

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Лазарева Елена Михайловна

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
1.1. Актуальность .....	6
1.2. Степень разработанности темы .....	7
1.3. Цели и задачи .....	9
1.4. Объект и предмет исследования.....	9
1.5. Научная новизна .....	9
1.6. Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
1.7. Методология научного исследования.....	10
1.8. Положения, выносимые на защиту .....	11
1.9. Степень достоверности результатов .....	11
1.10. Апробация результатов .....	11
1.11. Публикации по теме работы .....	11
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>12</b>
2.1. Политенные хромосомы.....	12
2.1.1. Общие принципы строения политенных хромосом .....	12
2.1.2. Политенные хромосомы растений.....	20
2.1.3. Политенные хромосомы клеток подвеска .....	23
2.1.4. Политенные хромосомы клеток семядолей.....	24
2.1.5. Политенные хромосомы клеток гаустория.....	24
2.1.6. Политенные хромосомы клеток тапетума .....	25
2.1.7. Политенные хромосомы яйцеклетки и зиготы.....	26
2.1.8. Вариабельность структуры политенных хромосом растений .....	26
2.1.9. Политенные хромосомы антиподальных клеток злаков .....	28
2.2. Особенности строения и формирования зародышевого мешка злаков.....	31
2.2.1. Формирование зародышевого мешка злаков.....	31
2.2.2. Двойное оплодотворение.....	31
2.3. Антиподальные клетки злаков .....	37
2.3.1. Антиподальные клетки кукурузы ( <i>Zea mays</i> L.) .....	43
2.3.2. Антиподальные клетки риса ( <i>Oryza sativa</i> L.).....	46
2.3.3. Антиподальные клетки тритикале ( <i>Triticale</i> ) .....	47
2.3.4. Антиподальные клетки ячменя ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) .....	48
2.3.5. Антиподальные клетки пшеницы ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	51
2.4. Пути программируемой клеточной гибели растительных клеток.....	60
2.4.1. Варианты клеточной гибели животных клеток.....	60
2.4.2. Варианты клеточной гибели растительных клеток .....	60

2.4.3. Ферменты и гормоны – участники этапов ПКГ растений.....	65
2.5. Заключение .....	70
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>71</b>
3.1. Объект исследования, взятие материала и фиксация.....	71
3.1.1. Объект исследования .....	71
3.1.2. Материал для изучения морфологии антиподальных клеток.....	71
3.1.3. Фиксация материала .....	71
3.1.4. Приготовление тотального препарата.....	71
3.1.5. Периодизация развития антиподальных клеток .....	74
3.2. Световая микроскопия: пробоподготовка, получение и анализ изображений .....	74
3.2.1. Окрашивание ДНК ядер DAPI .....	74
3.2.2. Определение количества ДНК ядер антиподальных клеток в программе ImageJ .....	74
3.2.3. Определение площади и округлости ядер антиподальных клеток в программе Image J .....	76
3.2.4. Окрашивание гематоксилином Каррачи.....	76
3.2.5. Выявление разрывов в ДНК по методу TUNEL.....	76
3.2.6. Ag-NOR окрашивание аргентофильных белков ядрышка по методу Howell and Black, 1980.....	77
3.2.7. Окрашивание клеток акридиновым оранжевым .....	77
3.2.8. Приготовление хромосомных препаратов .....	78
3.2.9. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).....	79
3.2.10. Иммуноцитохимическое выявление клеточных органелл.....	79
3.3. Электронная микроскопия .....	80
3.4. Определение уровня экспрессии генов методом RT-ПЦР .....	81
3.5. Обработка изображений.....	81
3.5.1. Обработка изображений световой и электронной микроскопии .....	81
3.5.2. Деконволюция .....	81
3.6. Статистическая обработка данных.....	82
3.7. Схемы.....	82
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>83</b>
4.1. Общая структура комплексов антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели .....	83
4.2. Структура ядер антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели.....	84
4.2.1. Структура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков .....	84

