

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Доронина Татьяна Валерьевна

**Особенности структуры антиподальных клеток зародышевого
мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и
программируемой клеточной гибели**

1.5.22 – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Лазарева Елена Михайловна, кандидат биологических наук.*
- Официальные оппоненты** – *Боголюбов Дмитрий Сергеевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук*
- Бадаева Екатерина Дмитриевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетических основ идентификации растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук*
- Мусинова Яна Рафаеловна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова*

Защита диссертации состоится «11» апреля 2023 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.9/2437>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Антиподальные клетки зародышевого мешка располагаются между материнскими тканями семязачатка и развивающимся после двойного оплодотворения эндоспермом. У злаков антиподальные клетки сохраняются долгое время после оплодотворения и формируют трёхуровневый многоклеточный комплекс.

Показано, что в развитии антиподального комплекса пшеницы выделяются три последовательно сменяющие друг друга этапа – пролиферации, дифференцировки и программируемой клеточной гибели (Чабан и др., 2011). Именно у культурных злаков в течение этапа дифференцировки в ядрах антиподальных клеток формируются гигантские политенные хромосомы. Политенные хромосомы позволяют антиподальным клеткам реализовать основную функцию - обеспечение развития и защиты формирующегося ценоцита эндосперма, являющегося основной тканью будущего зерна. Таким образом, антиподальные клетки с политенными хромосомами являются примером функциональной полиплоидизации. Структура гигантских многонитчатых хромосом растений отличается от классических политенных хромосом у животных и недостаточно изучены. Поэтому структура политенных хромосом антиподальных клеток имеет большое значение для фундаментальной науки.

Антиподальные клетки – идеальная модель для изучения этапов онтогенеза растительной клетки, т.к. цикл их развития занимает всего 10 дней. Финальным этапом их онтогенеза является программируемая клеточная гибель (ПКГ), которая индуцируется началом целлюляризации ценоцита эндосперма. Сведения об антиподальных клетках пшеницы в современной литературе фрагментарны и не дают четкого представления об особенностях структуры клеток в ходе дифференцировки комплекса и об их преобразованиях в ходе гибели.

Приоритетное формирование антиподального комплекса в начале онтогенеза женского гаметофита (Чабан и др., 2011) до двойного оплодотворения свидетельствует о важности иРНК, которые транскрибируются в гигантских полиплоидных ядрах антиподальных клеток. На пшенично-ржаных гибридах показано, что при нарушении структуры антиподального комплекса нарушается развитие ткани эндосперма и в результате формируется невыполненное зерно (Brink and Cooper, 1944; Ригин и Орлова, 1974). Развитие семени злаковых растений представляет интерес не только с

фундаментальной, но и с прикладной точки зрения, т.к. культурные злаки являются важнейшими сельскохозяйственными растениями. Поэтому очень важно понимать особенности ранних этапов морфогенеза в тканях зерна как фундаментальную основу для будущего улучшения показателей урожайности.

Целью исследования является изучение структуры антиподальных клеток комплексов оплодотворенного и неоплодотворённого зародышевого мешка на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели.

Задачи исследования

- 1) периодизация структурно-функциональных изменений клеток антиподального комплекса на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели
- 2) изучение особенностей структуры ядра и цитоплазмы на стадии дифференцировки антиподальных клеток,
- 3) характеристика субъединицы политенных хромосом антиподальных клеток на стадии дифференцировки,
- 4) выявление генов, повышенная экспрессия которых характерна для антиподальных клеток пшеницы на стадии дифференцировки,
- 5) изучение судьбы основных компонентов антиподальных клеток в ходе их программируемой клеточной гибели,

Объект и предмет исследования. Объектом исследования данной диссертационной работы являются антиподальные клетки зародышевого мешка пшеницы на стадии их дифференцировки и гибели. **Предметом исследования** в диссертации являются структура ядер с политенными хромосомами и органеллы цитоплазмы антиподальных клеток на разных стадиях дифференцировки и гибели, признаки ПКГ антиподальных клеток, оценка уровня экспрессии генов на этапе дифференцировки антиподального комплекса.

Научная новизна. Впервые детально охарактеризованы структурные особенности компонентов ядра и цитоплазмы антиподальных клеток на этапах дифференцировки и ПКГ. Впервые выявлена гетерогенность ядер клеток индивидуальных антиподальных комплексов по содержанию ДНК, возникающая в результате асинхронности раундов эндоредупликации. Определена площадь и содержание ДНК ядер разных ярусов комплексов на стадиях дифференцировки и гибели. Впервые изучался уровень экспрессии генов, характерный для антиподальных

клеток пшеницы на стадии средней дифференцировки. Новыми являются данные о распределении и структуре органелл цитоплазмы антиподальных клеток на разных этапах дифференцировки антиподальных комплексов и клеточной гибели. Подтвержден процесс сегрегации компонентов ядрышка в тела политенных хромосом, впервые охарактеризован состав сегрегатов ядрышка. Подтверждена экструзия компонентов ядрышка и частей хромосом в цитоплазму антиподальных клеток и в ценоцит эндосперма. Показано, что экструзия компонентов ядра проходит через разрыв ядерной оболочки. На стадии программируемой гибели антиподальных клеток впервые выявлены разрывы ДНК методом TUNEL и выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму антиподальных клеток. Впервые получена возможность сопоставить гибель клеток антиподального комплекса с охарактеризованными вариантами клеточной гибели растений по классификации Van Doorn (Van Doorn et al., 2011) и Reape and McCabe (Reape and McCabe, 2013).

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в получении фундаментальных знаний о структуре антиподальных клеток с политенными хромосомами, обеспечивающих формирование полноценного зерна, на этапах дифференцировки и программируемой клеточной гибели комплекса. Полученные характеристики субъединиц политенной хромосомы позволяют приблизиться к пониманию структуры политенной хромосомы растений. Характеристики клеток антиподального комплекса на стадиях дифференцировки и гибели позволят тестировать отклонения в развитии зерна культурных злаков.

Методология исследования. В основе данной диссертационной работы лежат классические методы клеточной и молекулярной биологии. Анализ данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки данных.

Достоверность. Результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью достоверности. Автором работы был проведен глубокий анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. Были проведены серии независимых научных экспериментов, все эксперименты неоднократно повторялись. Были проанализированы клетки сотен антиподальных комплексов на определенных стадиях дифференцировки и гибели. Сопоставление особенностей их морфологии позволило безошибочно идентифицировать последовательность стадий их онтогенеза.

Апробация работы. По результатам данной работы было сделано 16 докладов на международных и российских конференциях.

Публикации. По материалам работы были опубликованы 4 научные работы, все 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора в проведение исследования. Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе литературных данных, постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Клетки, формирующие уровни антиподальных комплексов зародышевых мешков пшеницы полиморфны по содержанию ДНК, площадям, форме и структуре на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели.
2. Программируемая клеточная гибель антиподальных клеток сопровождается последовательными структурными преобразованиями ядер с политенными хромосомами и гигантских ядрышек, разрывами ДНК и выходом цитохрома с из митохондрий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объект исследования. Объектом исследования были выбраны гаплоидные клетки антиподального комплекса зародышевого мешка гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Московская 39 ($n=21$).

Материал для изучения морфологии антиподальных клеток. Материал для исследований получен в ТСХА им. Тимирязева. В работе использовали фиксированные семяпочки пшеницы, взятые на 3 - 10 день после оплодотворения, занимающие от одной трети до половины размера колосковой чешуи. Для исследований были использованы как оплодотворенные, так и неоплодотворенные семяпочки.

Фиксация материала. Для проведения иммуноцитохимического окрашивания, гистохимических окрашиваний и FISH гибридизации семязачатки фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma) на PBS (pH=7,2) и PHEM (pH=6,9) буферах (PHEM – 60мМ PIPES, 25мМ HEPES, 10мМ EDTA, 2мМ MgSO₄) (Sigma). Для Ag-Nor окрашивания и приготовления хромосомных препаратов семязачатки фиксировали в смеси этанола и

ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Для изучения ультраструктуры клеток семязачатки фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида (Sigma) на 0,1M фосфатном буфере Зоренсена (pH=7,3) с добавлением сахарозы (0,015г/мл) (Sigma). Фиксация проводилась в течение 2 часов.

