

УДК 581.162+ 576.54

ДЖЕРЕЛА ХРОМОСОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ МІКРОСПОРОЦИТІВ У ВИДІВ *LILIUM L.* ТА *ALLIUM L.*: ЦИТОМІКСИС, ЕКСТРА-ХРОМОСОМИ, ДИМІНУЦІЇ ХРОМАТИНУ

КРАВЕЦЬ О.А., ПЛОХОВСЬКА С.Г., ГОРЮНОВА І.І., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна

E-mail: kravetshelen@gmail.com

*Проведено цитологічне дослідження цитоміксису і хромосомного поліморфізму мікроспороцитів в мікроспорогенезі у *Lilium croceum Chaix.*, *Allium fistulosum L.* та *A. сера L.* Встановлено, що основні цитоміктичні події притаманні ранній профазі мейозу і є облігатними (конститутивними) для мікроспорогенезу досліджених видів. У метафазних мікроспороцитів виявлені так звані екстра-хромосоми, ймовірно цитоміктичного походження. Вони характеризуються послабленням си-напсису та/або розпадом гомологів та зв'язком з бівалентами основного складу з утворенням вторинних асоціацій хромосом. Екстра-хромосоми присутні не тільки в гіперхромосомних, але в еу- та, навіть, гіпохромосомних мікроспороцитах. У більшості випадків екстра-хромосоми складають «генетичний баласт» для клітини, від якого вона поступово позбавляється, використовуючи широкий клітинний інструментарій, зокрема хромосомні перебудови, димінуції хроматину, асиметричність веретена поділу і фрагментації, цитоміксис та програмовану клітинну загибель. Проте цілком ймовірно, що частина екстра-хромосом може брати участь у перебудові каріотипу мікроспороцитів та мікроспор.*

Ключові слова: Мікроспорогенез, цитоміксис, екстра-хромосоми, вторинні асоціації хромосом, димінуції хроматину, *Lilium croceum Chaix.*, *Allium fistulosum L.*, *A. сера L.*

Вступ. Як відомо, цитоміксис є типом природної міжклітинної взаємодії шляхом обміну ядерним і цитоплазматичним матеріалом. Вважають, що в цей процес залучені динамічні компоненти цитоскелету (актоміозиновий і/або мікротрубочковий у поєднанні з молекуляр-

ними моторами), які асоційовані у складну трансмембранну систему лінкерних комплексів, що взаємодіють з хроматином (Kravets et al, 2017; 2019; Mursalimov et al, 2019). Цитоміксис властивий соматичним і генеративним тканинам як рослин, так і тварин, перш за все, чоловічим репродуктивним органам. Не дивлячись на підвищений в останні роки інтерес до феномену цитоміксису, його молекулярні, фізіологічні і генетичні аспекти залишаються недостатньо вивченими, а функціональне значення не зовсім зрозумілим (Pierre and de Sousa, 2011; Kravets, 2012; 2013; Mandal et al., 2013; De Storme et al, 2014; Mursalimov and Deineko, 2017). Не існує однозначної відповіді на питання про вплив цитоміксису на протікання мейозу. Цитоміксис може дестабілізувати мейоз, може не впливати на його проходження, але може також стабілізувати його хід, видаляючи надлишковий хроматин (Sapre and Deshpande, 1987; Falistocco et al, 1995; Singhal et al, 2008), а через відбір оптимізувати якісний і кількісний склад мікроспороцитів (Kravets, 2012, 2013).

Залежність між інтенсивністю цитоміксису і життєздатністю пилку у різних видів рослин також варіює. Вона може бути негативною (Gayen et al, 1996), позитивною (Falistocco et al, 1995; Bellucci et al, 2003; Kravets, 2009; Guan et al, 2012), слабкопозитивною (Sapre and Deshpande, 1987; Mandal et al, 2013) або, взагалі, відсутньою (Zheng et al, 1987). Залишаються неясними доля і функції мігруючого цитоміктичного хроматину. З огляду на поширеність цитоміксису серед на-

© О.А. КРАВЕЦЬ, С.Г. ПЛОХОВСЬКА, І.І. ГОРЮНОВА, А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ, 2021

земних рослин, а також його причетність до чоловічої генеративної сфери і «male-driven» еволюції, не виключається ймовірність участі цитоміктичного хроматину в перебудові генома мікроспороцитів і його ролі в механізмах збільшення генетичного різноманіття та видоутворення у рослин (Cheng et al, 1980; Zheng et al, 1987; Bellucci et al, 2003; Ghaffari et al, 2006; Lattoo et al, 2006; Kumar et al, 2011; Pierre and de Sousa, 2011; Singhal et al, 2011; Kravets, 2012, 2018; Mandal et al, 2013; Mursalimov et al, 2013; De Storme et al, 2014; Fuentes et al, 2014; Reis et al, 2015). Це непрямо підтверджується хромосомним поліморфізмом мікроспороцитів (Malallah et al, 2003; Lattoo et al, 2006) та існуванням широкого ряду природних поліплоїдних цитотипів у багатьох видів рослин, яким властивий цитоміксис (Cheng et al, 1980; Malallah et al, 2003; Ghaffari, 2006; Kumar et al, 2011; Pierre and de Sousa, 2011; Singhal et al, 20011; Fuentes et al, 2014; Reis et al, 2015). Цитоміксис має як спонтанну, так і стрес-індуковану природу (Kumar et al, 2011; Singhal et al, 2011; Sidorchuk et al, 2016; Kumar and Singhal, 2020). Між тим питання інтеграції цитоміктичного хроматину до геному реципієнтних мікроспороцитів, а також його ролі у механізмах формування анеуплоїдних мікроспор і пилкових зерен залишаються відкритими. Одна з причин відсутності відповіді на ці запитання пов'язана з труднощами ідентифікації цитоміктичного хроматину в клітинах-реципієнтах. Метою дослідження було вивчення зв'язку хромосомного поліморфізму мікроспороцитів з цитоміксисом та аналіз поведінки екстра-хромосом в мікроспорогенезі у видів *Lilium* та *Allium* з конститутивним типом цитоміксису.

Матеріали та методи. В роботі використовували лілію шафранну (*Lilium croceum* Chaix (*L. bulbiferum* var. *croceum* (Chaix) PERS, $2n = 24$) (род. Liliaceae), цибулю трубчасту, або батун (*Allium fistulosum* L., $2n = 16$) і цибулю ріпчасту (*A. cepa* L., $2n = 16$) (род. Alliaceae). Пиляки фіксували за Кларком або Навашиным. Вміст пиляків фарбували ацетогематоксиліном (1 %) з залізо-амонійними квасцями (0,5 %) або ацетокарміном (2 %), а також за допомогою диференціального фарбування ядерців і хромосом нітратом срібла (Hizume et al, 1980). Для флуоресцентної мікроскопії використовували

4',6-діаміно-2-феніліндол (DAPI) («Sigma», США) у концентрації 0,2 мкг/мл і DAPI в поєднанні з водорозчинним аніліновим синім («Sigma», США) у вигляді 2%-ного розчину у 20 % K_3PO_4 . Цитологічні препарати аналізували за допомогою світлової та флуоресцентної мікроскопії (при довжині поглинання хвилі 461 нм) (Axioskop 40 і AxioStar, Carl Zeiss) з використанням камери AxioCam MRc5 (Carl Zeiss). Фотозображення обробляли з використанням програмного забезпечення AxioVisions Rel 4.7 (Carl Zeiss). Обсяг вибірки при аналізі мейозу і тетрад мікроспор становив близько 20 пиляків на стадію. Для кожного виду було досліджено в середньому по 50 бутонів.

Результати. Значну частину популяції ініціалей чоловічих гамет складають анеуплоїдні мікроспороцити (МСЦ). В ході мікроспорогенезу в них формуються додаткові, так звані екстра-хромосоми, імовірно, цитоміктичного походження. Непрямим підтвердженням такого припущення є облігатний (конститутивний) характер цитоміксису в ранній профазі мейозу.