4.2.2. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков.....	91
4.2.3. Структура политенных хромосом антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков .....	97
4.2.4. Ядрышки антиподальных клеток оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешков .....	107
4.2.5. Разрывы ДНК, выявляемые методом TUNEL в ядрах антиподальных клеток оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешков .....	113
4.2.6. Ультраструктура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.....	117
4.3. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки и гибели.....	126
4.3.1. Содержание ДНК ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.....	126
4.3.2. Площадь ДНК ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.....	131
4.3.3. Индивидуализация хромосом ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков .....	135
4.3.4. Округлость ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков .....	137
4.3.5. Характеристики ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков.....	139
4.4. Структура органелл цитоплазмы антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели.....	144
4.4.1. Световая микроскопия органелл цитоплазмы.....	144
4.4.2. Ультраструктура органелл цитоплазмы антиподальных клеток.....	153
4.5. Периодизация развития антиподальных клеток .....	160
4.6. Уровень экспрессии генов .....	161
<b>5. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>165</b>
5.1. Морфология клеток зародышевого мешка пшеницы, количество и продолжительность жизни.....	165
5.2.1. Структура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки и клеточной гибели .....	168
5.2.2. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки и клеточной гибели .....	173
5.3. Структура политенных хромосом антиподальных клеток .....	175
5.4. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки и гибели.....	176
5.5. Структура органелл цитоплазмы антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели.....	177

5.6. Гибель антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы .....	182
5.7. Профиль экспрессии генов в антиподальных клетках зародышевого мешка пшеницы .....	187
5.8. Функциональное значение антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы .....	188
<b>6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>192</b>
<b>7. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>193</b>
<b>8. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ.....</b>	<b>194</b>
8.1. Статьи.....	194
8.2. Тезисы докладов .....	194
<b>9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>197</b>
<b>10. БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>211</b>

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## 1.1. Актуальность

Антиподальные клетки зародышевого мешка располагаются между материнскими тканями семяпочки и развивающимся после двойного оплодотворения эндоспермом. Антиподальные клетки формируются у большинства известных видов цветковых растений. Однако у многих растений антиподальные клетки дегенерируют до или вскоре после оплодотворения. У злаков антиподальные клетки сохраняются долгое время после оплодотворения и формируют многоклеточный комплекс. Уникальные структурные особенности антиподальных клеток обусловлены их трофической и барьерной функциями на различных этапах дифференцировки комплекса, когда происходят все ключевые процессы в их ядрах и цитоплазме.

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 – это интерфазные, активно функционирующие хромосомы, состоящие из множества гомологичных нитей (хроматид). Политенные хромосомы всегда формируются в клетках, синтезирующих многочисленные РНК. В ядрах антиподальных клеток эти гигантские хромосомы транскрибируют РНК, кодирующие белки, обеспечивающие развитие и дифференцировку эндосперма на стадии ценоцита. Политенные хромосомы позволяют антиподальным клеткам реализовать основную функцию - обеспечение развития и защиты формирующегося эндосперма, являющегося основной тканью будущего зерна. Таким образом, антиподальные клетки являются примером функциональной соматической полиплоидизации.

Структура гигантских многонитчатых хромосом растений отличается от классических политенных хромосом у животных. По сравнению с политенными хромосомами животных политенные хромосомы растений изучены очень слабо. Следовательно, изучение структуры политенных хромосом антиподальных клеток имеет большое значение для фундаментальной науки.

Судьба антиподальных клеток четко детерминирована, в процессе целлюляризации эндосперма запускается процесс программируемой клеточной гибели антиподальных клеток. Таким образом, антиподальные клетки – идеальная модель для изучения структурно-функциональных особенностей растительной клетки на этапах онтогенеза, т.к.

цикл их развития занимает всего 10 дней. Финальным этапом онтогенеза является программируемая клеточная гибель, недостаточно охарактеризованная у растений.

Сведения об антиподальных клетках пшеницы в современной литературе фрагментарны и не дают четкого представления о особенностях их структуры в ходе дифференцировки комплекса, и о преобразовании этих клеток в ходе программируемой клеточной гибели.

Чрезвычайно важно понять, как дифференцируются в онтогенезе зародышевого мешка клетки антиподального комплекса с гигантскими хромосомами, какие РНК транскрибируют хромосомы, какие процессы в нуклеарном эндосперме культурных злаков они обеспечивают.