Приготовление тотального препарата. Тотальный препарат зародышевого мешка, содержащий эндосперм, зародыш и антиподальные клетки, выделяли из тканей семязачатки при помощи препаровальных игл под бинокулярной лупой по методу Петровой (Петрова, 1970).

Периодизация развития антиподальных клеток. В качестве материнских растений выбирали растения, только вышедшие из влагалища листа с зелеными пыльниками и нераспустившимися рыльцами. В процессе подготовки к кастрации удаляли слабо развитые колоски, центральные цветки соцветия, ости и верхние части колосковых чешуй. Тычинки цветков удаляли пинцетом, оставляли только пестики. Материнские растения помещали под изоляторы. Для гибридизации использовали ограниченно свободное опыление. В пробирки для гибридизации ставили срезанные отцовские растения, размещая их на половину колоса выше материнских растений под общий изолятор для гибридизации. После гибридизации фиксировали следующие точки – 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 дней после опыления.

Окрашивание ДНК ядер DAPI. Для изучения структуры ядер антиподальных клеток, ДНК окрашивали в течение 5 минут в 0,05% водном растворе флуорохрома DAPI в разведении 1 мкл на 1 мл, отмывали и заключали в Mowiol (Hoechst, Германия).

Определение количества ДНК ядер антиподальных клеток в программе ImageJ. Количество ДНК ядер антиподальных клеток оценивали на снимках ядер антиподальных комплексов, окрашенных DAPI (на ув. $\times 20$) в программе ImageJ. После вычитания фона, выделяли индивидуальные ядра и определяли показатель интенсивности свечения каждого ядра «Integrated Optical Density». В качестве репера пloidности на тех же снимках выбраны ядра триплоидных клеток эндосперма.

Определение площади и округлости ядер антиподальных клеток в программе Image J. Площадь («Area») и округлость ядер («Circularity») антиподальных клеток оценивали на снимках ядер антиподальных комплексов, окрашенных DAPI (на ув. $\times 20$) в программе ImageJ.

Окрашивание гематоксилином Каррачи. Тотальные препараты зародышевых мешков помещали в раствор гематоксилина Каррачи на 10 мин, затем промывали в двух сменах дистиллированной и проточной воды по 5 мин и заключали в Mowiol (Hoechst, Германия).

Выявление разрывов в ДНК по методу TUNEL. Тотальные препараты зародышевых мешков пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 (Molecular Probs, UK) на PBS (Эко Сервис, Россия) в течение 30 мин, помещали в кокоделатный буфер (pH=7,4), содержащий терминальную дезоксиинуклеотидилтрансферазу 20 ед/мкл (Силекс, Россия), 3'-концевые меченые зонды 10мМ dATP (Силекс, Россия), 1mM флуоресцеин (Силекс, Россия). Остановку реакции проводили, раствором 2×SSC в течение 15 мин. Препараты заключали в Mowiol (Hoechst, Германия).

Ag-NOR окрашивание аргентофильных белков ядрышка по методу Howell and Black, 1980. Выделенные из семяпочек, фиксированных в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), зародышевые мешки промывали в трех сменах 70° спирта, проводили по спиртам понижающейся концентрации (50°, 40, 30°, 20, 10) до дистиллированной воды. Промывали в трех сменах бидистиллированной воды и помещали в каплю красящей смеси. Для приготовления красящей смеси к 2 частям 50% AgNO₃ добавляли 1 часть 2% желатины, содержащей 1% муравьиной кислоты (по объему), достигая pH=3. Окрашивание проводили во влажной камере при 37°С до приобретения красящей смесью темно-коричневого цвета. Препараты промывали в 5 сменах деионизованной воды и заключали в Mowiol (Hoechst, Германия).

Окрашивание клеток акридиновым оранжевым. Для одновременного выявления ДНК и РНК в антиподальных клетках зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 на PBS в течение 30 мин и после двукратной отмывки кислым фосфатным буфером (PBS, pH=3,8), помещали в каплю 0,01% раствора акридинового оранжевого (Merck) на кислом фосфатном буфере (PBS, pH=3,8) на 1 мин.

Приготовление хромосомных препаратов. Семяпочки, фиксированные в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 гидратировали в спиртах понижающейся концентрации. Выделенные из семяпочек зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 (Merck) на PBS в течение 30 мин - 1 часа, отмывали и обрабатывали ферментом 4% целлюлазой в течение 1-2 часов. После

отмывки ткани мацерировали петлей в стеклянной пробирке, затем из 45% уксусной кислоты раскапывали на стекла и готовили давленные препараты хромосом.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). Зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 (Merck) на PBS в течение 30 мин, обрабатывали РНКазой в течение 30 минут при 37°C, помещали в смесь 50% формамида и 2xSSC на 30 минут при 60°C, затем в гибридизационную смесь, содержащую 50% формамид, SDS, додецилсульфат натрия, SSC и олигонуклеотиды. Проводили денатурацию при 92°C в течение 3 минут и гибридизацию в течение ночи при 37°C. После гибридизации проводили серию отмывок. Зародышевые мешки докрашивали DAPI и заключали в Mowiol. В качестве зондов были выбраны последовательности консервативного для растительных теломер повтора 5-СССТАААСССТАААСССТААА-3, конъюгированные с Cy3 (Cuadrado Á. et al., 2009).

Иммуноцитохимическое выявление клеточных органелл. В качестве первых антител для выявления ядрышек использовали мышинные моноклональные антитела к мажорному белку плотного фибриллярного компонента ядрышка фибрилларину 38F3 (Invitrogen), в разведении 1:50, для выявления ЭПР - мышинные моноклональные антитела против маркера резидентных белков ЭПР KDEL, 1:50, для выявления аппарата Гольджи - мышинные моноклональные антитела к белку маркеру 58K/FTCD (formiminotransferase cyclodeaminase), 1:100, для выявления митохондрий - кроличьи поликлональные антитела к цитохрому с (Agrisera, Швеция) 1:100, для выявления микротрубочек – мышинные моноклональные антитела против тубулина клон DM1a (Sigma, США), 1:250, для выявления актина - мышинные моноклональные антитела против актина клон 10-B3 (MabGPa) (Sigma, США), 1:100. В качестве вторых антител использовали ослиные иммуноглобулины против мыши, конъюгированные с Alexa 488 (ReadyProbes), 2:1000 и козы антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с TRITC (Jackson Immuno Research, США), 1:100. Для проверки специфичности иммуноцитохимического окрашивания были сделаны соответствующие негативные контроли (окраска только вторыми антителами).

Световая микроскопия. Препараты, окрашенные DAPI, TUNEL, акридиновым оранжевым, после FISH-гибридизации и иммуноцитохимического окрашивания изучались с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы ×20 и ×63, изображения записывались с

помощью цифровой камеры Axioscam HRm. Препараты после окрашивания гематоксилином и Ag-NOR окрашивания изучали с помощью светового микроскопа Leica DM 1000 с объективами N Plan×4, ×10, ×40, ×100.

Электронная микроскопия. Для изучения ультраструктуры препараты готовили по стандартной методике. Ультратонкие срезы изучались с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL-1400 с цифровой фотокамерой Quemesa (Olympus), трансмиссионного микроскопа JEOL-1011 с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN.

Определение уровня экспрессии генов методом RT-ПЦР. Для получения РНК образцы антиподальных клеток, зародышевых мешков фиксировали в растворе для сохранения РНК (RNAlater, Qiagen, Germany). Выделение РНК осуществляли по прописи, рекомендуемой фирмой-производителем набора Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA). Первую нить кДНК синтезировали с помощью набора MMLV RT (Евроген, Россия). Равные аликвоты реакционных смесей использовали непосредственно в качестве матриц в реакция количественной ПЦР с использованием наборов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и амплификатора LineGene 9660 (Bioer Technology, China) в режиме 95°C–5 мин (денатурация матрицы и активация ДНК полимеразы) и 40 циклов [94°C–15 сек (денатурация) и 60°C–1 мин (отжиг/элонгация)]. Уровни экспрессии генов относительно референсного гена *Ta54227* – АТФазы, участвующей в контроле клеточного цикла (Mu et al., 2019), вычисляли методом $\Delta\Delta C_q$. Для каждого гена проводили три независимых определения уровня экспрессии.

