

УДК 591

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЦИТОМИКСИСА ВЛИЯЕТ НА МИКРОСПОРОГЕНЕЗ У *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae)

© 2012 г. Г. Кумар, Р. С. Ядав

Кафедра ботаники, лаборатория генетики растений Аллахабадского Университета
Аллахабад 211002, Индия

E-mail: ramsyadav.au@mail.com

Поступила в редакцию 15.10.10 г.
Окончательный вариант получен 27.02.11 г.

Цитомиксис был обнаружен при микроспорогенезе у растений кунжута (*Sesamum indicum* L.), относящегося к семейству Pedaliaceae. Явление цитомиксиса наблюдалось на разных фазах мейоза в растениях из семян, обработанных 0.5% азидом натрия. Цитомиксис проявлялся при образовании цитоплазматических каналов и при непосредственном слиянии материнских клеток пыльцы, причем первый вариант встречался гораздо чаще. Миграция ядерного содержимого от донора к клетке (клеткам)-рецепторам охватывала все хромосомы или часть хроматина. Также наблюдалось некоторое количество совершенно пустых мейоцитов. При обработке азидом в различных концентрациях было выявлено слипание, нарушенное и замедленное движение хромосом, нарушение его ориентации и микроядра. При повышении дозы азид натрия заметно возрастал процент материнских клеток пыльцы, у которых обнаруживались цитомиксис и нарушения хромосом. Цитомиксис приводил к нарушению мейоза, снижению жизнеспособности пыльцы и появлению пылевых зерен различного размера.

Ключевые слова: азид натрия, цитомиксис, кунжут, микроспорогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Явление миграции ядерного материала от одной материнской клетки пыльцы к другой, известное как цитомиксис, довольно широко распространено в природе и описано у многих видов растений (Kamra, 1960; Heslop-Harrison, 1966; Shneider, 1975). Как правило, оно наблюдается в самих материнских клетках пыльцы (Caetano-Pereira, Raggiarini, 1997). Чаще всего цитомиксис происходит в профазе первого мейотического деления (Vaughan, 1987; Feijo, Pais, 1995). Несколькими авторами были описаны случаи миграции ядерного содержимого на других фазах мейоза, в том числе и на стадии тетрад (Falistocco и др., 1995). Цитомиксис характеризуется передвижением хроматина или хромосом между ближайшими мейоцитами через цитоплазматические каналы или межклеточные мостики. Однако в некоторых случаях во время мейоза плазмодесмы сохраняются и увеличиваются в размерах, формируя цитомиктические соединения. Они получили название цитомиктических каналов, их ширина позволяет осуществлять продвижение органелл цитоплазмы, а в некоторых случаях и хроматина (Risueno и др., 1969). Тем не менее сохранность цитомиктических каналов оказывает большое влияние на процесс мейоза, его конечный результат и в целом на генеративное развитие данного вида. Цитомиксис чаще

встречается у видов с нестабильным геномом, а именно у гаплоидов, анеуплоидов, гибридов, мутантов, триплоидов и апомиктов (Mantu, Sharma, 1983). Известны примеры того, что полиплоидные формы чаще проявляют цитомиксис, чем диплоидные (Basavaiah, 1987; Sheidai, 2007, 2009).

Кунжут (*Sesamum indicum* L.) – древнее масличное растение, однако пока слабо подвергнутое селекции. Фактически кунжут – сельскохозяйственная культура главным образом развивающихся стран, хотя его выращивают на протяжении от 40° северной широты до 40° южной широты; но в этих странах недостаточно средств для долговременной поддержки исследовательских программ по выведению новых форм. Китай и Индия являются основными производителями кунжута в мире (FAO, 2004). Вместе с тем он не входит в число обязательных культур для международных научных центров растениеводства (IAEA, 2001). Семена кунжута отличаются высоким качеством жиров и белков. Кунжутное масло составляет примерно половину веса семян, оно способно долго храниться, так как содержит природные антиоксиданты, такие как сезамол и сезамин (Kamal-Eldin, 1995). Тем не менее, кунжут не признают заслуживающим внимания при разработке исследовательских программ.

