer Research.* 2005. 65. P. 6485–6487.
- Gaulden M.E.* Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations // *Mutagenesis.* 1987. 2. P. 57–365.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Khvedinich O.A., Kolomietz O.D.* Effect of chronic irradiation on reproductive system of winter wheat / Current problems of radiation research. Proc. 35th annual Meeting of the Europ. Rad. Res. Society. Kyiv. 2007. P. 26–41.
- Guang-Qin Guo, Guo-Chang Zheng.* Hypothesis for functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms // *J. Theor. Biol.* 2004. V. 229. P. 139–146.
- Hecht N.B.* Intercellular and intercellular transport of many germ cell mRNAs mediated by the DNA-binding protein, testis-brain-RNA-binding protein (TB-RBP) // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. V. 56. P. 252–253.
- Herrero M.* Male and female synchrony and regulation of mating in flowering plants // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 2003. 358. P. 1019–1024.
- Heslop-Harrison J.* Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes // *Ann. Bot.* 1966a. V. 30. P. 221–230.
- Heslop-Harrison J.* Cytoplasmic continuity during spore formation in flowering plants // *Endeavour.* 1966b. V. 25. P. 65–72.
- Kamra O.P.* Chromatin extrusion and cytomixis in pollen mother cells of *Hordeum* // *Hereditas.* 1960. V. 46. P. 592–600.
- 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.
- Körnicker M.* Über Ortsveränderung von Zellkärnern. S.B. Niederrhein // *Ges. Natur.* 1901. U Heilkunde Bonn. A. P. 14–25.
- Kravets E.* The role of cell selection for pollen grain fertility after treatment of barley sprouts (*Hordeum distichum* L.) with UV-B irradiation // *Acta Biol. Slov.* 2011. 54. P. 31–41.
- Kumar P., Singhal V.K., Kaur D., Kaur S.* Cytomixis and associated meiotic abnormalities affecting pollen fertility in *Clematis orientalis* // *Biologia Plantarum.* 2010. V. 54. P. 181–184.
- Kumar P., Singhal V.K.* Cytology of *Caltha palustris* L. (Ranunculaceae) from cold regions of Western Himalayas // *Cytologia.* 2008. V. 73. P. 137–143.
- Kumar P., Singhal V.K.* Male meiosis, morphometric analysis and distribution pattern of 2x and 4x cytotypes of *Ranunculus hirtellus* Royle, 1834 (Ranunculaceae) from the cold regions of Northwest Himalayas (India) // *Comparative Cytogenetics.* 2011. 5. V. 3. P. 143–161.
- Kwiatkowska M.* Plasmodesmal changes are related to different developmental stages of anteridia of *Chara* species // *Protoplasma.* 2003. V. 222. P. 1–11.
- 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. № 5. P. 629–637.
- 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.
- Levan A.* Syncyte formation in the pollen mother cells of haploid *Phleum pratense* // *Hereditas.* 1941. V. 27. P. 243–252.
- Liu H., Guo G.-Q., He Y.-K., Lu Y.-P., Zheng G.-C.* Visualization on intercellular movement of chromatin in intact living anthers of transgenic tobacco expressing histone 2B-CFP Fusion Protein // *Caryologia.* 2007. V. 60. № 1–2. P. 1–20.
- Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Y.B.* UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line // *Environ Exp. Bot.* 2010. V. 68. P. 51–57.
- 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.
- 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.
- Mantu D.E., Sharma A.K.* Cytomixis in pollen cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (L.) Alston // *Cytologia.* 1982. V. 48. P. 201–207.
- Mascarenhas J.P.* The male gametophyte of flowering plants // *Plant Cell.* 1989. V. 1. P. 657–664.