Не менее важно описать характерные изменения основных компартментов антиподальных клеток на различных этапах гибели комплекса, когда они, погибая, полностью резорбируются эндоспермом, обеспечивая правильность его дифференцировки. Приоритетное (перманентное) формирование антиподального комплекса в начале онтогенеза женского гаметофита (Чабан и др., 2011) до двойного оплодотворения свидетельствует о важности и РНК, которые транскрибируются в гигантских полиплоидных ядрах антиподальных клеток. Более того, 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 и пищевыми растениями. Поэтому очень важно знать особенности ранних этапов морфогенеза тканей зерна как фундамент для будущего улучшения показателей урожайности.

## **1.2. Степень разработанности темы**

Несмотря на то, что в клетках 80% цветковых растений выявлены политенные хромосомы (Жимулев, 1992), политенные хромосомы растений изучены слабее, чем политенные хромосомы животных. Показано наличие гигантских политенных хромосом в антиподальных клетках культурных злаков (Ивановская, 1973; Блюденев, Конарев, 1978; Петрова и др., 1985; Батыгина, 1994; Чабан, 2008; Чабан и др., 2011). Аспекты функционирования политенных хромосом, структура отдельных хроматид, их расположение в составе политенной хромосомы, как и трансформация структуры политенных хромосомы в ходе онтогенеза до сих пор не освещены в литературе.

В ряде работ была дана краткая характеристика ультраструктуры антиподальных клеток разных злаков – кукурузы (Diboll and Larson, 1966; Diboll, 1968), риса (Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997), ячменя (Engell, 1994) и пшеницы (Morrison, 1954; Hoshikawa, 1960; You and Jensen, 1985) на стадии их активного функционирования. Было показано, что у злаков антиподальные клетки имеют ядра, увеличивавшиеся в размерах в ходе онтогенеза. В ядрах содержатся одно или несколько крупных ядрышек с вакуолями, ядерная оболочка формирует многочисленные инвагинации. Цитоплазма антиподальных клеток содержит многочисленные органеллы – цистерны ЭПР, диктиосомы, везикулы, пластиды, митохондрии, рибосомы. Однако существующие на данный момент исследования, посвященные антиподальным клеткам зародышевого мешка культурных злаков фрагментарны и не дают четкого представления о структуре этих клеток на разных этапах их онтогенеза.

В работе Чабан и др., охарактеризованы этапы формирования комплекса антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы. Особое внимание было уделено этапу пролиферации трех инициальных антиподальных клеток. Впервые на серии полутонких срезов прослежены последовательные митотические деления антиподальных клеток, приводящие к формированию трех ярусов клеток антиподального комплекса. Впервые подтверждена секреторная роль антиподальных клеток и проиллюстрирована экстрюзия хромосомного материала и материала ядрышка в цитоплазму нуклеарного эндосперма (Чабан и др., 2011). Показано, что программа гибели антиподальных клеток запускается параллельно с формированием клеточных стенок эндосперма. Гибель антиподальных клеток сопровождается конденсацией хроматина, распадом ядрышек и выбросом его компонентов в цитоплазму антиподальных и в эндосперм (Чабан и др., 2011). В ряде работ имеются фрагментарные сведения об особенностях антиподальных клеток пшеницы на этапе их гибели (Zhang et al., 1988; An and You, 2004).

Однако до сих пор, в литературе процесс гибели антиподальных клеток освещены слабее, чем процесс их пролиферации и дифференцировки. Гибель антиподальных клеток является ярким примером клеточной гибели в дифференцировке – dPCD (Daneva et al., 2016), т.к. антиподальные клетки подвергаются гибели после выполнения ими их функции. Клеточная гибель растений изучается менее активно, чем ПКГ (программируемая клеточная гибель) животных. Если классификация ПКГ у животных постоянно пересматривается и уточняется (Galluzzi et al., 2018), то общепринятой классификации ПКГ растений в настоящее время не существует. Единственная наиболее удачная классификация ПКГ растений на основании морфологических признаков была предложена в 2011 году,



когда было предложено выделять два варианта ПКГ у растений – «вакуолярную клеточную гибель» и «программируемый некроз» (Van Doorn et al., 2011).