Действие 0.5% азида натрия на различные показатели у растений кунжута

Дозы обработки	Число изученных материнских клеток пыльцы	Доля клеток с цитомиксисом, %	Фертильность пыльцы, %	Хромосомные аномалии, %							
				Слипа-ние	Задержанное расхождение	Нарушение ориентации	Униваленты	Мости-ки	Квадри-валент	Микро-ядра	Другие анома-лии
Контроль	178	0.6	98.00	—	—	—	—	—	—	—	—
3 ч	186	3.8	84.4	2.0	—	1.2	1.4	—	—	2.5	0.6
5 ч	159	5.4	76.2	2.9	1.1	1.8	1.6	—	0.5	3.7	0.8
7 ч	165	9.2	66.6	3.4	1.4	3.1	2.0	0.86	0.8	5.8	1.4

Данная работа посвящена последствиям цитомиксиса в связи с прохождением мейоза и последующей репродуктивной способностью данного вида. Цель исследования — провести сравнительный анализ частоты встречаемости цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у растений с мутантными фенотипами и изучить особенности его проявления на уровне хромосом, а также возможные генетические причины его возникновения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена кунжута были получены из Региональной станции Национального бюро Генетических Ресурсов Растений (Akola, Maharashtra) и Сельскохозяйственного CSA Университета (Canpur).

Обработка семян.

Семена предварительно намачивали в воде, обсушивали фильтровальной бумагой и погружали в 0.5%-ный раствор азида натрия на 3, 5 и 7 ч. Затем семена тщательно промывали водопроводной водой и раскладывали для прорастания в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу. Контрольные и опытные чашки помещали в термостат. Проросшие семена высевали для получения зацветающих растений.

Цитологические исследования.

Цветочные бутоны нужного размера фиксировали в жидкости Карнуа (уксусная кислота : этиловый спирт 1 : 3). Для приготовления давленных препаратов пыльников применяли 2% ацетокармин. В каждой пробе было 3–5 бутонов. Стадии мейоза в пыльниках смотрели у материнских клеток пыльцы на давленных препаратах. Частоту встречаемости цитомиксиса в профазе I определяли в 200–400 материнских клетках пыльцы из каждого пыльника. Фертильность пыльцы оценивали по окрашиваемости ацетокармином, поскольку стерильная пыльца не окрашивалась, а фертильная была окрашена в красный цвет. Кроме того, отмечали морфологические показатели у изучаемых растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений кунжута цитомиксис охватывал от 2 до 5 материнских клеток пыльцы в виде цитомиктических каналов. Иногда прилежащие материнские клетки пыльцы соединялись двумя (или больше) слившимися каналами различной ширины. В некоторых случаях они были настолько широкими, что прилежащие мейоциты имели тенденцию к взаимному слиянию, чтобы облегчить перенос хроматина, а иногда происходило даже прямое слияние материнских клеток пыльцы в агрегаты, состоящие из двух и трех клеток (рис. 1L и 2U). Спонтанное передвижение хроматина чаще имело место во время мейоза I и очень редко — во время мейоза II, причем более интенсивно на ранних фазах (в лептотене и метафазе I). Миграция хроматина происходила всегда в одном направлении — от донора к клетке-рецептору. В большинстве клеток миграция была неполной и совсем пустые мейоциты встречались очень редко (рис. 2N). Кроме того были обнаружены случаи соединения цитоплазмы материнских клеток пыльцы на различных фазах мейоза (рис. 2V, 2W и 2X).