Структурні типи цитоміксиса. За результатами аналізу структурних особливостей цитоміксису нами було виділено кілька його типів. Структурний тип цитоміксису з прямими між'ядерними взаємодіями хроматину/хромосом суміжних поляризованих мікроспороцитів у зиготах мейозу був охарактеризований як парно-петельний (рис. 1, а-в) (Kravets, 2018). Цей тип взаємодії зазвичай супроводжується поляризацією мікроспороцитів, частковим «розплітанням» або спрямованим «випетлюванням» хромосом між суміжними ядрами (рис. 1, б, в). В більшості випадків парно-петельні взаємодії проходять без утворення транзиторних мікроядер і завершуються розходженням ядер в пахітени з продовженням мейозу. В інших випадках мікроспороцити набувають $4n$ плоідності шляхом парного об'єднання (рис. 2, а, б) або транслокації ядра з одної клітини в іншу з утворенням двоядерної ініціали і без'ядерного цитобласта. З підвищенням активності цитоміксису в парно-петельних взаємодіях з'являються транзиторні мікроядра (рис. 1, з). Одночасно всередині тапетальної тканини відбуваються прямі між'ядерні цитоміктичні взаємодії, а також взаємодії між мікроспороцитами і тапетумом (Kravets et al, 2016).

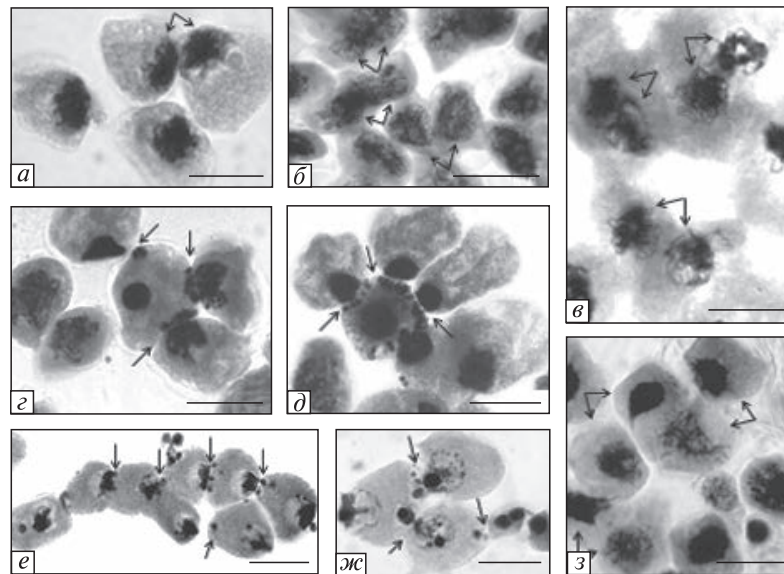


Рис. 1. Типи структурної взаємодії мікроспороцитів у профазі мейозу: *a–в* – прямі між'ядерні парно-петельні взаємодії; *г–ж* – опосередковані мікроядерні взаємодії: донорно-реципієнтні за типом кон'югації (активний донор) (*г, д*) і ланцюгові (*е, ж*); *з* – між'ядерні взаємодії за типом трансформації (активний реципієнт). *L. croceum* (*г, д*), *A. fistulosum* (*а, б, з*) і *Hordeum distichum* (*е–ж*) (Kravets, 2018). Позначення: стрілками вказані парні контакти і транзиторийний хроматин. Фарбування: ацетогематоксилін (*а, д–ж*), ацетокармін (*в*), нітрат срібла (*ж*). Масштаб: 10 мкм

Інший тип цитоміксісу, з опосередкованими між'ядерними взаємодіями через утворення мікроядер і залучення в процес групи клітин було визначено нами як мікроядерний (рис. 1, *е, ж*). У мікроядерному типі можна виділити донорно-реципієнтну (рис. 1, *г–д*) та ланцюгову різновиди (рис. 1, *е–ж*). У донорно-реципієнтному різновиді цитоміксісу нагадує примітивні форми статевого процесу прокаріот – кон'югацію (коли активний донор) (рис. 1, *г, д*) або трансформацію (коли активний реципієнт) (рис. 1, *з*) (Kravets, 2018). У ланцюгові взаємодії залучаються по декілька, іноді, значна кількість клітин, розташованих уздовж або поперек поздовжньої осі пиляка. У міжклітинних взаємодіях беруть участь всі компоненти ядра, в тому числі, і ядерця (рис. 1, *ж*), що свідчить про збереження функціональної активності цитоміктичного хроматину. Ядра/мікроядра в ланцюговій міграції перетинають на своєму шляху не одну клітину, при цьому, об'єм убутного хроматину в таких взаємодіях, схоже, компенсується об'ємом вхідного хроматину (рис. 1, *е, ж*). Слід зазначити, що у однодольних різні структурні типи цитоміксісу можуть зустрічатися в межах

однієї популяції мікроспороцитів як послідовно, так і одночасно. Зазвичай, полі- та/або анеуплоїдні мікроспороцити містять значну кількість мікроядер (рис. 2, *г–д*), а також нуклеопротеїдних гранул (рис. 3, *г–д*). У метафазі в цих мейоцитах візуалізуються екстра-хромосоми, які ускладнюють процеси формування метафазного веретена, метафазної пластинки і анафазного розходження гомологів (рис. 2, *ж, з, а–в, е, ж; 4, а–д*).

Маркери екстра-хромосом. Показано, що екстра-хромосоми (та/або їх фрагменти) формуються синхронно з хромосомами основного складу (каріотипу). Ми вважаємо, що екстра-хромосоми можна диференціювати за наступними ознаками:

напіврозкритою або розкритою (внаслідок послаблення синапсиса) формою гомологів, присутністю унівалентів, а також фрагментацією хромосом (рис. 3, *а–г; 4, а, б, д, з*);

участю в побудові метафазної пластинки через вторинні асоціації хромосом з бівалентами основного складу (рис. 4, *а–д, з*);

бівалентною організацією, але локалізацією за межами веретена поділу, іноді з формуванням додаткової метафазної пластинки (рис. 3, *е, 4, з*);