### **1.3. Цели и задачи**

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

В работе поставлены следующие задачи:

- 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,

### **1.4. Объект и предмет исследования**

Объектом исследования данной диссертационной работы являются антиподальные клетки зародышевого мешка пшеницы на стадии их дифференцировки и программируемой клеточной гибели.

Предметом исследования в диссертации являются структура ядер с политенными хромосомами и органелл цитоплазмы антиподальных клеток на разных стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели, признаки программируемой клеточной гибели антиподальных клеток, оценка уровня экспрессии генов на этапе дифференцировки антиподального комплекса.

### **1.5. Научная новизна**

Впервые детально охарактеризованы структурные особенности компонентов ядра и цитоплазмы антиподальных клеток на этапах дифференцировки и программируемой клеточной гибели.

Впервые выявлена гетерогенность ядер клеток индивидуальных антиподальных комплексов по содержанию ДНК, возникающая в результате асинхронности раундов эндоредупликации. Определена площадь и содержание ДНК ядер базального, среднего и

апикального ярусов комплексов на ранней, средней и поздней стадиях дифференцировки и гибели. Впервые изучался уровень экспрессии генов, характерный для антиподальных клеток пшеницы на стадии дифференцировки.

Принципиально новыми являются данные о распределении и структуре органелл цитоплазмы антиподальных клеток – эндоплазматического ретикулума, диктиосом, митохондрий, микротрубочек и актиновых филаментов на разных этапах дифференцировки антиподальных комплексов и ПКГ.

Подтвержден процесс сегрегации компонентов ядрышка в тела политенных хромосом на стадии программируемой клеточной гибели, впервые охарактеризован состав и распределение компонентов в сегрегатах ядрышка. Подтверждена экструзия компонентов ядрышка и частей хромосом в цитоплазму антиподальных клеток и затем в ценоцит эндосперма. Показано, что экструзия компонентов ядра проходит через разрыв ядерной оболочки.

На стадии программируемой гибели антиподальных клеток впервые в ядрах выявлены разрывы ДНК 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 et al., 2011) и Reape and McCabe (Reape and McCabe, 2013).

## **1.6. Теоретическая и практическая значимость работы**

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.

## **1.7. Методология научного исследования**

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

### **1.8. 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.

### **1.9. Степень достоверности результатов**

Результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью достоверности. Автором работы был проведён 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.

### **1.10. Апробация результатов**

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

### **1.11. Публикации по теме работы**

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. Список публикаций представлен в разделе 8.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Политенные хромосомы

#### 2.1.1. Общие принципы строения политенных хромосом

Политения – вариант полиплоидизации, при котором увеличивается число хроматид в интерфазных хромосомах после последовательных раундов их эндоредупликации и образуются хромосомы, состоящие из пучков объединенных хроматид (Жимулев, 1992). Функциональная полиплоидизация необходима для усиления экспрессии определённых генов. Клетки с политенными хромосомами предназначены для высокого уровня синтеза информационных и рибосомных РНК и выполняют провизорную, секреторную и барьерную функции. Таким образом обеспечивается создание многочисленных рибосом и мРНК, необходимых для выполнения клетками своего предназначения.

Политенные хромосомы впервые были описаны в 1881 Бальбиани, в слюнных железах личинок, мальпигиевых сосудах, кишечнике, подкожной клетчатке и мышцах *Chironomus plumosus*.

Для обозначения таких хромосом исследователи употребляли ряд терминов: политенные, гигантские, многонитчатые, полинемные, эндоредуплицированные и амплифицированные (Кирикович, Левитес, 2013).

Ядра с политенными хромосомами часто встречаются в клетках с интенсивной метаболической активностью. Функцией этих клеток является обеспечение поддержки жизненно важных тканей питательными веществами в течение определенного периода развития (личиночные слюнные железы насекомых, трофобласт млекопитающих, клетки подвеска покрытосеменных). Политения возникает в тканях, органах и на стадиях развития, когда существует необходимость в быстром развитии органа при неизменном высоком уровне функционирования (Zhimulev and Koryakov, 2009). Иногда клетки с политенными хромосомами формируются в тканях, располагающихся между материнским организмом и тканями, сформированными после оплодотворения (трофобласт млекопитающих, суспензорные и антиподальные клетки растений) (Carvalho, 2000).