Явление цитомиксиса в материнских клетках пыльцы было изучено в зависимости от длительности обработки семян азидом натрия. Оказалось, что оно гораздо чаще происходит после 7-часовой обработки, чем при более коротких экспозициях (таблица). Судя по частоте встречаемости аномалий мейоза на фазах от пахитены до тетрад, в этом варианте опыта аберрации преобладают. Частота встречаемости аберрантных материнских клеток пыльцы в диплотене/метафазе, анафазе I и анафазе II выше, чем в нормальных материнских клетках пыльцы. Отмечены различные структурные аберрации хромосом. При диакинезе был виден один квадривалент и чаще — два унивалента. В некоторых клетках вместо 13 бивалентов при диакинезе и в метафазе I обнаружено всего 12 бивалентов. Можно также заметить раннее продвижение хромосом вверх и отсутствие движения бивалентов к метафазной пластинке (рис. 1I и 1J). В некоторых случаях не происходило расхождения хромосом.

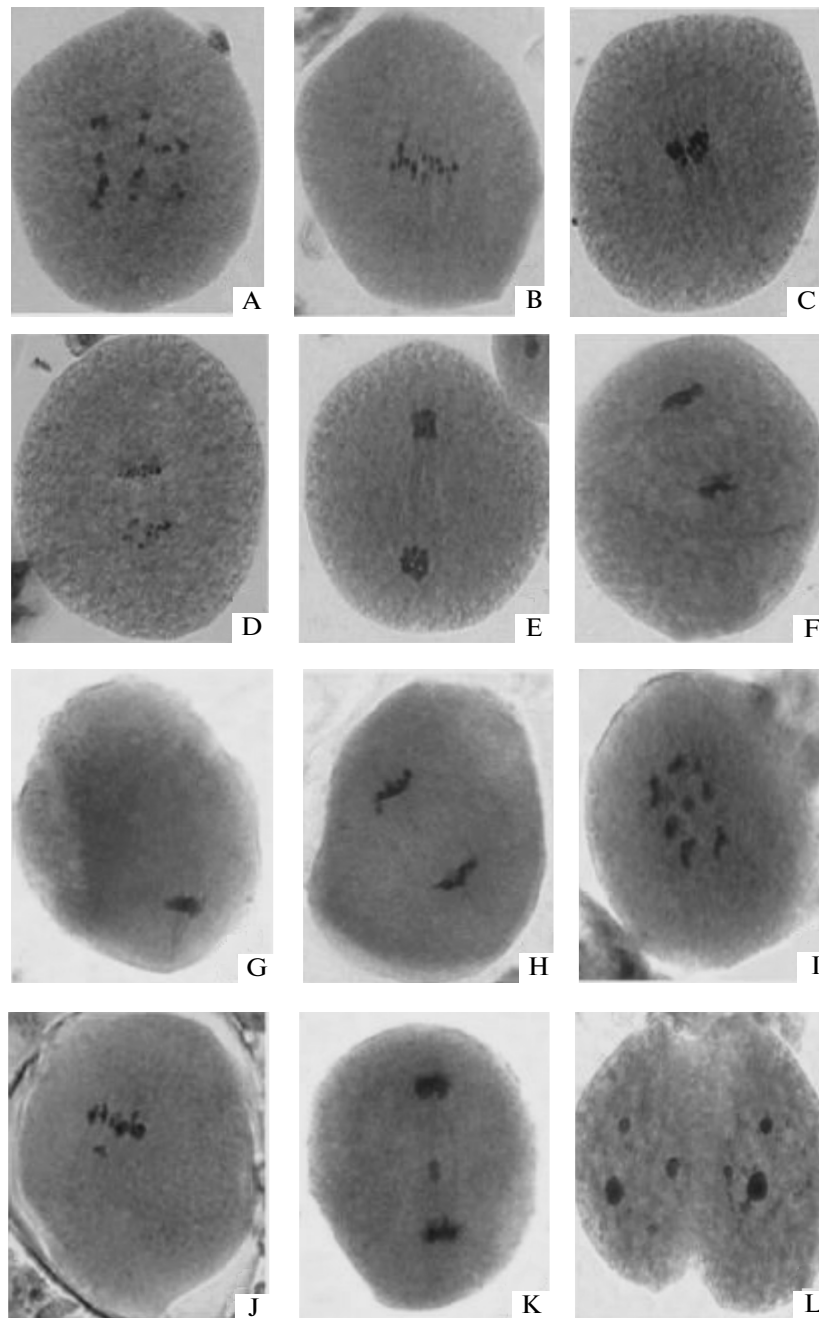


Рис. 1 (А–L). Мейоз у растений кунжута. Материнские клетки пыльцы на различных фазах мейоза.

А. Материнская клетка пыльцы в норме, содержащая 13 хромосом.

В. Метафаза I в норме.

С. Вторичная ассоциация в метафазе I.

Д. Анафаза I в норме.

Е. Слипание в анафазе I.

Ф. Нарушение ориентации в анафазе I.

Г. Миграция ядерного материала к периферии клетки.

Н. Нарушение ориентации в анафазе I.

И. Образование мультивалентов.

Ж. Замедленное движение в метафазе I.

К. Слипание в анафазе I с задержкой расхождения к полюсам.

Л. Слияние клеток, видны микроядра.