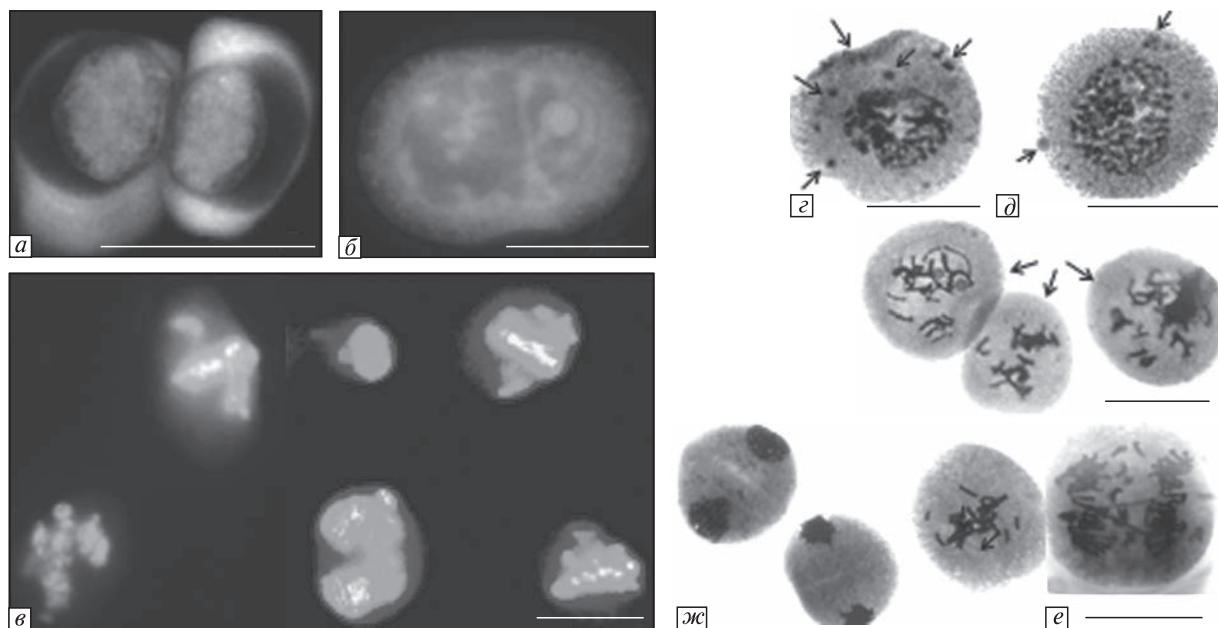


Рис. 2. Механізми поліплоїдизації мікроспороцитів: *a–b* – парні об’єднання в профазі I; *v, ж* – порушення формування метафазної пластинки і анафазного розходження хромосом; *z, д* – полі/анеуплоїдні МСЦ в пахітені (стрілками вказані мікроядра); *e* – симультанний тип мікроспорогенезу; *L. croceum*. Позначення: стрілками вказані мікроядра (*z, д*) і метафазні викиди (*ж*). Фарбування: аніліновий синій + DAPI (*a*); DAPI (*b, v*); ацетогематоксилін (*z, ж, e*). Масштаб: 10 мкм

Розпад гомологів екстра-хромосом, ймовірно, свідчить про хромосомні перебудови в цих хромосомах. На користь, наприклад, транслокацій і дуплікацій вказують відкриті біваленти або парні фрагменти різної довжини (можливо нерівний кросинговер). Структурно вторинні асоціації хромосом є центромерними, теломерними або бічними асоціаціями хромосом – тривалентами, тетравалентами та іншими більш складними полівалентами (рис. 4, *a, б, д*). Розходження хромосом супроводжується появою хромосомних мостів, вузлів, розривів і фрагментів (рис. 3, *ж, і; 5, б–д; 6, a, в, д, e*).

Слід зазначити, що екстра-хромосоми формуються не тільки в гіперхромосомних (рис. 4, *a–д*), але й в еухромосомних (рис. 4, *з*), і, навіть, в гіпохромосомних МСЦ. Так, з 37 проаналізованих метафазних мікроспороцитів лілії 19 виявилися еуплоїдними, 10 – гіперхромосомними і 8 – гіпохромосомними (рис. 4, *e, ж*). При цьому деякі еухромосомні МСЦ містили уніваленти, триваленти та інші вторинні асоціації хромосом (рис. 4, *з*). Це, можливо, вказує на те, що один і той

же мікроспороцит може бути одночасно донором для одних і реципієнтом для інших клітин. Можна припустити, що в процесі цитоміксису відбувається не тільки парний, але й груповий міжклітинний обмін, або, т. зв., «перемішування» генетичного матеріалу в межах тканини. Показове і те, що вторинні асоціації хромосом і хромосомні аберації зазвичай не приводять до блокування мейозу, тобто функціональність анеуплоїдних та мультиаберантних мікроспороцитів як ініціалей чоловічих гамет зберігається.

Поведінка і доля екстра-хромосом у мейозі. У метафазі I уніваленти і фрагменти, що розпалися, ускладнюють формування метафазної пластинки, а в деяких випадках провокують метафазний блок і реституцію першого поділу (рис. 2, *в, ж*). Екстра-хромосоми бівалентної організації можуть формувати свою власну метафазну пластинку, провокуючи деяку хаотизацію в структурі веретена (рис. 2, *ж; 3, e*). У метафазній поведінці екстра-хромосом типовим є передчасне і запізніле розходження до полюсів, викиди за межі веретена. Як

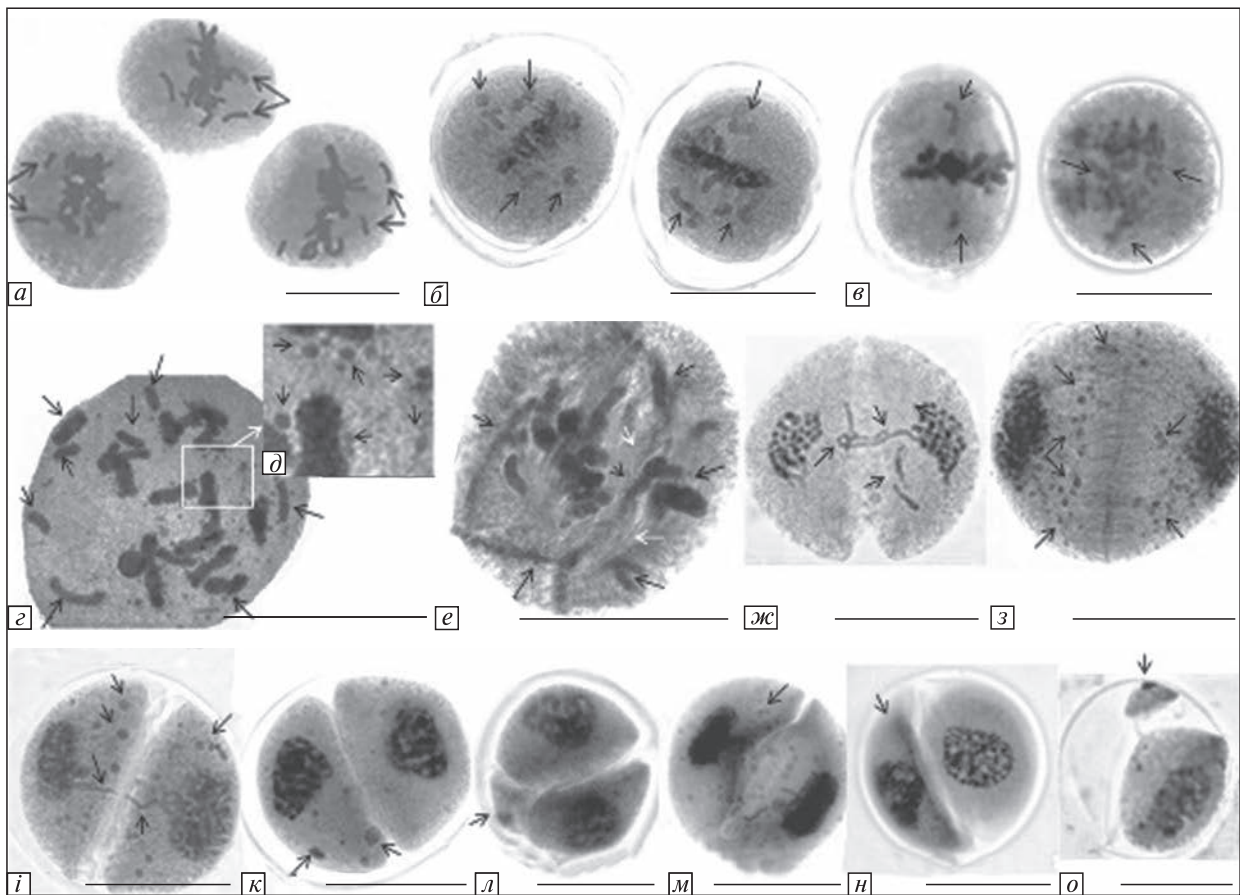


Рис. 3. Аберації першого поділу мейозу в МСЦ (*L. croceum*): *a–г* – викиди унівалентів і парних фрагментів за межі веретена; *д* – нуклеопротейдні гранули; *е* – формування основного і додаткового веретена поділу в метафазі I, теломерні асоціації унівалентів; *ж* – розрив вторинної асоціації хромосом у телофазі I; *з, і* – цитокінез, розподіл нуклеопротейдних гранул та мікроядер; *к–о* – асиметрія першого поділу. Позначення: стрілками вказані уніваленти, викиди хромосом і фрагментів, мости (*a–г, ж, і*), нуклеопротейдні гранули (*д, з*), додаткове веретено поділу (*е*), мікроядра (*і–л*), загибель однієї з діад (*м–о*). Фарбування: ацетогематоксилін (*г–з, к–н*), ацетокармін (*a–в, і, о*). Масштаб: 10 мкм, 5 мкм (*д*)

зазначалося, частина екстра-хромосом вступають в синапсис з бівалентами основного складу (центромерною, теломерною ділянками або бічною поверхнею хромосом), утворюючи поліваленти, включаючи термінальні з'єднання, які можуть охоплювати багато хромосом (рис. 4). Припускається, що через створення вторинних асоціацій екстра-хромосоми можуть закріплюватися в апараті мейотичного поділу, зберігаючи структуру веретена поділу.