Для всех клеток с политенными хромосомами характерны четыре признака: выпадение митоза из клеточного цикла (клеточный цикл представлен только G и S фазами), отсутствие расхождения сестринских хроматид после репликации (новые копии ДНК остаются конъюгированными друг с другом, степень конъюгации может различаться в зависимости от объекта), образовавшиеся политенные хромосомы не способны участвовать в митозе, ядерная мембрана и ядрышко остаются интактными во время последовательных циклов репликации ДНК (Zhimulev and Koryakov, 2009).

Сестринские хроматиды удерживаются благодаря нескольким факторам (рис.1), в том числе топологической запутанности, вызванной сворачиванием ДНК, частичной недорепликации (встречается не всегда), соматической конъюгации хроматид и когезивным взаимодействиям (Stormo and Fox, 2017).

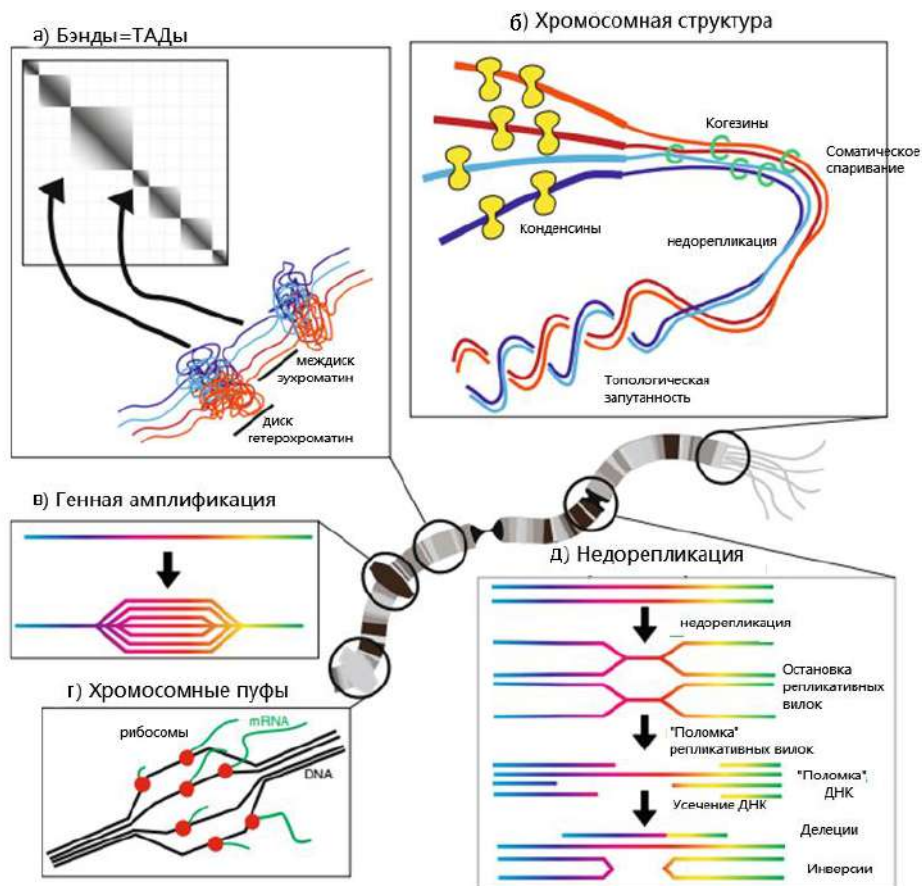


Рис.1. Особенности организации политенных хромосом животных (Stormo and Fox, 2017). а - диски политенных хромосом соответствуют топологически ассоциированным доменам (ТАД), б - сестринские хроматиды удерживаются вместе за счет целого ряда факторов, за счет топологической запутанности, вызванной намоткой ДНК, недостаточной репликации, соматической конъюгации и когезиновых комплексов, которые удерживают нити хроматид вместе. Для разделения политенных хромосом на отдельные нити требуются конденсины. в – амплификация генов происходит, если необходимо значительно увеличить количество копий гена. г – в местах синтеза РНК формируются пuffs, д - недостаточная репликация присутствует в политенных хромосомах инфузорий, млекопитающих, растений и насекомых, что может приводить к остановке вилок репликации и перестройкам ДНК.