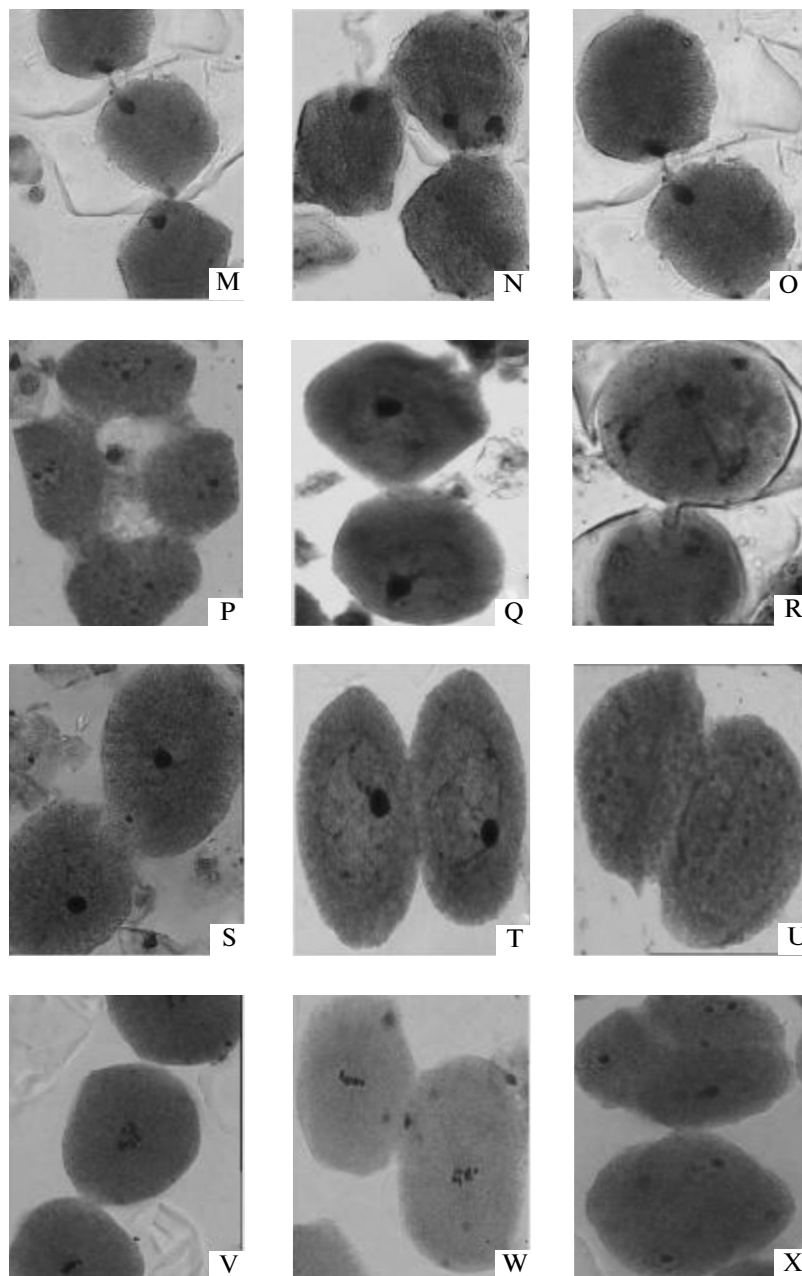


Рис. 2 (М–Х). Материнские клетки пыльцы на различных этапах цитомиксиса.

М. Цитомиксис в цепочке из трех клеток.

Н. Свободная материнская клетка пыльцы с перенесенным ядерным материалом.

О. Цитоплазматическая связь между двумя клетками.

Р. Материнские клетки пыльцы, в которых произошел случайный цитомиксис.

Q. Клетки на начальном этапе цитомиксиса.