Особливістю мікроспороцитів у лілії шафранної є присутність в їх цитоплазмі великої кількості нуклеопротейдних гранул, які, ймовірно, представляють собою димінції хроматину.

У метафазі багато з них ще зберігають контакти з хромосомами (рис. 3, *г–д*). Нуклеопротейдні гранули зазвичай не підпадають швидкому лізису і можуть тривалий час зберігатись в цитоплазмі МСЦ.

В анафазі I при розходженні гомологів можуть утворюватися петлі і мости (рис. 3, *е, ж; 5, б, г, д*). Деякі з хромосомних мостів зберігаються впродовж усього мейозу (рис. 6, *в*). У телофазі I екстра-хромосоми або їхні фрагменти, які не увійшли до складу ядра, можуть утворювати мікроядра (рис. 3, *і, к*). Великі мікроядра формують свій власний мікрополіус, відокремлюючись фрагмопластом і клітинною

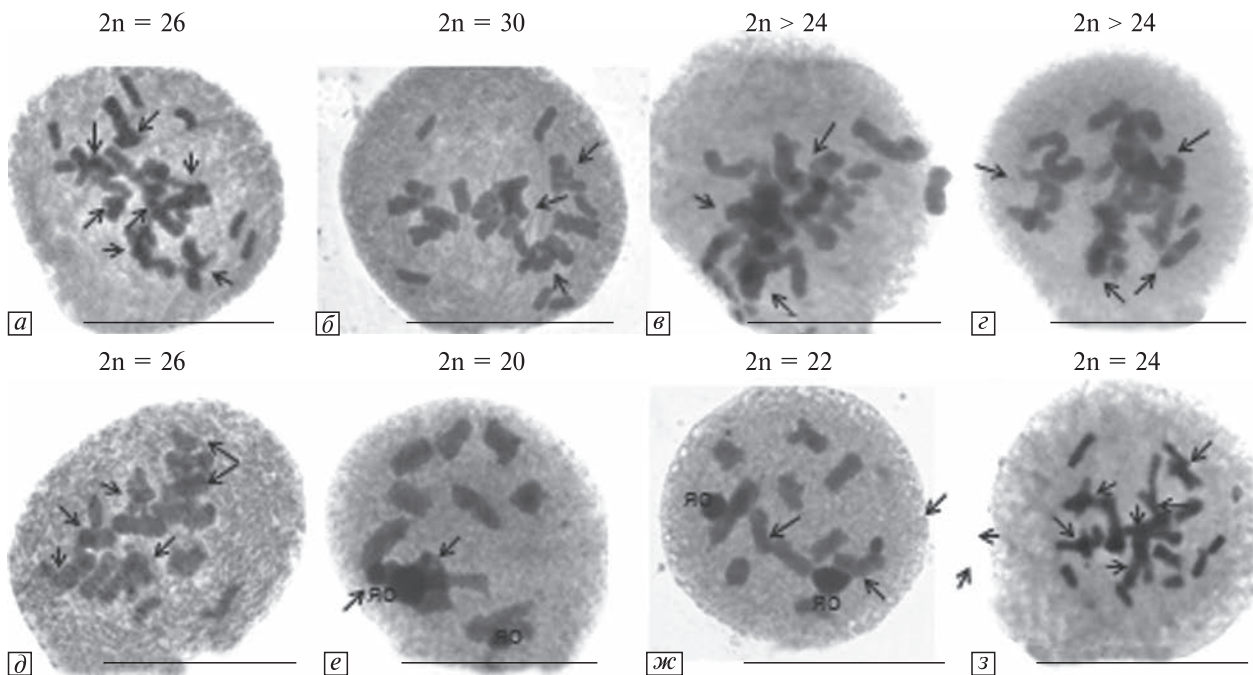


Рис. 4. Хромосомний поліморфізм і вторинні асоціації хромосом в метафазі I мікроспороцитів (*L. croceum*): *a* – $2n = 26$: 5 I, 7 III (стрілками вказано асоціації); *б* – $2n = 30$: 5 I, 8 II, 3 III (стрілками вказано триваленти); *в* – $2n = 24$ (стрілками вказано складні асоціації, праворуч два бівалента); *г* – $2n = 24$: дві метафазні пластинки (стрілками вказано асоціації); *д* – $2n = 26$: 2 I, 2 II, 4 III (стрілками вказано триваленти), 1 IV (праворуч тетравалент вказано стрілками); *е* – $2n = 20$: 10 II (стрілками вказано асоціації); *ж* – $2n = 22$: 11 II (стрілками вказано асоціації); *з* – $2n = 24$: 6 I, 9 II (стрілками вказано асоціації). JO – ядерцеві організатори. Фарбування: ацетогематоксилін (*a, б, д, з*), ацетокармін (*в, г*), нітрат срібла (*е, ж*). Масштаб: 10 мкм

пластинкою (рис. 3, *л*). Однак в більшості випадків відцентрове формування фрагмопласту, що відокремлює мікроядро/мікроядра, призупиняється, і відновлюється біполярна орієнтація фрагмопласту нерідко в асиметричному форматі (рис. 3, *л-о*). Як наслідок, зустрічається висока частота асиметрії діад, обумовлена нерівним розподілом хромосом і фрагментів, мікроядер, нуклеопротейдних гранул і цитоплазми в телофазі I та цитокінезі, а також ПКГ однієї з діад (рис. 3, *м-о*; 5, *ж-з*). ПКГ в цьому випадку несе морфологічні ознаки апоптозу.

У другому поділі мейозу морфологічна картина аномалій повторюється. Нами спостерігались викиди хромосом за межі веретена (рис. 6, *а, в*) або їх сегрегація в екваторіальній зоні (рис. 6, *д, е*), порушення формування та орієнтації веретена і асиметричний розподіл хромосом в телофазі, перехресні хромосомні або цитоміктичні мости (рис. 6, *б, в*), ПКГ однієї з діад мікроспор (рис. 5, *ж*; 6, *г*).

Як результат, число, розташування і розміри мікроспор в тетрадах варіювали, а між мікроспорами іноді відбувався цитоміксис (рис. 6, *ж-л*). Зрідка зустрічався не властивий однодольним, модифікований симультанний тип утворення мікроспор (рис. 2, *е*). Цитоміксис, викиди хромосом і мікроядер нерідко мали продовження не лише в межах тетрад, але й при формуванні пилкового зерна (рис. 6, *к-м*). Тим не менш, значна кількість тетрад, особливо у видів *Allium*, зберігала нормальну морфологію.

У досліджуваних видів основним механізмом поліплоїдизації мікроспороцитів є парні злиття МСЦ в профазі I та проміжний тип реституції мейозу. Проміжний тип реституції характеризується правильним або порушеним кросинговером та реституцією першого поділу шляхом формування блоку в мета- анафазі (Bretagnolle et al, 1995; Ramanna et al, 2003). У багатьох випадках цитоміктичний хроматин в першому поділі зберігає свою бівалентну організацію.