Обработка изображений. Обработка изображений производилась в программах ImageJ и Photoshop CS6. Чтобы повысить качество полученных с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа изображений, проводили деконволюцию с использованием программы ImageJ (плагины Diffraction PSF 3D и Iterative Deconvolve).

Схемы. Для подготовки авторских схем были использованы программы BioRender, Adobe Illustrator и Adobe Photoshop CS6.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка производилась в программах MS Excel, GraphPadPrism 9. Различия результатов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Общая морфология комплексов антиподальных клеток

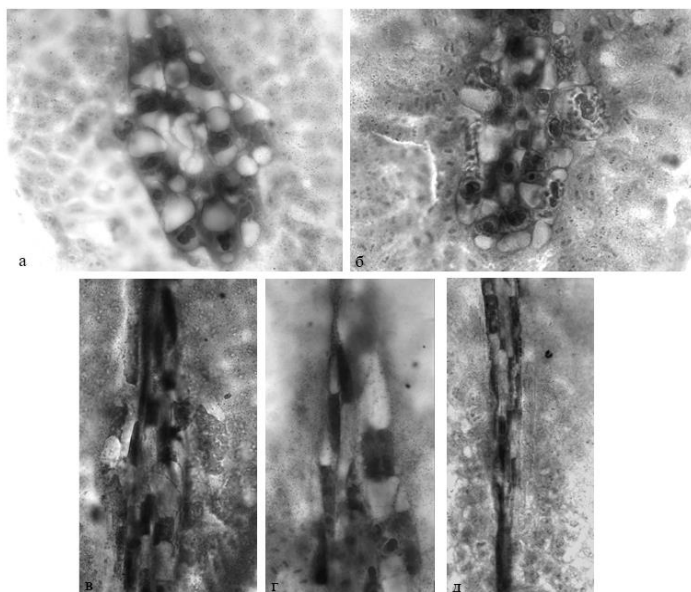


Рис. 1. Структура антиподальных комплексов в ходе онтогенеза, тотальные препараты. а – ранняя стадия дифференцировки, б – средняя стадия дифференцировки, в – поздняя стадия дифференцировки, г – начальная стадия гибели, д – финальная стадия гибели

В оплодотворенных зародышевых мешках на ранней стадии дифференцировки все клетки антиподального комплекса имеют ядра сходного размера и цитоплазму с двумя крупными вакуолями. Позднее в части ядер выявляются индивидуальные политенные хромосомы. Начало клеткообразования в ценоците эндосперма совпадает с началом программируемой клеточной гибели антиподальных клеток, на стадии многослойного клеточного эндосперма антиподальные клетки полностью резорбируются его клетками (рис. 1).

В неоплодотворенных зародышевых мешках выявляются полностью сформированные антиподальные комплексы, которые также проходят стадию дифференцировки и гибели. Но площадь, занимаемая клетками комплекса, не меняется в течение дифференцировки и гибели. Гибель антиподальных клеток наступает вследствие внутренних причин, т.к. в неоплодотворенных зародышевых мешках эндосперм не формируется (рис. 2).



Рис. 2. Антиподальные комплексы неоплодотворенных зародышевых мешков пшеницы. Клетки антиподальных комплексов на разных стадиях дифференцировки (а – ранняя, б – поздняя) и гибели (в – ранняя, г – поздняя).

2. Ядра антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.

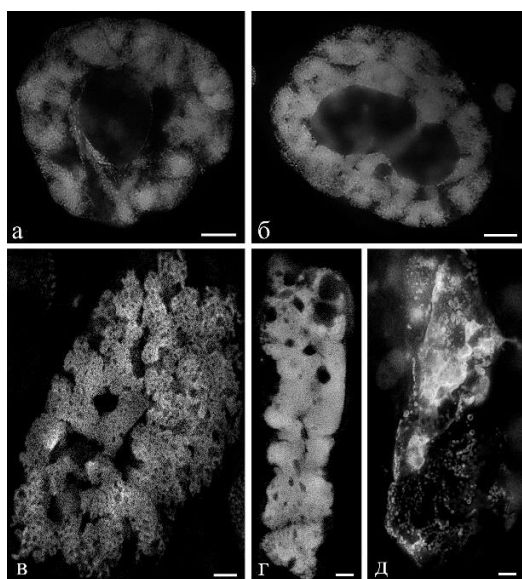


Рис. 3. Ядра антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадиях дифференцировки (а, б) и программируемой клеточной гибели (в, г, д). DAPI. Масштабный отрезок – 10 мкм.

На ранней стадии дифференцировки в ядрах антиподальных клеток не выявляются отдельные политенные хромосомы. На средней и поздней стадии дифференцировки ядра заметно увеличиваются в размерах, приобретают овальную форму и в них индивидуализуются гигантские политенные хромосомы (рис. 3, а, б). На этапе гибели хроматиды политенных хромосом и, отдельные хромосомные территории сближаются (рис. 3, в) и позднее объединяются (рис. 3, г), в телах хромосом выявляются многочисленные лакуны разного размера. В некоторых ядрах клеток апикального яруса наблюдается фрагментация

хроматина (рис. 3, д). На финальных этапах гибели все ядра комплекса вытянутые и располагаются в узкой области на поверхности многоклеточного эндосперма. Наблюдения систематизированы на схеме (рис. 4).

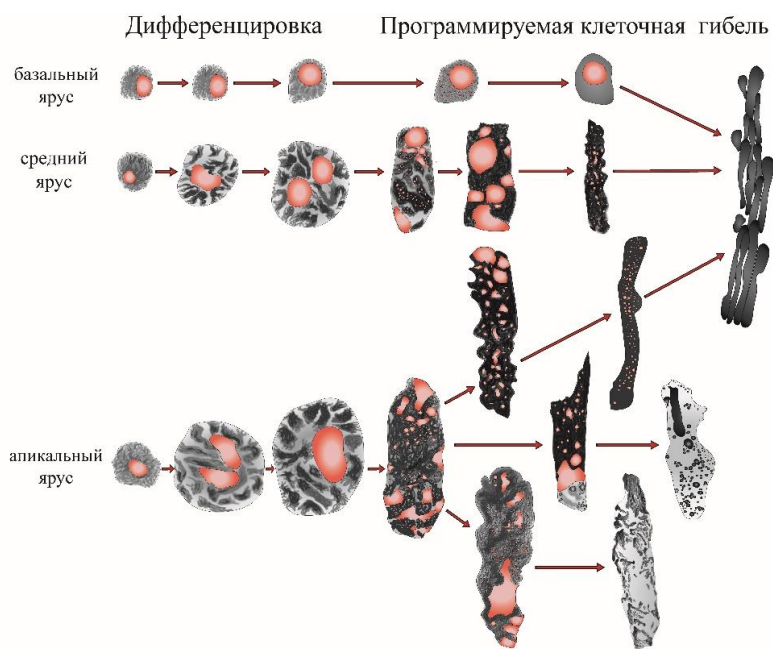


Рис. 4. Структура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки и гибели комплекса.

3. Ядра антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.