- Mascarenhas J.P.* Gene activity during pollen development // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990. V. 41. P. 317–338.
- Miehe H.* Ueber Wanderungen des pflanzlichen Zellkernes // *Flora.* 1901. V. 88. P. 105–142.
- Mogensen H.L.* The male germ unit: concept, composition, and significance // *Int. Rev. Cytol.* 1992. V. 140. P. 129–147.
- Moreno E.* Discovery of “Programmed cell competition” among stem cells. Cellular Competition Group. Overview. Molecular Oncology Programme (update 31.03.2006) // <http://www.cnio.es/ing/grupos/plantillas>
- Morisset P.* Cytomixis in the pollen mother cells of *Ononis (Leguminosae)* // *Can. J. Genet. Cyt.* 1978. V. 20. P. 383–388.
- Mursalimov S.R., Deineko E.V.* An ultrastructural study of microsporogenesis in tobacco line SR1 // *Biologia.* 2012. V. 67. № 2. P. 369–376.
- Narain P.* Chromosome mosaicism in microsporocytes of *Gloriosa* // *Cytologia.* 1980. V. 45. P. 271–279.
- Nirmala C., Kaul M.L.H.* Male sterility in pea. Y1 Gene action duplicity // *Cytologia.* 1994. V. 59. P. 195–201.
- Nishikawa S.I., Zinkl G.M., Swanson R.G. et al.* Callose ( $\beta$ ,1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // *Plant Biol.* 2005. 22. № 5. P. 1345–1352.
- Nowva N.* Some cytological observations in *Trielystis*, *Sagittaria* and *Lilium* // *Tokyo Bot. Mag.* 1928. V. 42. P. 33–36.
- de Oliveira V.M., Forni-Martins E.R., Magalhães P.M., Alves M.N.* Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae) // *Gen. Mol. Biol.* 2004. V. 27. P. 215–222.
- Owen H.A., Makaroff C.A.* Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype *Wassilewskija* (Brassicaceae) // *Protoplasma.* 1995. V. 185. P. 7–21.
- 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.
- Quang-Qin Guo, Guo-Chang Zheng.* Hypotheses for the function of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms // *J. Theoret. Biol.* 2004. V. 229. P. 139–146.
- Risueno M.C., Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., R-Garsia M.I.* Connexions between meiocytes in plants // *Cytologia.* 1969. V. 34. P. 262–272.
- Rezaglia K.S., Garbary D.J.* Motile male gametes of land plants: diversity, development and evolution // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2001. V. 20. P. 107–213.
- Russel S.D.* Isolation and characterization of sperm cells in flowering plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991. V. 42. P. 189–204.
- Sapre A.B., Deshpande D.S.* A change in chromosome number due to cytomixis in an interspecific hybrid of *Coix. L.* // *Cytologia.* 1987. V. 52. P. 167–174.
- Singhal V.K., Gill B.* Cytomixis in some woody species // *Biologica.* 1985. V. 1. P. 168–175.
- 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.
- Singhal V.K., Kaur S., Kumar P.* Aberrant male meiosis, pollen sterility and variable sized pollen grains in *Clematis montana* Buch.-Ham. ex DC. from Dalhousie hills, Himachal Pradesh // *Cytologia.* 2010. V. 75. P. 31–36.
- Soman T.A., Bhavanandan K.V.* Temperature sensitive cytomixis in *Helicanthes elastic* (Desr) Dans (Loranthaceae) // *Cytologia.* 1993. V. 58. P. 21–26.
- de Souza A.M., Pagliarini M.S.* Cytomixis in *Brassica napus* var. *Oleifera* (Brassicaceae) // *Cytologia.* 1997. V. 62. P. 25–29.
- Stern H.* The formation of polynucleated pollen mother cells // *Jour. Hered.* 1946. V. 37. P. 47–50.
- Takashi Yamada A., O'Connor M.B.* Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: cell competition and morphogenetic apoptosis // *J. Biochem.* 2004. V. 136. № 1. P. 13–17.
- Takats S.T.* Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis // *Chromosoma.* 1959. V. 10. P. 430–453.
- Tarkowska J.* Experimental analysis of the mechanism of cytomixis. I. Cytomixis in vegetative tissues // *Acta Soc. Bot. Poland.* 1965. V. 34. P. 27–44.
- Tarkowska J.* Experimental analysis of the mechanism of cytomixis. II. Cytomixis in the pollen mother cells of the lily – *Lilium candidum* L. // *Acta Soc. Bot. Poland.* 1966. V. 35. P. 25–40.
- Tarkowska J.* The nature of cytomixis // *Caryologia.* 1973. V. 25. Suppl. P. 151–157.
- Tsuchiya T., Toriyama T., Yoshikawa M. et al.* Tapetum, specific expression of the gene for an endo- $\beta$ -1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco // *Plant Cell Physiol.* 1995. V. 36. № 3. P. 487–494.
- Tyler D.M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B., Baker N.E.* Genes Affecting Cell Competition in *Drosophila* // *Genetics.* 2007. V. 175. P. 643–657.
- Ventela S., Toppari J., Parvinen M.* Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2768–2780.
- De Vries A.* Electron microscopy on anther tissue and pollen of male sterile and fertile wheat *Triticum aestivum* L. // *Euphytica.* 1970. V. 19. № 2. P. 103–120.
- Wei Li and Baker N. E.* Engulfment is required for cell competition // *Cell.* 2007. V. 129. P. 1215–1225.
- Weismann A.* Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung, Jena, 1892.
- Welan E.D.P.* Discontinuities in the callose wall, intermeiocyte connections and cytomixis in angiosperm meiocytes // *Can. J. Bot.* 1974. V. 52. P. 1219–1224.
- Woodworth R.H.* Cytomixis // *Jour. Arnold Arboretum.* 1931. V. 12. P. 23–25.
- Yen C., Yang J.-L., Sun G.-L.* Intermeiocyte connections and cytomixis in intergeneric hybrids of *Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski with *Psathyrostachys huashanica* Keng // *Cytologia.* 1993. V. 58. P. 87–193.
- Zheng G.C., Yang Q.R., Zheng Y.R.* The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in lily // *Caryologia.* 1987. V. 40. P. 243–259.

## Cytomixis and Its Role in the Regulation of Plant Fertility

E. A. Kravets

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 04123 Ukraine  
e-mail: kravetshelen@gmail.com*

**Abstract**—UV and gamma irradiation of barley seedlings induces an increase in the number of various pathologies in the male reproductive system of plants. The majority of cytological abnormalities are rather non-specific. The main type of the observed pathologies of microsporogenesis is cytomixis, whose activation correlates with a callose hypersecretion in microsporocyte walls. A negative correlation between cytomixis and the sterility of microspores (in the case of gamma irradiation) or the sterility of mature pollen grains (in the case of UV-B irradiation) is revealed. It is supposed that cytomixis represents a kind of a premeiotic cell selection in plants characterized by an intraorganismic genetic heterogeneity (mosaics). The novelty of the idea is that the cytopathology that accompanies cytomixis is considered as a mechanism of the induced death of genetically imbalanced or nonrepairable cells, which is intended to keep the fertility of a male reproductive system. The activation of this mechanism has a threshold character.

**Keywords:** cytomixis, microsporogenesis, callose hypersecretion, pollen grain sterility, cell selection, mosaicism, UV-B and gamma irradiation, *Hordeum distichum* L.