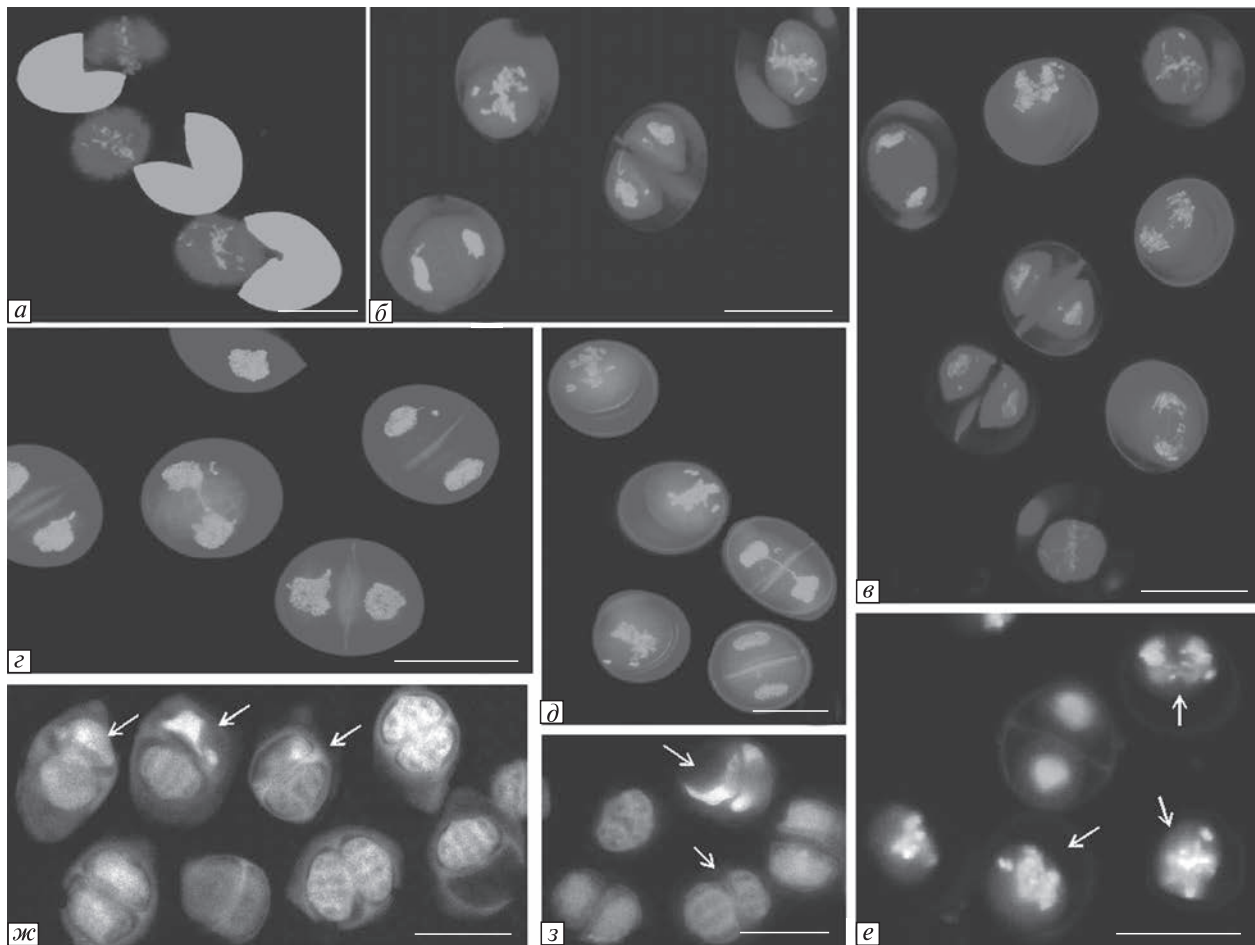


Рис. 5. Порушення сегрегації та розходження хромосом у мейозі: *a–в, e* – викиди хромосом в метафазі, порушення анафазного розходження хромосом у першому поділі; *ж–з* – асиметрія діад, загибель однієї або двох діад. (*A. cepa* (*a–д*), *A. fistulosum* (*ж, з*), *L. croceum* (*e*). Позначення: стрілками вказано порушення розходження хромосом (*e*), асиметрія та ПКЗ в тетрадах (*ж, з*). Фарбування: DAPI + аніліновий синій. Масштаб: 10 мкм

У механізмах утворення нередукованих або анеуплоїдних мікроспор очевидно задіяні цитоскелетні структури, зокрема, мікотрубочки метафазного веретена і фрагмопласту. Реституція першого поділу супроводжувалася порушеннями структури і просторової орієнтації веретена поділу. У метафазі екстра-хромосоми, як зазначалося, можуть утворювати своє власне веретено. Порушення формування фрагмопласту порушувалося, що, ймовірно, могло бути причиною зміни сукцесивно типу спорогенезу на симультанний.

Отримані результати дають підставу вважати, що основним джерелом хромосомного полі-

морфізму мікроспороцитів, включаючи формування екстра-хромосом, у досліджених видів є цитоміксис. На користь цього припущення свідчать конститутивний характер цитоміксису, його тривалість, поява численних вторинних асоціацій хромосом, фрагментів та мікроядер в ході мейозу, а також присутність екстра-хромосом в еу- і гіпохромосомних мікроспороцитах. Хоча екстра-хромосоми можуть закріплюватися в апараті поділу мейозу, але, крок за кроком, вони підпадають, свого роду, остракізму. Проте частина екстра-хромосом може адаптуватись в геномі МСЦ та, ймовірно, брати участь у перебудові їх каріотипу.