В пределах одной политенной хромосомы может происходить как амплификация отдельных генов (рис. 1, в), так и недорепликация (рис. 1, д) отдельных участков хромосомы (Stormo and Fox, 2017).

В политенных хромосомах возможно образование пuffs (рис.1, г) - транскрипционно активных единиц, образующихся в результате активации генов и

выплетливания всех декомпактизованных хроматид политенной хромосомы. Это позволяет быстро увеличить количество определенных транскриптов, которые необходимы клетке и организму (Stormo and Fox, 2017).

Судьба клеток с политенными хромосомами четко детерминирована, это терминально дифференцированные клетки, так как у них существует запрет на вхождение в митоз. После  $G_1$  фазы, и S-фазы, в которой осуществляется репликация ДНК, клетка пропускает  $G_2$  и М-фазы и снова возвращается в  $G_1$ . Было показано, что наступление раундов эндоредупликации контролируется циклинами и циклин-зависимыми киназами, а также белками-регуляторами клеточного цикла (Kip, Cip, Rb, E2F) (Kim et al., 2021). Циклин E и связанная с ним киназа Cdk2 необходимы для репликации ДНК у дрозофилы как во время обычного клеточного цикла, так и вовремя эндоредупликации, при этом митотические циклины в клетках, подвергающихся эндоредупликации, отсутствуют (Lilly and Duronio, 2005).

Структура политенных хромосом зависит от степени конъюгации гомологичных хроматид. Выделяется три основных типа структуры ядер с политенными хромосомами (рис.2, 3):

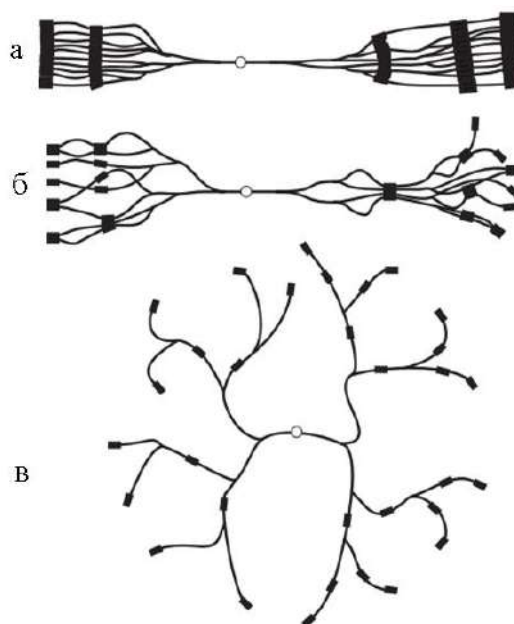


Рис.2. Расположение хроматид в политенных хромосомах классического типа (а), при скрытой политении (б) и в «помпоно»-подобных хромосомах (в). Индивидуальные хроматиды с хромомерами, обозначенными черными прямоугольниками, плотно контактируют друг с другом, при этом хромомеры формируют диски (а). Хроматиды контактируют друг с другом только в некоторых участках, формируя структуры наподобие метлы (б). Конъюгация хроматид нарушена полностью, формируется «помпон» (в). Кружком помечен центральный район. (Zhimulev, 1997)

1) классический тип - образуется при конъюгации гомологичных хроматид по всей длине политенной хромосомы. Данный тип выявлен у *Drosophila melanogaster*, *Chironomus tentans* и некоторых других двукрылых (рис.2, а; рис.3, а).

2) неклассический тип (скрытая политения) - образуется при минимальной конъюгации гомологичных хроматид. Скрытая политения, характерна для растений, ядер клеток трофобласта, железистых клеток шелкопряда, макронуклеусов инфузорий (рис.2, б; рис.3, б, в).