Р. Миграция через цитомиктический канал.

С. Перенос хроматина по широкому каналу.

Т. Боковой контакт.

U. Слияние клеток.

V. Образование цепочки клеток в метафазе.

W. Боковое слияние в метафазе I.

X. Цитомиксис на поздней телофазе II.

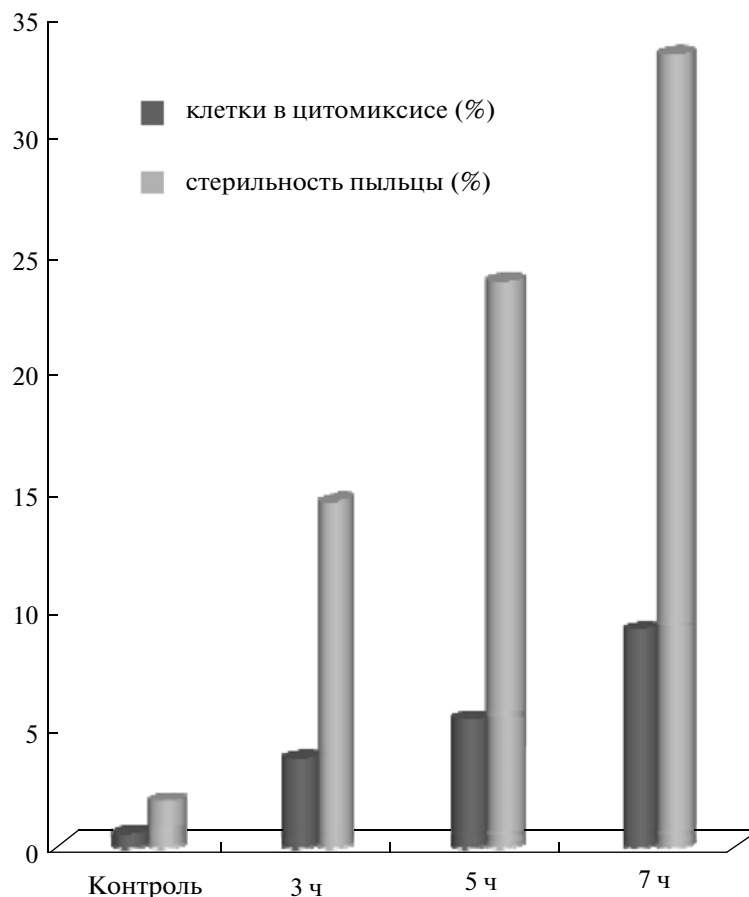


Рис. 3. Действие 0.5% азид натрия на цитомиксис и стерильность пыльцы у кунжута.