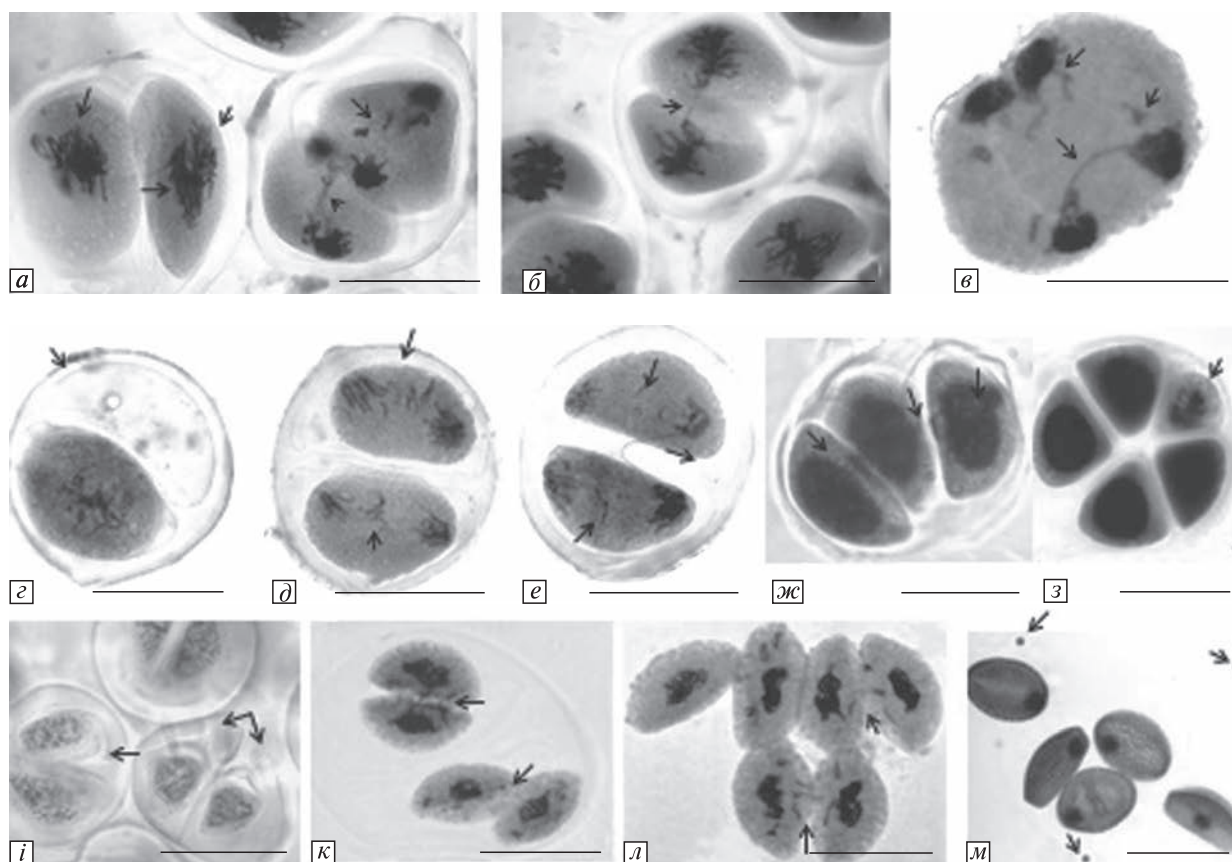


Рис. 6. Аберації другого поділу мейозу в МСЦ і мікрогаметогенеза: *а* – телофаза з хромосомним мостом і викидами; *б* – перехресний (або цитоміктичний) міст в метафазі; *в* – перехресний міст в телофазі і викиди фрагментів; *г* – цитобласт або ПКЗ однієї з мікроспор в діаді; *д, е* – викиди хромосом в телофазі; *ж* – цитоміксис в триаді мікроспор; *з* – пентада мікроспор; *і* – загибель мікроспор в тетраді; *к* – цитоміксис і викиди хромосом в мікроспорах тетради; *л* – цитоміксис серед звільнених мікроспор імовірно з порушенням формування оболонки; *м* – поліморфізм пилкових зерен, викиди мікроядер за межі пилкового зерна. Позначення: стрілками вказано викиди і фрагменти хромосом, мости, цитоміксис, мікроядра. *L. croceum* (*а–ж, к–м*), *A. fistulosum* (*з*), *A. sepa* (*і*). Фарбування: ацетогематоксилін (*а–к, з*), ацетокармін (*ж, і–м*). Масштаб: 10 мкм

Обговорення. Як було зазначено раніше (Mursalimov et al., 2017), до цих пір не знайдено спеціальних селективних маркерів мігруючого хроматину, що не дозволяє точно відслідковувати його подальшу долю і функціональну роль. Однак деякі види лілейних завдяки своїм унікальним цитологічним параметрам та облігатності цитоміксису являють собою зручну модель для ідентифікації цитоміктичного хроматину і відстеження його поведінки в ході мейозу.

Хромосоми, що формуються з цитоміктичного хроматину, за рядом специфічних ознак досить добре відрізняються від хромосом осно-

вного каріотипу. Серед маркерів таких хромосом – уніваленти, розкриті, напіврозкриті, нерівні біваленти та біваленти, що часто знаходяться за межами веретена. Важливою ознакою екстра-хромосом є синапсис з бівалентами основного складу з утворенням різних типів вторинних асоціацій хромосом.

Зв'язок хромосомного поліморфізму мікроспороцитів з цитоміксисом припускали багато авторів (Cheng et al, 1980; Zheng et al, 1987; Falistocco et al, 1995; Malallah et al, 2003; Wu et al, 2003; Lattoo et al, 2006; Mandal and Datta, 2011). Так, у *Lilium davidii* var. *willmottiae* (Wilson)

Roffill. близько 12 %, а у *Vicia faba L.* приблизно 8 % мікроспороцитів характеризувались анеуплоїдним, причому, частіше гіпоплоїдним, числом хромосом (Zheng et al, 1987). Анеуплоїдія МСЦ була виявлена у цитоміктичних видів *Corchorus* и *Houttuynia cordata* (Wu et al, 2003; Mandal and Datta, 2011). Тем не меншу, ряд дослідників, вказуючи на участь цитоміктичного хроматину в індукції порушень в мейозі, анеуплоїдію МСЦ пояснювали поліплоїдною природою видів, зокрема, аллоплоїдією й гібридизацією (Sapre et al, 1987; Guan et al, 2012). Дійсно, поява екстра-хромосом в мейозі може бути наслідком і гібридизаційних подій, проте, поведінка, кількість і доля цих хромосом в мейозі, а також тривалий цитоміксис, скоріше вказують на їхню цитоміктичну природу. Слід зауважити, що поліморфізм пилкових зерен, властивий більшості цитоміктичних видів, зазвичай пов'язують з цитоміксисом, припускаючи участь цитоміктичного хроматину в перебудові їх каріотипу (Cheng et al, 1980; Sapre and Deshpande, 1987; Falistocco et al, 1995; Malallah and Attia, 2003; Wu et al, 2003; Ghaffari, 2006; Singhal et al, 2008; Kumar et al, 2011; Singhal et al, 2011; Reis et al, 2015).

Цікаво, що цитоміктичний хроматин, поява якого супроводжується мультиаберантністю і анеуплоїдією МСЦ, не індукує клітинну загибель. На відміну від клітин з множинними хромосомними перебудовами («rogue cells»), летальними, наприклад, для кореневої меристеми проростків гороху або ячменю (Klavets et al, 2011; 2012), уніваленти, фрагменти хромосом, мікроядра лише ускладнюють сегрегацію, розходження хромосом і цитокінез. Більшість екстра-хромосом, в тому числі і ті, що захоплюються в ході реституції першого мейотичного поділу, видаляються з клітин за допомогою різноманітного клітинного інструментарію, серед яких — асиметричність поділу, тривалий цитоміксис, інактивация і/або викиди мікроядер. Широко використовується диференціальний розподіл генетичного матеріалу, в результаті якого одна з діад або обидві мікроспори (після другого поділу) підпадають програмованій клітинній загибелі.

Важливе місце в арсеналі засобів видалення надлишкового генетичного матеріалу з ядра і клітини займають димінуції хроматину. Дійсно,

морфологічно і функціонально ці процеси виявляють велику схожість з димінуціями хроматину або явищем поліплоїдного скиду, відомими для деяких безхребетних і поліплоїдних видів рослин (Grishanin et al, 2006; Streit, 2012). Як зазначалося, реципієнтні мікроспороцити, зазвичай, містять велику кількість мікроядер, частина з яких в пізній профазі мейозу видаляється з клітини. Інша частина мікроядер і фрагментів мігрує між діадами або тетрадами мікроспор, а також виштовхується з клітин. Відомо, що при димінуції хроматину, як і при поліплоїдному скиданні, відбувається ексцизія ділянок (деяких гетерохроматинових районів) хромосом, що супроводжується реорганізацією геному з втратою ряду класів повторюваних послідовностей (Grishanin et al., 2006). Число хромосом при цьому може зберігатися, але їх довжина скорочується. Отже, поява нуклеопротеїдних гранул у лілії при завершенні профазі, а також, ймовірно, викиди фрагментів і мікроядер є цитологічно та генетично близькими до подій, пов'язаних з димінуціями хроматину або поліплоїдного скидання.