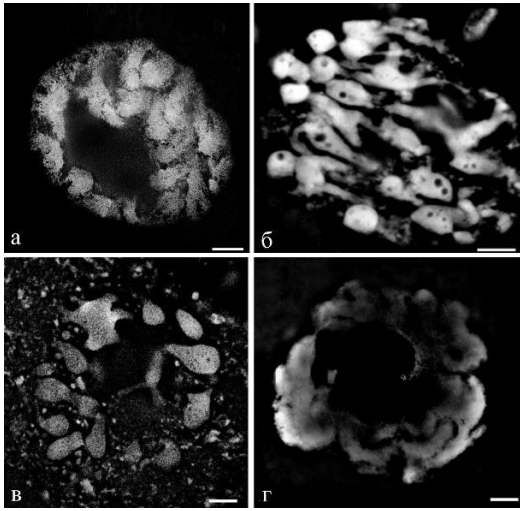


Рис. 5. Ядра антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков на стадиях дифференцировки (а) и программируемой клеточной гибели (б, в, г). DAPI. Масштабный отрезок – 10 мкм.

На стадии ранней дифференцировки ядра имеют фибриллярную структуру. На стадии средней и поздней дифференцировки в ядрах выявляются индивидуальные политенные хромосомы (рис. 5, а). На стадии гибели выявляются ядра с компактными хромосомами (рис. 5, б), сближения и объединения хромосом не обнаружено. На поздних этапах гибели хроматин антиподальных ядер фрагментирован (рис. 5, в), многочисленные мелкие фрагменты ДНК хромосом обнаруживаются за пределами ядра в цитоплазме клеток. У некоторых клеток заметна деградация хроматина в центре ядра,

(рис. 5, г). На финальных этапах гибели клеток комплекса в ядрах происходит разрушение хроматина, а ядрышки сохраняются. Наблюдения систематизированы на схеме (рис. 6).

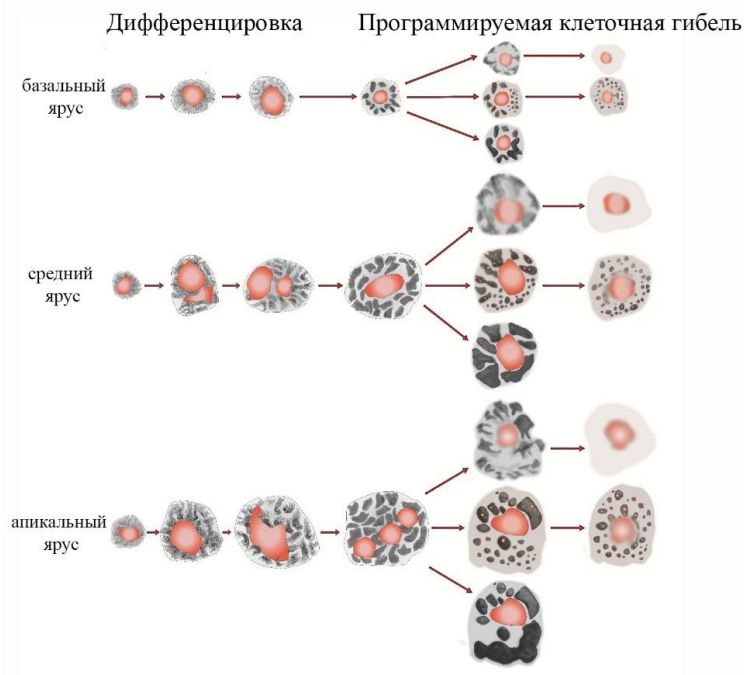


Рис. 6. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки и гибели комплекса.

4. Политенные хромосомы антиподальных клеток.

На изображениях, полученных с помощью ТЭМ, были измерены толщина фибрилл 10 ядер антиподальных клеток и 10 ядер эндосперма, по 25 измерений на каждое ядро. В результате измерений минимальная толщина фибриллы составила 0,09 – 0,15 мкм. Наиболее часто данные фибриллы переплетались, образуя более крупные фибриллы величиной 0,2 – 0,3 мкм. Размер фибрилл в ядрах эндосперма соответствовал толщине фибрилл (хроматид) в составе политенных хромосом антиподальных клеток. Анализ структуры политенной хромосомы антиподальных клеток показывает, что тело хромосомы построено из параллельно расположенных толстых фибрилл, образованных двумя тонкими переплетающимися фибриллами, которые, переплетаясь между собой, образуют крупные цепочки. В дальнейшем все фибриллы, образующие плечо хромосомы, подвергаются дополнительной спирализации.

Методом FISH выявлены теломерные участки хромосом в составе ядер хромосом эндосперма (рис. 7, а-в) и антиподальных клеток. На стадии ранней дифференцировки в ядрах антиподальных клеток с неиндивидуализованными политенными хромосомами все меченные теломерные повторы локализуются вблизи друг друга (рис. 7, г, д) На стадии средней дифференцировки теломерные участки хроматид политенных хромосом не объединены, и маркируются зондами в виде отдельных скоплений. На стадии поздней дифференцировки в ядрах наблюдали обособленные политенные хромосомы, теломерные повторы которых выявлялись в дистальных областях плеч (рис. 7, е, ж). На стадии гибели теломерные повторы занимали локальные области в составе объединенных хромосомных территорий.

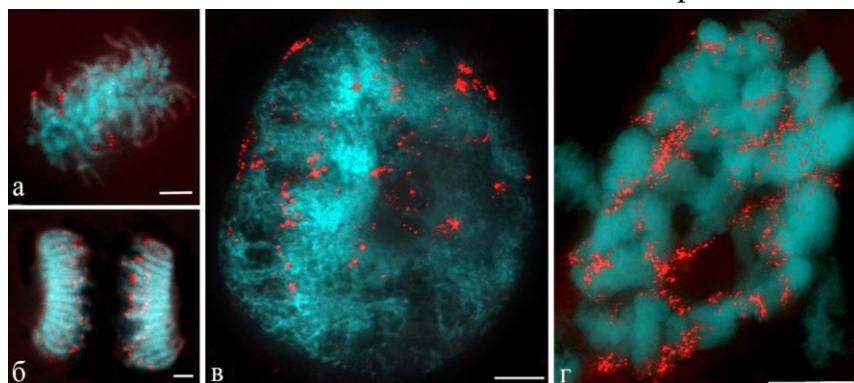


Рис. 7. Теломерные участки хромосом эндосперма (а, б) и антиподальных клеток на ранней (в) и поздней стадии (г) дифференцировки. Z-проекция. Масштабный отрезок – 5 мкм (а, б), 10 мкм (в, г).

5. Ядрышки антиподальных клеток.

Было показано, что ядра антиподальных клеток оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешков на всех стадиях дифференцировки содержат от одного до четырех гигантских ядрышек (рис.8) и несколько зон локализации мини-ядрышек (латентные ядрышковые организаторы).

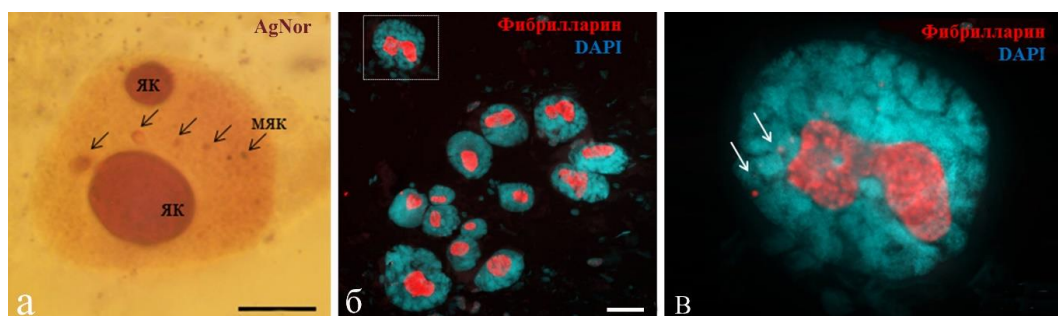


Рис. 8. Ядрышки (як) антиподальных клеток на стадии дифференцировки, а – AgNor-окрашивание, б, в - иммуноцитохимическое выявление фибрилларина. ДНК окрашена DAPI. Стрелки указывают на зоны локализации мини-ядрышек (мяк). Масштабный отрезок – 20 мкм (а), 30 мкм (б).