Анафаза I и анафаза II характеризуются замедленным расхождением хромосом к полюсам, наличием мостиков, фрагментов и частичным нарушением ориентации. Во время анафазы I у небольшой части клеток отмечено неравное распределение хроматина. На всех фазах мейоза I и мейоза II часто происходит слипание матрикса хромосом. В результате всех описанных нарушений на различных этапах микроспорогенеза к концу его формируются аномальные микроспоры с микроядрами, что в дальнейшем приведет к развитию пыльцевых зерен, имеющих и разный размер и, по-видимому, разное содержание хроматина. Судя по окрашиваемости пыльцы ацетокармином, с увеличением срока обработки азидом натрия фертильность пыльцы имеет тенденцию снижаться. Все перечисленные аномалии свидетельствуют о генетически несбалансированной природе пыльцы. Хотя доля окрашенных клеток велика, обнаруженные нарушения соответствуют уровню фертильности пыльцевых зерен. Размер пыльцевых зерен варьирует от 24 до 40 мкм. Меньшие по размеру зерна обычно нежизнеспособны, но больший размер еще не гарантирует их жизнеспособность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитомиксис был открыт у *Crocus sativus* L. (Kornik, 1901). С тех пор это явление чаще всего описывают во время микроспорогенеза у многих растений (Omara, 1976; Bedi, 1990; Ghamma, Talaat, 2003). Кроме того, цитомиксис был обнаружен в клетках тапетума (Cooper, 1952), меристеме (Bobak, 1978), в эпидермисе листа и прилегающем к нему слое клеток (Tarkowaska, 1960), а также в клетках завязи (Koul, 1990). Сообщалось также, что у полиплоидных растений цитомиксис встречается чаще, чем у диплоидных (Singhal, 2008). Цитологические проявления цитомиксиса в мейозе у растений кунжута весьма разнообразны. Можно предположить, что в профазе I вероятнее всего от клетки к клетке передвигаются не отдельные хромосомы, а хромосомы внутри ядра, включая и ядерную оболочку. Будучи прикреплены к ядерной оболочке, хромосомы следуют внутри нее через цитомиктический канал. Однако перенос ядерного материала происходил не только в первой и второй профазе, то есть при сохранении ядерной оболочки, но и на мобильных фазах мейоза, когда ядерная оболочка отсутствует.

Дальнейшая судьба мигрировавших хромосом не совсем ясна. Было показано, что такие дополнительные хромосомы, полученные клеткой, остаются в цитоплазме в том же состоянии спирализации, в котором они были во время переноса, после чего они либо дегенерируют, либо образуют пикнотические капельки (Kostritsyna и др., 1991). Вместе с тем нельзя исключить возможность их слияния с ядром клетки-рецептора (Bione и др., 2000).

У растений с отклонениями морфогенеза от нормы и проявлением цитомиксиса в различной степени, описаны другие аномалии мейоза, такие как деформация ядра в профазе II и дезориентация веретена во время мейоза II (Shamina и др., 2000, 2006). Это наблюдение подтверждается тем, что в контрольных растениях встречаемость цитомиксиса не возрастает. Указанные нарушения ведут к появлению аномалий различного происхождения на стадии тетрад, и потому практически невозможно установить на этой стадии, какие именно последствия вызваны исключительно миграцией хромосом.

Одной из характеристик цитомиксиса при цитологическом изучении является направление движения ядра, его частей и хромосом. По наблюдениям некоторых исследователей ядра и ядерный материал мигрируют в определенном направлении, и образуются цепочки клеток, объединенных между собой мигрировавшими хромосомами. Другие авторы настаивают на том, что все межклеточные миграции происходят случайно и что направление их движения не детерминировано (Romanov, Orlova, 1971). Согласно нашим наблюдениям, можно выявить некоторую тенденцию в направленности межклеточной миграции. На препаратах видно, что цепочки клеток чаще всего объединены передвигающимися хромосомами в местах контактов клеток. Ядра в таких клетках мигрируют в одном направлении. Однако наряду с этими наблюдениями в малом проценте случаев можно видеть клетки, которые являются рецепторами для двух соседних клеток, или даже пару клеток, которые “обмениваются” своим ядерным материалом. По нашему мнению цитомиксис начинается локально в каком-то месте пыльника (не обязательно только в одном) и распространяется радиально, вовлекая в миграцию все новые и новые мейоциты.