Більшість дослідників вважають, що цитоміксис є генетично регульованим процесом, до контролю якого залучено мейотичні гени (Sapre and Deshpande, 1987; Zheng et al, 1987; Falistocco et al, 1995; Bellucci et al, 2003; Mandal et al, 2013; Ghaffari, 2006; Lattoo et al, 2006; Singhal et al, 2008; Kumar et al, 2011; Pierre and Sousa, 2011; Singhal et al, 2011). Це підтверджується синхронністю перетворень в мейозі цитоміктичного хроматину і хромосом основного складу МСЦ. Звертає на себе увагу факт причетності цитоміксису до ранньої профазі мейозу. Синхронність динаміки профазних перетворень хромосом і цитоміктичної міграції може свідчити про залученість цитоміксису до ключових подій профазі, а саме, до гомологічної рекомбінації ДНК (в тому числі, локальної ектопічної рекомбінації і нерівного кросинговеру (Jelesko et al, 1999; Cai et al, 2007)).

Щодо причин і характеру утворення вторинних асоціацій хромосом, властивих багатьом цитоміктичним і поліплоїдним видам, в літературі не існує чітких уявлень (Malgwi et al, 1997; Das et al, 2009; Bhattacharya et al, 2010; Bala et al, 2011; Kumar et al, 2014; Zickler et al, 2015; Kumar et al, 2018). Бага-

то дослідників вважають, що вторинні асоціації хромосом, на противагу синапсису, є вільними асоціаціями гомологів, які відбуваються без кросинговеру і не впливають на мейотичну сегрегацію. Проте було відмічено, що вторинні асоціації хромосом пов'язані з гетерохроматиновими районами в геномі, які полегшують зближення негомологічних ділянок і призводять до бічних асоціацій бівалентів в групі (Malgwi et al, 1997; Jelesko et al, 1999). Причинно-наслідковий зв'язок між цитоміксісом та утворенням вторинних асоціацій хромосом не вивчений. Ми припускаємо, що утворення вторинних асоціацій хромосом передбачає можливість синапсису і рекомбінантних подій між окремими ділянками гомологічної ДНК, а також великою кількістю нуклеотидних повторів, які, як відомо (Jelesko et al, 1999; Cai et al, 2007), розкидані по величезному геному лілейних.

Множинні хромосомні перебудови і димінуції хроматину в МСЦ лілейних, ймовірно, відображають механізми адаптації і стабілізації геному шляхом скидання надлишкової ДНК. Скоріше за все, основна частина цитоміктичного хроматину після залучення до рекомбінантних подій, становить «генетичний баласт» для клітини, від якого вона поступово позбавляється, коригуючи свій власний і геном похідних клітин шляхом димінуцій хроматину, диференційного розподілу хромосом, асиметричного поділу, цитоміксісу та ПКГ. Однак, частина цитоміктичного хроматину може адаптуватися в геномі МСЦ і брати участь в його розбудові. Про це свідчать значна кількість вторинних асоціацій хромосом, анеуплоїдія мікроспороцитів, поліморфізм пилкових зерен. На користь можливої участі цитоміктичного хроматину у перебудові каріотипу МСЦ також вказують його МТ-організаційна активність і здатність взаємодіяти з веретеном реципієнтних клітин (Mursalimov et al, 2019). Ряд дослідників вважають, що цитоміксіс через великі масштаби втрат і придбань ДНК сприяє коригуванню генома, адаптації та стабілізації нових поліплоїдів (Reis et al, 2015; Zhou, 2003; Kalinka et al, 2010). Проте питання інтеграції цитоміктичного хроматину в реципієнтний геном і механізми перебудови каріотипу вимагають подальших досліджень, в тому числі, на молекулярному рівні. На наш

погляд, життєздатність анеуплоїдних і мультиаберантних мейоцитів можна пояснити лише з точки зору на еволюційне значення цитоміксісу, та з позицій певних припущень, а саме: програмованості цитоміксісу та його участі в рекомбінантних подіях і репарації ДНК в профазі мейозу, задіяності цитоміктичного хроматину в перебудові каріотипу МСЦ і мікроспор, димінуцій хроматину для адаптації і стабілізації геному.

Висновки. В ході мікроспорогенезу в мікроспороцитах досліджених видів лілейних формуються додаткові, так звані екстра-хромосоми, імовірно, цитоміктичного походження. Головні цитоміктичні події, що призводять до полі- і анеуплоїдії мікроспороцитів, притаманні профазі першого поділу мейозу. Екстра-хромосоми присутні в гіпер-, еухромосомних та гіпохромосомних мікроспороцитах. Екстра-хромосоми характеризуються послабленням синапсису гомологів і асоціаціями з бівалентами основного складу з утворенням складних вторинних асоціацій хромосом. В ході мейозу мікроспороцити поступово позбавляються від «генетичного баласту», використовуючи диференційний розподіл хромосом і асиметричність поділу, цитоміксіс, димінуції хроматину і програмовану клітинну загибель.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота не фінансувалась з будь-яких джерел.

SOURCES OF CHROMOSOMAL POLYMORPHISM OF MICROSPOROCTES IN SPECIES OF *LILIUM* L. TA *ALLIUM* L.: CYTOMIXIS, EXTRA CHROMOSOMES, CHROMATIN DIMINUTION

E.A. Kravets, S.G. Plohovskaya, I.I. Horyunova, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kiev, Osyovskoho str., 2a,

E-mail: kravetshelen@gmail.com

Cytomixis and chromosomal polymorphism of microsporocytes in microsporogenesis of species *Lilium croceum* Chaix., *Allium fistulosum* L. and *A. cepa* L. were stu-