На стадии гибели в ядрах антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков выявлена сегрегация отдельных компонентов ядрышка и перераспределение их в лакуны в телах политенных хромосом в виде агрегатов различного размера и формы. В этих структурах нам удалось выявить аргентофильные белки ядрышка после Ag-NOR окрашивания, РНК после окрашивания акридиновым оранжевым и фибрилларин, мажорный белок плотного фибриллярного компонента ядрышка после иммуноцитохимического окрашивания (рис. 9).

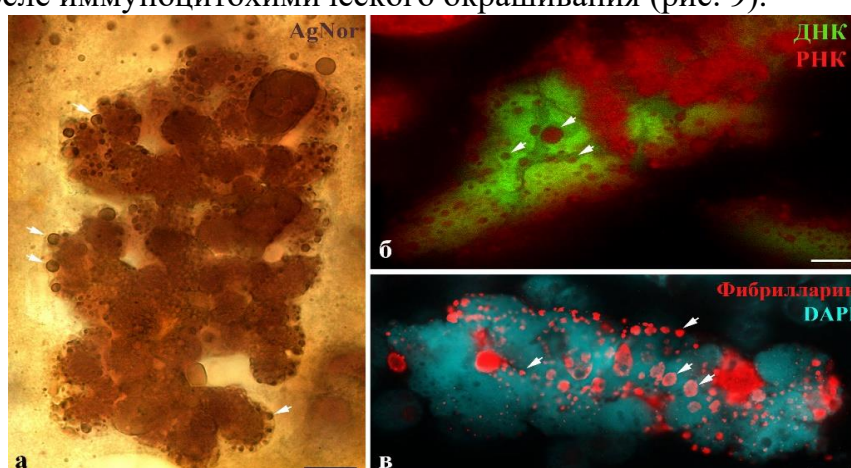


Рис. 9. Сегрегированные компоненты ядрышек на стадии гибели, а – AgNor-окрашивание, в – окрашивание акридиновым оранжевым, в - иммуноцитохимическое выявление фибрилларина. ДНК окрашена DAPI, Стрелки указывают на сегрегированные компоненты. Масштабный отрезок – 10 мкм.

В ядрах клеток неоплодотворенных зародышевых мешков сегрегации компонентов ядрышка не происходило и ядрышки сохранялись вплоть до поздних стадий гибели.

6. Разрывы ДНК в ядрах антиподальных клеток на стадии гибели

На стадии гибели клеток антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков методом TUNEL выявляются 3'-концевые разрывы ДНК. На начальных стадиях гибели некоторые ядра не содержат разрывов. В одних ядрах антиподального комплекса разрывы выявляются только у части хромосом (рис. 10, а), в других ядрах разрывы затрагивают все хромосомы (рис. 10, б). В клетках с объединенными хромосомными территориями разрывы выявляются во всем объеме хроматина (рис. 10, в) и на финальной стадии гибели разрывы выявляются во всем объеме всех ядер комплекса.

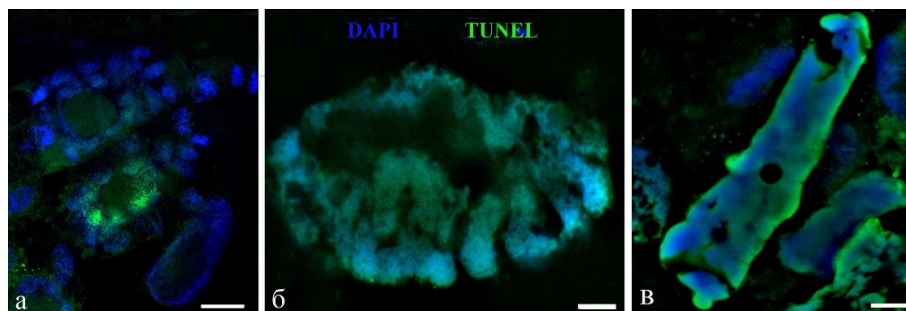


Рис. 10. Разрывы ДНК (TUNEL) в антиподальных клетках оплодотворенных зародышевых мешков. В отдельных хромосомах ядра (а), во всех хромосомах ядра (б), в ядрах с объединенными хромосомами (в). Масштабный отрезок – 10 мкм.

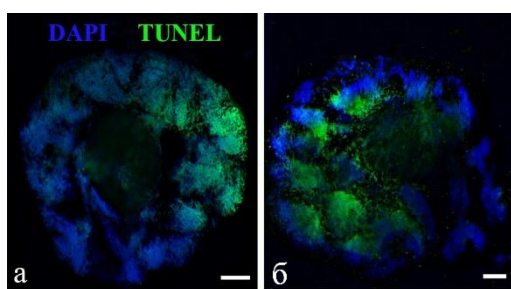


Рис. 11. Разрывы ДНК (TUNEL) в ядрах антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков. В отдельных хромосомах ядра (а), в центральной части ядра масштабный отрезок – 10 мкм.

На стадии гибели антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков методом TUNEL в ядрах также выявляются 3'-концевые разрывы ДНК. Часто разрывы затрагивают часть хромосом ядра (рис. 11, а). В ядрах, где разрывы ДНК локализуются в центральной области ядра, вблизи ядрышка, наблюдается деградация хроматина (рис. 11, б). Такая картина наблюдается в ядрах клеток всех ярусов комплекса.

6. Ультраструктура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.

На ранней стадии дифференцировки в округлых ядрах фибриллы хроматина локализованы около ядерной оболочки, вокруг ядрышка выделяется светлый «дворик». На средней стадии дифференцировки в ядрах заметны области локализации фибрилл отдельных политенных хромосом. На поздней стадии дифференцировки в вытянутых ядрах с гигантскими ядрышками неправильной формы, хроматиды политенных хромосом формируют ячеистую сеть, в контакте с ядерной оболочкой находятся разобщенные хроматиды дистальных участков политенных хромосом. Ядерная оболочка пронизана многочисленными поровыми комплексами и образует глубокие инвагинации. В ядрах выявляются полиморфные структуры, содержащие РНП, ассоциированные с поверхностью политенных хромосом, идентифицированные по методу Бернарда.

В ядрах антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на ранней стадии гибели происходит расслоение и перераспределение материала ядрышка в область хромосом. На средней и поздней стадиях гибели компоненты ядрышка начинают сегрегировать на глобулы различной формы и размера и перемещаются в области петель хроматид (рис. 12, а, б). Наблюдается экстррузия гранулярного компонента ядрышка (рис. 13, а) и хроматина (рис. 13, б). Целостность ядерной оболочки в местах экструзаций хроматина и материала ядрышка нарушена (рис. 13, а). В процессе гибели гигантские ядрышки антиподальных клеток сильно уплощаются, в них выявляются многочисленные гетерогенные фибриллярные центры. Хроматин на поздних стадиях гибели значительно уплотнён, в нем не выявляются отдельные хроматиды и территории отдельных политенных хромосом.

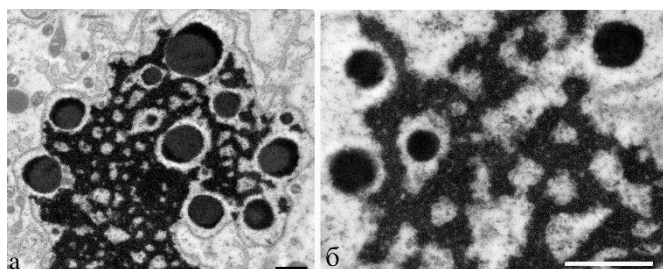


Рис. 12. Неоднородные (а) и однородные (б) сегрегированные компоненты ядрышка между хроматидами политенных хромосом, ТЭМ. Масштабный отрезок – 5 мкм.

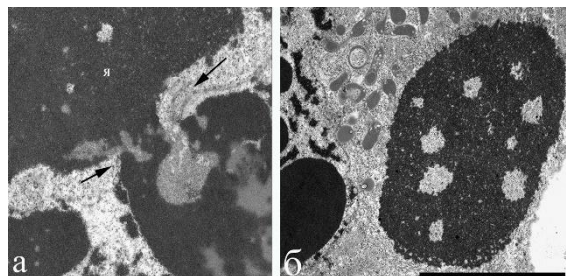


Рис. 13. Экстррузия ядрышка (а) через разрывы ядерной оболочки (стрелки) и хроматина на стадии гибели, ТЭМ. Масштабный отрезок – 5 мкм.

7. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток.

Количество ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток комплексов, находящихся на различных стадиях дифференцировки и гибели, определяли на тотальных препаратах оплодотворенных зародышевых мешков, окрашенных DAPI, в программе ImageJ. Было проанализировано 100 антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков (2013 антиподальных клеток).

В каждом комплексе клетки базального яруса имели наименьшее содержание ДНК и площадь, антиподальные клетки со средними значениями содержания ДНК и площади располагались в среднем ярусе комплекса. Ядра апикального яруса комплекса проходили наибольшее число раундов эндоредупликации генома, площадь этих клеток была наибольшей. На ранней и средней стадии дифференцировки ядра всех ярусов имели округлую форму, на поздней стадии дифференцировки ядра клеток становились овальными, за исключением ядер клеток базального яруса, в течение клеточной гибели ядра клеток сильно вытягивались, особенно на поздних стадиях гибели (рис. 14).

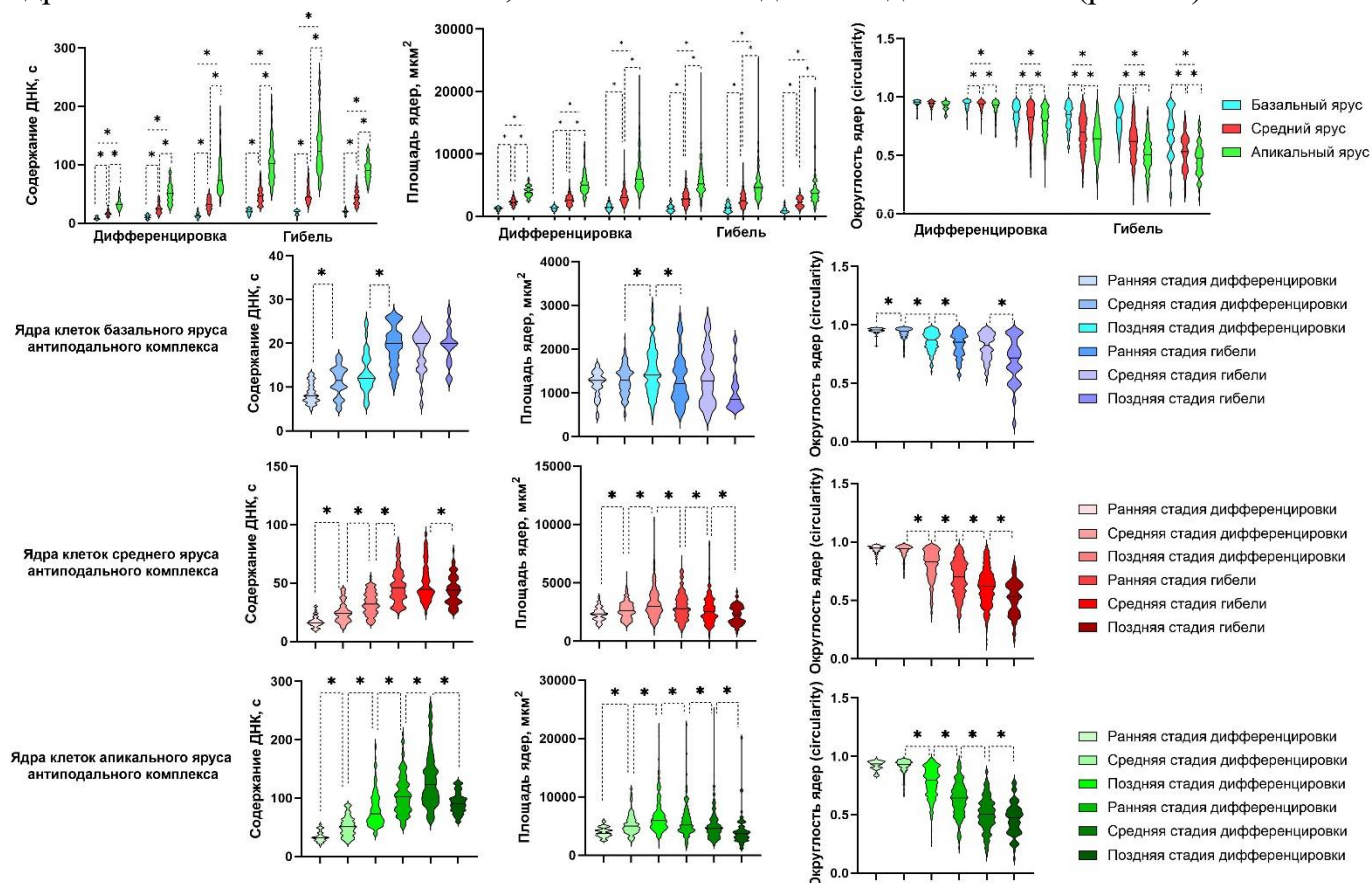


Рис. 14. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. Линией обозначена медиана, * - $p < 0.05$ по критерию Манна-Уитни.

11. Структура и локализация органелл цитоплазмы антиподальных клеток.

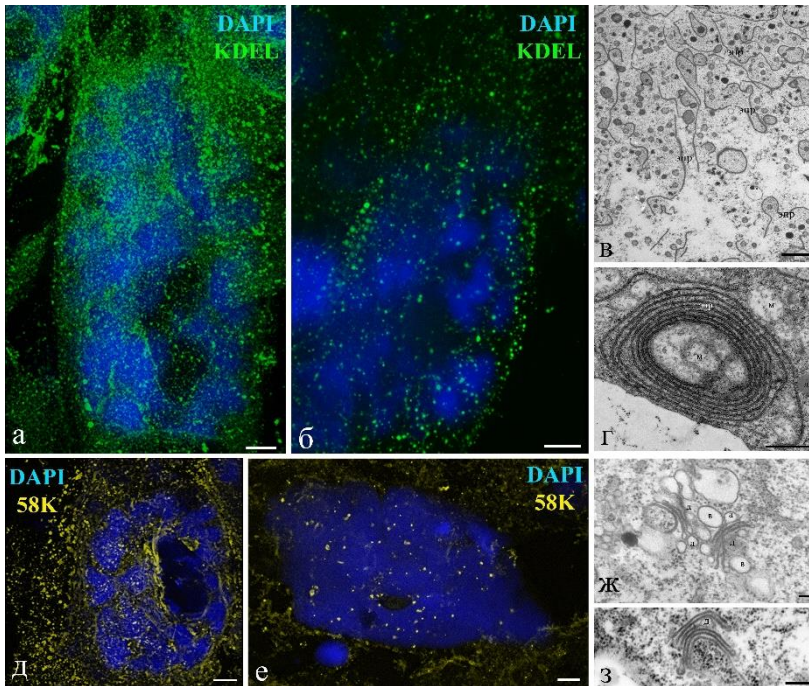


Рис. 15. Локализация ЭПР на стадии дифференцировки (а) и гибели (б), ультраструктура ЭПР на ранней (в) и поздней (г) стадии дифференцировки. Локализация диктиосом аппарата Гольджи на стадии дифференцировки (д) и гибели (е), ультраструктура диктиосом на ранней (ж) и поздней (з) стадии дифференцировки. Масштабный отрезок – 10 мкм (а, б, в, д е), 5 мкм (г), 100 нм (ж, з).

На ранней стадии дифференцировки комплекса ЭПР и диктиосомы аппарата Гольджи расположены вокруг ядра и в цитоплазме клеток (рис. 15, а, д). На стадии гибели количество цистерн ЭПР и диктиосом аппарата Гольджи снижается (рис. 15, б, е). Ультраструктура ЭПР меняется: на ранней стадии дифференцировки – выявляется сеть протяженных плоских цистерн и области коротких трубочек (рис.15, в), на среднем и позднем стадиях – концентрические круги (рис.15, г), на стадиях гибели расширенные цистерны ЭПР.