Наши данные ясно указывают, что у растений кунжута высокий уровень цитомиксиса был обусловлен повышением дозы азидата натрия. Определенный вклад в вариабильность цитомиксиса может внести и ее воздействие на экспрессию генов, контролирующих этот признак. Межклеточная миграция ядерного материала достигает максимума в середине профазы I; однако такая миграция может наблюдаться и на всех последующих фазах мейоза, в том числе и на стадии тетрад. Очевидно, что к последствиям цитомиксиса, обнаруживае-

мым на стадии тетрад, следует отнести цитопласты и полиады.

Благодарности

Авторы благодарны Отделу генетики Индийского Сельско-хозяйственного исследовательского Института (I.A.R.I.) в Нью Дели и Сельскохозяйственному Университету CSA в Канпуре за предоставление инбредных семян кунжута, и комиссии по грантам в Нью Дели за финансовую поддержку. Спасибо также руководителю кафедры ботаники в Аллахабадском Университете за возможность пользоваться необходимым оборудованием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Basavaiah M.T.C.S. Cyto-mixis in pollen mother cells of *Urochloa panicoides* P. Beauv. (Poaceae) // Cytologia. 1987. V. 52. P. 69–74.
- Bauchan G.R. Cyto-mixis in *agropyron cristatum* // Genome. 1987. V. 29. P. 765–769.
- Bedi Y.S. Cyto-mixis in woody specie // Proc. Indian Natl. Sci. Acad. (Plant Sci.). 1990. V. 100. № B. P. 233–238.
- Bione N.C.P., Pagliarini M.S., De Toledo J.F.F. Meiotic behavior of several brazilian soybean varieties // Genet. Mol. Biol. 2000. V. 23. P. 623–631.
- Bobak M., Herich R. Cyto-mixis 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. Cyto-mixis in maize microsporocytes // Cytologia. 1997. V. 62. P. 351–355.
- Cooper D.D. The transfer of deoxyribose nucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at the onset of meiosis // Cytologia. 1952. V. 86. P. 271–274.
- Falisticco E., Tosti N., Falcinelli M. Cyto-mixis in pollen mother cells of diploid dactylis. One of the origins of 2n gametes // J. Heredity. 1995. V. 86. P. 448–453.
- F.A.O., 2004, FAOSTAT data, *Food and Agriculture Organization*, Rome.
- Feijo J., Pais S. Cyto-mixis in meiosis during the microsporogenesis of *Ophris lutea*: an ultrastructural study // Caryologia. 1995. V. 42. № 1. P. 37–48.
- Ghanma A.M., Talaat A.A. Cyto-mixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplo-taxis harra* (Brassicaceae) // Botanical Journal of the Linnean Society. 2003. V. 143. P. 169–175.
- Heslop-Harrison J. Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes // Ann. Bot. 1966. V. 30. P. 221–234.
- I.A.E.A., 2001. Sesame improvement by induced mutations. TECDOC 1195.
- Kamal-Eldin A., Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum // Lipids. 1995. V. 30. P. 499–505.
- Kamra O.P. Chromatin extrusion and cyto-mixis in pollen mother cells of *Hordeum* // Hereditas. 1960. V. 46. P. 592–600.
- Kornicke M. Über ortsveränderung von zellkernen. Nider-rhein S.B. Ges Natur Heilkunde Bonn. 1901. V. 8. P. 14–25.