died. It was found that the main cytotoxic events are associated with the early prophase of meiosis and are obligatory (constitutive) for the studied species. In metaphase microsporocytes, the so-called extra-chromosomes, presumably of cytotoxic origin, were identified. They are characterized by the disintegration of homologues and associations with bivalents of the basic karyotype with the formation of secondary associations of chromosomes. Extra chromosomes are present not only in hyperchromosomal, but in eu- and hypochromosomal microsporocytes. The most of extra chromosomes seem to be the «genetic ballast» for the cell, which it gets rid of using a wide range of cellular tools, in particular: chromosomal rearrangements, chromatin diminution, asymmetry of division, cytotoxicity, and programmed cell death. Nevertheless, some extra chromosomes can participate in the rearrangement of the microsporocyte and microspore karyotype.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bala S, Gupta RC (2011) Effect of secondary associations on meiosis, pollen fertility and pollen size in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Chromosome Botany* 6:25–28. doi: 10.3199/iscb.6.25
- Bellucci M, Roscini C, Mariani A (2003) Cytotoxicity in the pollen mother cells of *Medicago sativa* L. *J. Heredity* 94:512–516. doi: 10.1093/jhered/esg096
- Bhattacharya A, Datta AK (2010) Secondary chromosome associations in *Uraria picta* (Jacq.) DC. (Family: Leguminosae). *Cytologia* 75:37–40. doi: 10.1508/cytologia.75.37
- Bretagnolle F, Thompson JD (1995) Gametes with the somatic (sic) chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *N Phytol* 129(1):1–22. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03005.x
- Cai X, Xu SS (2007) Meiosis-driven genome variation in plants. *Curr Genomics* 8:151–161. doi: 10.2174/138920207780833847
- Cheng KC, Nie XW, Wang YX, Yang QL (1980) The relation between cytotoxicity and variation of chromosome numbers in pollen mother cells of rye (*Secale cereale* L.). *Acta Bot Sin* 22:216–220
- Das A, Datta AK, Ghose S (2009) Cytogenetical studies on two varieties of *Withania somnifera*. *J Trop Med Plants* 10:249–256.
- De Storme N, Mason A (2014) Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Curr Plant Biol* 1:10–33. doi: 10.1016/j.cpb.2014.09.002
- Falstocco E, Tosti N, Falcinelli M (1995) Cytotoxicity in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes. *J Heredity* 86:448–453. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111619
- Fuentes I, Stegemann S, Golczyk H et al (2014) Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature* 511:232–235. doi: 10.1038/nature13291
- Gayen P, Sarkar KR (1996) Cytotoxicity in maize haploids. *Indian J Genet Plant Breed* 56(1):79–85
- Ghaffari SM (2006) Occurrence of diploid and polyploid microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytotoxicity. *Afr J Biotech* 5:1450–1453. <https://doi.org/10.5897/AJB06.338>
- Grishanin AK, Shekhovtsov SV, Boykova TV, Akifyev AP, Zhimulev IF (2006) The problem of chromatin diminution at the border of the XX and XXI centuries. *Cytology* 48(5):379–397. pmid: 16892848
- Guan JZ, Wang JJ, Cheng ZH, Liu Y, Li ZY (2012) Cytotoxicity and meiotic abnormalities during microsporogenesis are responsible for male sterility and chromosome variations in *Houttuynia cordata*. *Genet Mol Res* 11:121–130. doi: 10.4238/2012.January.17.2
- Hizume M, Sato S, Tanaka A (1980) A highly reproducible method of nucleolus organizer regions staining in plants. *Stain Technol* 55:87–90. pmid: 6157230
- Jelesko JG, Harper R, Furuya M, Grissem W (1999) Rare germinal unequal crossing-over leading to recombinant gene formation and gene duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 18:10302–10307. doi: 10.1073/pnas.96.18.10302
- Kravets EA (2009) Cellular and Tissue Mechanisms of Recovery Processes in *Hordeum distichum* L. under Irradiation. *Cytol Genet* 43(1):9–17. doi: 10.3103/S0095452709010022
- Kravets EA (2012) Nature, significance, and cytological consequences of cytotoxicity. *Cytol Genet* 46(3):188–195. doi: 10.3103/S0095452712030061
- Kravets EA (2013) Cytotoxicity and its role in the regulation of plant fertility. *Rus J Dev Biol* 44(3):113–128. doi: 10.1134/s1062360413030028
- Kravets EA (2018) Cytotoxicity as a primary form of sexual process. *Adv Cytol Pathol* 3(5):88–91. doi: 10.15406/acp.2018.03.00059
- Kravets EA, Berezhnaya VV, Sakada VI, Rashidov NM, Grodzinsky DM (2012) Structural architectonics of the root apical meristem in connection with quantitative evaluation of its radiation damage. *Cytol Genet* 46(2):63–73. doi: 10.3103/S0095452712020016
- Kravets EA, Mykheyev AN, Ovsyannikova LG, Grodzinsky DM (2011) Critical level of radiation damage of root apical meristem and mechanisms for its recovery in *Pisum sativum* L. *Cytol Genet* 45(1):18–26. doi: 10.3103/S0095452711010051
- Kravets EA, Sidorchuk YuV, Horyunova II, Plovovskaya SH, Mursalimov SR, Deineko EV, Yemets AI, Blume YaB (2016) Intra- and intertissular cytotoxic interactions in the microsporogenesis of mono- and

- dicotyledonous plants. *Cytol Genet* 50(5):267–277. doi: 10.3103/s0095452716050054
- Kravets EA, Yemets AI, Blume YaB (2017) Cellular mechanisms of nuclear migration. *Cytol Genet* 51(3):192–201. doi: 10.3103/S0095452717030069
- Kravets EA, Yemets AI, Blume YaB (2019) Cytoskeleton and nucleoskeleton involvement in processes of cytomixis in plants. *Cell Biol Int* 43(9):999–1009. doi: 10.1002/cbin.10842
- Kumar G, Chaudhary N (2014) Secondary chromosomal association in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Jordan J Biol Sci* 7(1):71–74. doi: 10.12816/0008217
- Kumar G, Singh S (2018) Enigmatic phenomenon of secondary association among bivalents in Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Cytol Genet* 52(6):478–483. doi: 10.3103/S0095452718060075
- Kumar P, Singhal VK (2011) Male meiosis, morphometric analysis and distribution pattern of 2x and 4x cytotypes of *Ranunculus hirtellus* Royle (Ranunculaceae) from the cold regions of Northwest Himalayas (India). *Comp. Cytogen* 5:143–161. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i3.1359
- Kumar G, Singh S (2020) Induced cytotoxic crosstalk behaviour among micro-meocytes of *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. (cluster bean): Reasons and repercussions. *Caryologia* 73(2): 111–119. doi: 10.13128/caryologia-544
- Lattoo SK, Khan S, Bamotra S, Dhar AK (2006) Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications. *J Biosci* 31:629–637. doi:10.1007/BF02708415
- Malallah GA, Attia TA (2003) Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diploaxis harra* (Brassicaceae). *Bot J Lin Soc* 143:169–175. doi:10.1046/j.1095-8339.2003.00218.x
- Malgwi MM, Oyewole SO, Khan AU (1997) Chromosomes and secondary associations in tetraploid *Cleome polyanthera* L. *Nucleus* 40:20–25
- Mandal A, Datta AK (2011) Secondary chromosome associations and cytomixis in *Corchorus* spp. *Cytologia* 76(3):337–343. doi: 10.1508/cytologia.76.337
- Mandal A, Datta AK, Gupta S et al (2013) Cytomixis – a unique phenomenon in animal and plant. *Protoplasma* 250(5):985–996. doi: 10.1007/s00709-013-0493-z
- Mursalimov S, Deineko E (2017) Cytomixis in plants: facts and doubts. *Protoplasma* 255(3):719–731. doi: 10.1007/s00709-017-1188-7
- Mursalimov S, Sidorchuk Yu, Deineko E (2013) New insights into cytomixis: specific cellular features and prevalence in higher plants. *Planta* 238(3):415–23. doi: 10.1007/s00425-013-1914-0
- Mursalimov SR, Sidorchuk YV, Deineko EV (2019) Analysis of cytoskeleton in the cells involved in cytomixis: the migrated chromatin displays an MT-organizing activity and can interact with the spindle. *Biologia* 74(5):555–562. doi:10.2478/s11756-019-00203-4
- Pierre MO, de Sousa SM (2011) Citomixia em plantas: causas, mecanismos e consequências. *R Bras Bioci* 9:231–240
- Reis AC, Sousa SM, Viccini LF (2015) High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*. *Plant Syst Evol* 302(1):121–127. doi:10.1007/s00606-015-1249-3
- Sapre AB, Deshpande DS (1987) A change in chromosome number due to cytomixis in an interspecific hybrid of *Coix* L. *Cytologia* 52:167–174. doi:10.1508/cytologia.52.167
- Sidorchuk YuV, Kravets EA, Mursalimov SR, Plokhovskaya SG, Goryunova II, Emets AI, Blume YB, Deineko EV (2016) Efficiency of the induction of cytomixis in the microsporogenesis of dicotyledonous (*N. tabacum* L.) and monocotyledonous (*H. distichum* L.) plants by thermal stress. *Rus J Dev Biol* 47(6):335–347. doi: 10.1134/s1062360413030028
- Singhal VK, Kumar P (2008) Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeate* Royle). *J Biosci* 33:371–380. doi: 10.1007/s12038-008-0057-0
- Singhal VK, Rana PK, Kumar P, Kaur D (2011) Persistent occurrence of meiotic abnormalities in a new hexaploid cytotype of *Thalictrum foetidum* from Indian cold deserts. *Biologia* 66:58–464. doi: 10.2478/s11756-011-0033-2
- Streit A (2012) Silencing by throwing away: a role for chromatin diminution. *Developm Cell* 23(5):918–919. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.022
- Wu W, Zheng YL, Yang RW, Chen L et al (2003) Variation of the chromosome number and cytomixis of *Houttuynia cordata* from China. *J Syst Evol* 41:245–257.
- Zheng GC, Yang QR, Zheng YR (1987) The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in lily. *Caryologia* 40:243–259. doi: 10.1080/00087114.1987.10797827
- Zickler D, Kleckner N (2015) Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a016626

Надійшла в редакцію 21.09.20
Після доопрацювання 07.10.20
Прийнята до друку 18.03.21