Диктиосомы на ранних стадиях дифференцировки состояли из 5-8 цистерн с большими ампулами с прозрачным содержимым (рис.15, ж). На стадиях гибели стопки цистерн диктиосом имели изогнутую форму или форму кольца, на краях цистерн располагались маленькие ампулы с темным содержимым (рис.15, з), вблизи аппарата Гольджи выявлялись многочисленные везикулы. Возможно, это связано с тем, что аппарат Гольджи на разных стадиях дифференцировки клеток продуцировал различные полисахариды и гликопротеиды.

Пластиды на всех стадиях дифференцировки и гибели имели тёмный зернистый матрикс, округлую, вытянутую, или чашевидную форму. В пластидах присутствовало небольшое количество крахмальных зерен и от 1 до 8 неупорядоченных ламелл.

На ранней стадии дифференцировки выявлялись небольшие круглые митохондрии с неупорядоченными пальцевидными кристами, на поздних стадиях

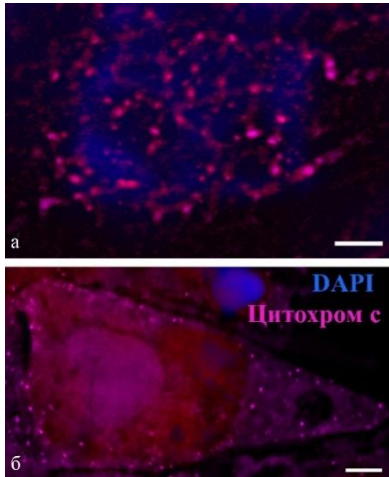


Рис. 16. Цитохром с в митохондриях (а) и антиподальных клетках (б) на стадии гибели комплекса (в) оплодотворенных зародышевых мешков. Масштабный отрезок – 10 мкм.

дифференцировки чашевидные митохондрии. Был продемонстрирован выход цитохрома с из митондриий в процессе программируемой клеточной гибели антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков (рис. 16). Таким образом, митохондрии участвуют в программируемой клеточной гибели антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков и не участвуют в клеточной гибели антиподальных клеток из неоплодотворенных зародышевых мешков.

Впервые была описана система микротрубочек и актиновых филаментов. На стадии дифференцировки выявлялась тонкая сеть пучков микротрубочек и концентрические пучки актиновых филаментов вокруг ядер клеток. На стадиях гибели пучки микротрубочек и актиновых филаментов утончались, их сеть прореживалась.

В цитоплазме наблюдали масляные тельца различного размера, окруженные мембраной и липидные капли, не имеющие мембраны.

Структура клеточных стенок между антиподальными клетками неоднородная, толщина её неодинаковая, в ней наблюдаются неупорядоченные микрофибриллы гемицеллюлозы, липидные капли и везикулы, встречаются явления экзоцитоза мультивезикулярных телец в клеточные стенки или апопласт (рис.17). Наблюдался перенос органелл – пластид и митохондрий через широкие цитоплазматические каналы между клетками и между антиподальными клетками и ценоцитом эндосперма (рис. 18).

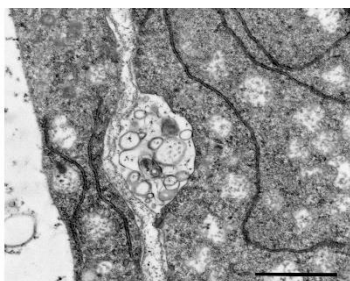


Рис. 17. Мультивезикулярное тело в апопласте антиподальной клетки. Масштабный отрезок - 2 мкм.

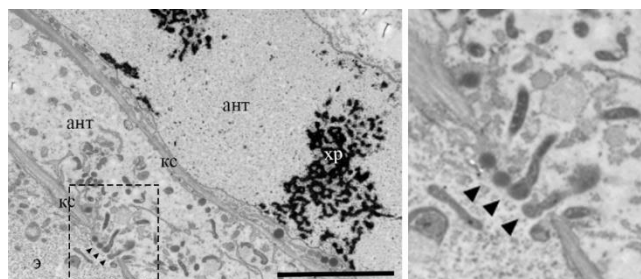


Рис. 18. Перенос различных органелл из антиподальной клетки (ант) в эндосперм (э) через широкие каналы (стрелки) в клеточной стенке (кс). Масштабный отрезок - 2 мкм.

12. Уровень экспрессии генов в антиподальных клетках на стадии дифференцировки.

В литературе выявлены гены, экспрессирующиеся в антиподальных клетках *Arabidopsis* (Steffen et al., 2007). Среди этих генов нами были выбраны те гены, которые имели ортологи у пшеницы и описанную функцию. Одна из возможных функций антиподальных клеток – защитная, поэтому для изучения мы выбрали гены: цитохром p450, который экспрессируется в антиподах *Arabidopsis*, и ген Hsp70, семейства белков теплового шока, который экспрессируется в клетках с политенными хромосомами двукрылых. Была изучена экспрессия гена гидролазы и гена, связанного с метаболизмом стероидов. Поскольку растительные гормоны регулируют фактически все события в развитии растений, нами был выбран ген, связанный с метаболизмом этилена (семейство C_2H_2 и C_2HC), экспрессирующийся в антиподах *Arabidopsis* и ген, связанный с метаболизмом ауксина, т.к. было показано, что ауксин влияет на начальные стадии онтогенеза антиподальных клеток у *Zea mays* (Chetoor and Evans, 2015). В качестве референсного гена взят *Ta54227* (Mu et al., 2019).

Наиболее сильно экспрессируемы в антиподальных клетках оказались гены

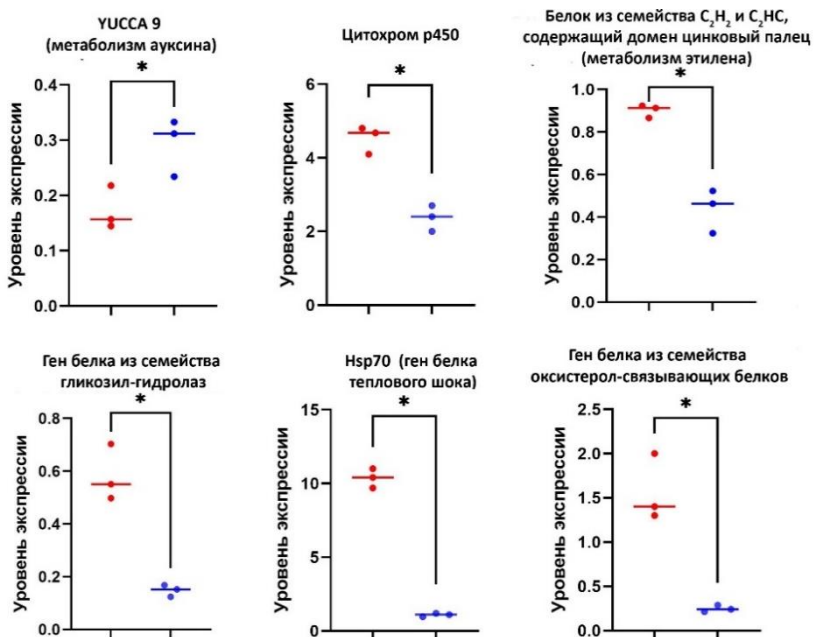


Рис. 19. Относительные уровни экспрессии генов в антиподальных клетках (красный) и в клетках зародышевого мешка (синий). Линией обозначена медиана. * $p < 0.05$ по критерию Манна-Уитни.

цитохрома p450 (в 4,6 раза сильнее референсного гена) и Hsp70 (в 10,4 раза сильнее референсного гена). Если сравнить данные по чистой фракции антиподальных клеток и фракцию всех клеток зародышевого мешка (содержащую зародыш, эндосперм и антиподальные клетки), то экспрессия всех генов, за исключением YUCCA 9, в антиподальных клетках больше, чем в клетках зародышевого мешка (рис.19).