- Kostritsyna T.V., Soldatov I.V. Cytomixis in the shoot apical meristem of hybrids of *Prunus domestica* L. *Persica vulgaris* Mill. // Genetika. 1991. V. 27. № 10. P. 1790–1794.
- Koul K.K. Cytomixis in pollen mother cells of *Allopecurus arundinaceus* Poir // Cytologia. 1990. V. 55. P. 169–173.
- Mantu D.E., Sharma A.K. Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (Linn.) Alston // Cytologia. 1983. V. 48. P. 201–207.
- Omara M.K. Cytomixis in *Lolium perenne* // Chromosoma. 1976. V. 55. P. 267–271.
- Risueno M.C., Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., R.-Garcia M.I. Connexions between meiocytes in plants // Cytologia. 1969. V. 34. P. 262–272.
- Romanov I.D., Orlova I.N. Cytomixis and its consequences in microsporocytes triticales // Genetika. 1971. V. 7. № 12. P. 5–13.
- Shamina N.V., Sidorchuk Yu.V. Dynamics of microtubular cytoskeleton in meiosis in the higher plants. X. The general scheme of the cytoskeleton cycle // Tsitologiya. 2006. V. 48. № 5. P. 427–437.
- Shamina N.V., Dorogova N.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V., Shumnyi V.K. Disturbances of male bouchez D. Meiosis in tobacco transgenic line res91 // Tsitologiya. 2000. V. 42. № 12. P. 1173–1178.
- Sheidai M., Bagheri-Shabestareh E.S. Cytomixis and unreduced pollen formation in some *Festuca* L. species of Iran // Caryologia. 2007. V. 60. P. 364–371.
- Sheidai M., Jaffari S., Taleban P., Keshavarzi M. Cytomixis and unreduced pollen grain formation in *Alopecurus* L. and *Catbrosa* Beauv. (Poaceae) // Cytologia. 2009. V. 74. P. 31–41.
- Shneider T. About the issue of cytomixis in plants // Izv. AN Est. SSR. 1975. V. 24. № 3. P. 199–209.
- Singhal V.K., Kumar P. Cytomixis during microsporogenesis in the diploid and tetraploid cytotypes of *withania somnifera* L. Dunal 1852 (Solanaceae) // Comparative Cytogenetics. 2008. V. 2. № 1. P. 85–92.
- Singhal V.K., Kumar P. Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata* Royle) // J. Biosci. 2008. V. 33. № 3. P. 371–380.
- Tarkowska J. Cytomixis in the epidermis of scales and leaves and in meristems of root apex of *Allium cepa* L. // Acta Soc. Bot. Poloniae. 1960. V. 34. P. 27–44.

Induction of Cytomixis Affects Microsporogenesis in *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae)

Girjesh Kumar and Ram Singh Yadav

Department of Botany, Plant Genetics Laboratory University of Allahabad, Allahabad-211002, U.P., India
e-mail: ramsyadav.au@mail.com

Abstract—Cytomixis was recorded during microsporogenesis in sesame (*Sesamum indicum* L.), a member of the family Pedaliaceae. The phenomenon of cytomixis was observed at various stages of meiosis in 0.5% Sodium azide (SA) treated populations of *Sesamum indicum* L. Cytomixis was observed to occur through various methods, i.e. by forming cytoplasmic channels and direct fusion of pollen mother cells (PMCs), the former was more frequent than the latter. The migration of nuclear content involved all the chromatin/chromosomes or part of it from donor to recipient cell/cells. Some completely empty meiocytes were also observed. Stickiness, precocious movement, laggards, unorientation and micronuclei were observed in almost all the sets treated with various doses of SA. Increase in the doses of SA had a positive effect on the percentage of PMCs showing cytomixis and chromosomal abnormalities. The impact of cytomixis on meiotic behaviour, reduced pollen viability and heterogeneous sized pollen grains were observed.

Keywords: sodium azide, cytomixis, sesame, microsporogenesis.