3) помпоно-подобный тип расположения хромосом - образуется при сильном нарушении конъюгации хроматид, рисунок дисков утрачивается. Такой тип хромосом характерен для клеток ногохвосток и X-хромосомы дрозофилы и образуется в результате мутаций (рис.2, в). В некоторых источниках именно третий тип называется «скрытой политенией» (Бродский, Урываева, 1981; Zhimulev, 1997).

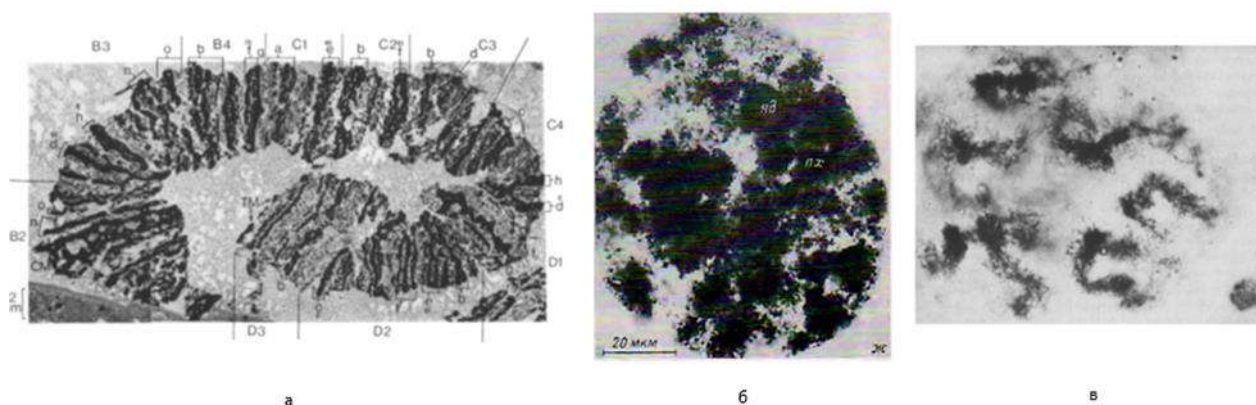


Рис.3. Морфология ядер с политенными хромосомами.  
 а - политенная хромосома ядра клетки слюнных желез *Chironomus thummi* (Kiknadze et al, 1976);  
 б - политенные хромосомы трофобласта крысы (Зыбина, 1986);  
 в - политенные хромосомы в ядре клетки антиподального комплекса мака (Hasitschka, 1956).

В случае скрытой политении (когда у хромосом не выявляется характерной исчерченности, как у классических политенных хромосом двукрылых) доказать, что речь идет именно о политении можно по следующим признакам:

- 1) число хромоцентров совпадает в диплоидных клетках и в изучаемых клетках (количество хромосом не изменяется, изменяется число нитей в хромосоме).
- 2) содержание ДНК в тельце Барра увеличивается пропорционально увеличению количества суммарной ДНК изучаемых клеток
- 3) количество ядрышек меньше, чем можно было бы ожидать при полиплоидии, однако их размер очень большой. Гигантские ядрышки характерны именно для клеток с политенными хромосомами (Бродский, Урываева, 1981).

При изучении политенных хромосом возникает вопрос о том, как связан характерный рисунок положения дисков и междисков политенных хромосом с их функциональной активностью (рис. 4). Бремманн в 1952 году предположил, что существует соответствие между величиной дисков и количеством генов. Это привело к концепции, что неоднородность распределения полос отражает функционально разные домены хроматина. Также он обнаружил, что пуфирование участка хромосомы является результатом интенсивной транскрипции. На основе этих данных в последствии было высказано предположение, что гены объединены в функциональные группы. Была показана транскрипционная активность до 70% всех районов хромосом *Drosophila melanogaster* (Ананьев, Барский, 1978). Выяснилось, что в основном транскрипционная активность наблюдалась в участках междисков (Fujita and Takamoto 1963; Jamrich et al., 1977; Semeshin et al., 1979;). Затем была выдвинута гипотеза, что характерный рисунок политенных хромосом отражает локальную транскрипционную активность, а не распределение генного материала (Жимулев и др., 1981; Hill et al., 1987).