13. Периодизация развития антиподальных клеток.

После кастрации и ограниченно свободного опыления растений пшеницы, был проведен микроскопический анализ тотальных препаратов зародышевых мешков, выделенных из семян, зафиксированных на разных сроках после опыления.

Выявили, что ранняя дифференцировка антиподальных клеток происходит до 24 часов после опыления, на этой стадии хромосомы антиподальных клеток не индивидуализированы. Средняя дифференцировка, при которой индивидуализуются политенные хромосомы, наступает через 48 часов, а поздняя стадия дифференцировки, на которой наблюдаются уплощение ядер - через 72-96 часов. Ранняя стадия клеточной гибели выявлялась через 120 часов, в некоторых клетках на этой стадии наблюдались сегрегация компонентов ядрышка в тела политенных хромосом, разрывы ДНК и выход цитохрома с из митохондрий. Средняя стадия гибели наступала через 154-178 часов, на этой стадии выявлялись все характерные черты гибели в подавляющем числе клеток комплекса – фрагментация ДНК, выход цитохрома с митохондрий, разрывы ядерной оболочки, экструзия гранулярного компонента ядрышка и участков хромосом. Поздняя стадия гибели, сопровождающаяся полной фрагментацией и абсорбцией клеток, происходила на 8-10 сутки после опыления.

Заключение.

Антиподальные клетки выполняют роль барьерной и трофической ткани в зародышевом мешке, располагаясь между материнскими тканями и эндоспермом, образованным после двойного оплодотворения. Большинство исследователей (Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997; Чабан и др., 2011) высказывали предположение о секреторной и питающей функции антиподальных клеток женского гаметофита.

На ранней стадии дифференцировки антиподальные клетки выполняют осморегуляторную функцию за счет крупных вакуолей. На стадиях средней и поздней дифференцировки в антиподальных клетках активно идут процессы эндоредупликации, транскрипции и синтеза необходимых веществ. Мы предполагаем, что это питательные вещества, гормоны, витамины и антистрессорные факторы, необходимые для обеспечения правильного развития эндосперма на нуклеарной стадии. Начало целлюляризации ценоцита эндосперма запускает программируемую клеточную гибель антиподальных клеток. Гибель клеток комплекса наступает

неодновременно, некоторые клетки продолжают активно функционировать. Гибнущие антиподальные клетки путем экстррузии передают в ценоцит эндосперма фрагменты хроматина и ядрышка и органеллы через широкие каналы цитоплазмы в клеточных стенках. На финальных этапах гибели антиподальные клетки полностью резорбируются эндоспермом (рис.20).

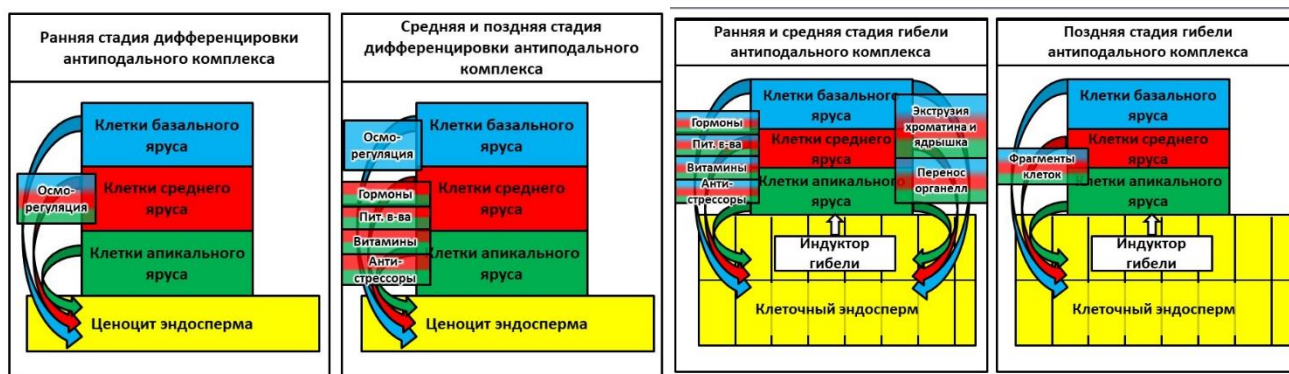


Рис. 20. Предполагаемые функции антиподальных клеток на стадии дифференцировки и программируемой клеточной гибели.

В настоящем исследовании впервые удалось охарактеризовать преобразования структуры клеток антиподальных комплексов оплодотворённых и неоплодотворённых зародышевых мешков пшеницы на этапах их дифференцировки и гибели. В течение стадии дифференцировки в ядрах клеток неоплодотворённых зародышевых мешков наблюдаются максимально декомпактизованные политенные хромосомы, а в цитоплазме многочисленные вакуоли. Гибель антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы является ярким примером dPCD, т.е. гибели клеток растений в ходе дифференцировки тканей и органов. Сравнение маркеров и признаков ПКГ антиподальных комплексов зародышевых мешков в присутствии нуклеарного эндосперма и без него позволяет предположить, что мы обнаружили два различных пути программируемой гибели антиподальных клеток – протекающих в присутствии индуктора гибели (клеточный эндосперм) и без него.

Обнаруженное увеличение уровня экспрессии генов клеток антиподальных комплексов, обеспечивающих защитные и метаболические функции, предполагает дальнейший поиск и выявление новых генов, уровень экспрессии которых обеспечивается путем соматической полиплоидизации, а именно формирования гигантских политенных хромосом.

Выводы

1. Дифференцировка антиподальных клеток сопровождается полиплоидизацией ядер, увеличением их размера и изменением формы. Выраженность этих изменений зависит от локализации антиподальных клеток в комплексе.
2. Признаками программируемой клеточной гибели антиподальных клеток являются:
 - а) для оплодотворенных зародышевых мешков – разрывы ДНК, сегрегация компонентов ядрышка, экструзия компонентов ядра, объединение хромосомных территорий, выход цитохрома с из митохондрий и перенос органелл из антиподальных клеток в ценоцит эндосперма через цитоплазматические каналы. Это позволяет отнести этот вариант клеточной гибели к апоптоз-подобному.
 - б) для неоплодотворенных зародышевых мешков – разрывы ДНК и фрагментация хромосом. Выхода цитохрома с из митохондрий, объединения хромосомных территорий, сегрегации и экструзии ядрышка не происходит. Это позволяет отнести этот вариант клеточной гибели к некроз-подобному.
3. Уровень экспрессии генов, связанных с метаболическими, антистрессорными и гормональными функциями в антиподальных клетках на средней стадии дифференцировки выше, чем во фракции клеток зародышевого мешка.
4. Предложена периодизация развития антиподальных клеток. Продолжительность жизни антиподальных клеток после двойного оплодотворения составляет до 10 дней, стадия дифференцировки составляет до 4 суток, первые признаки гибели выявляются на 4-5 сутки после опыления.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. **Доронина Т. В.**, Чабан И. А., Лазарева Е. М. Структурно-функциональные особенности клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки // Онтогенез. — 2019. — Т. 50, № 4. — С. 251–267. **IF (РИНЦ) = 1,177 (0,94/0,65)***
2. **Доронина Т. В.**, Шеваль Е. В., Лазарева Е. М. Программируемая клеточная гибель при формировании зародышевого мешка и семени // Онтогенез. — 2020. — Т. 51, № 3. — С. 163–176. **IF (РИНЦ) = 1,177 (0,77/0,54)**
3. **Doronina T. V.**, Lazareva E. M. Structure of antipodal cells nuclei of wheat embryo sac during programmed cell death // Planta. — 2021. — Vol. 254, no. 48. **Q1, IF (WoS) = 4.540. (0,83/0,58)**
4. **Doronina T. V.**, Ashapkin V. V., Lazareva E. M. Wheat antipodal cells with polytene chromosomes in the embryo sac are key to understanding the formation of grain in cereals // Biology. — 2022. — Vol. 11, no. 9. — P. 1340. **Q1, IF (WoS) = 5.168. (1,38/0,96)**

**В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.*