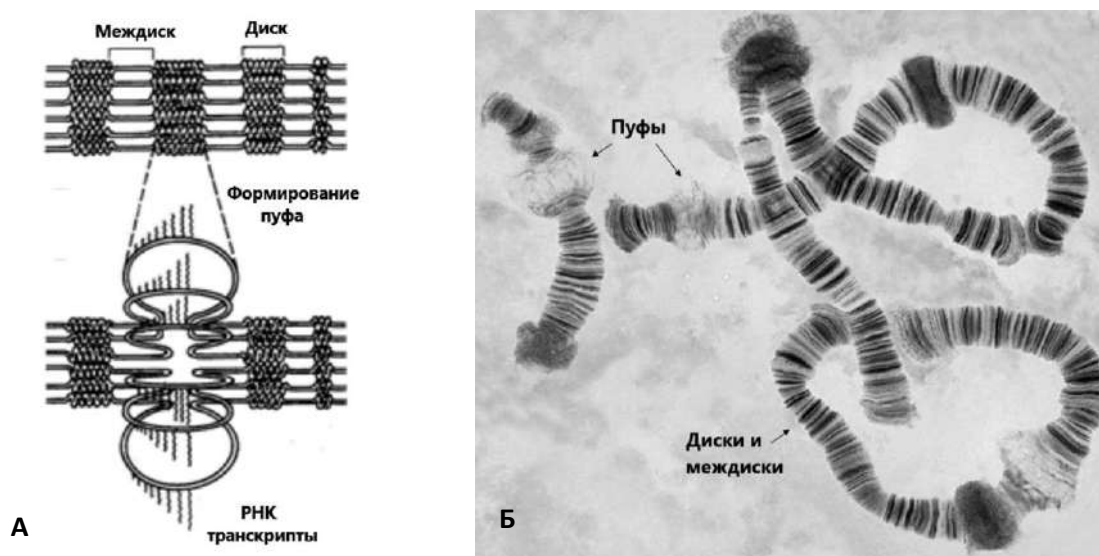


Рис.4. А - Модель структуры политенных хромосом. (Ярыгин, 2018). Б - Политенные хромосомы *Chironomus sp.* (Жимулев, 1994).

Данные свидетельствуют о том, что генов гораздо больше, чем дисков и каждый диск в среднем должен содержать несколько генов. По-видимому, диски служат информационными единицами хромосом и могут рассматриваться и как места расположения основной массы генов и как единицы транскрипции и репликации (Кикнадзе, 1972).

На примере клеток с политенными хромосомами из слюнных желез дрозофилы было показано, что структура дисков может изменяться при резкой перестройке метаболизма



клетки. При этом диски, сливаясь, формируют блоки конденсированного хроматина, в результате хромосомы укорачиваются в два-три раза, что сопровождается инактивацией синтеза РНК. Ряд химических агентов может приводить к увеличению размеров междисковых пространств в областях крупных дисков, разворачиванию хромосом в ленты-меандры; что в итоге ведет к дезорганизации структуры и функционирования интерфазных хромосом, поэтому длина хромосомы и показатели ее компактности используются при оценке функциональной активности политенных хромосом (Полуконова, 2015).

Показано, что именно междиски являются транскрипционно активными районами политенных хромосом, ответственными за функции основного метаболизма клеток (содержат работающие гены «домашнего хозяйства»). Места наиболее активного синтеза РНК – пuffed, могут быть удобным инструментом для изучения индукции и протекания процесса транскрипции (Ronson et al., 2013; Полуконова, 2015).

Для описания свойств дисков и междисков группой исследователей были предложены модели четырех типов хроматина (им были присвоены названия «aquamarine», «lazarite», «malachite» и «ruby»). Декомпактизованный хроматин – «aquamarine» и 5'-концы активных генов соответствуют междискам на молекулярной карте генома. Промежуточные по степени компактизации «lazarite» и «malachite» хроматин и кодирующие части генов содержатся в области серых дисков. «Ruby» хроматин локализуется в области черных плотных транскрипционно неактивных дисков (Sidorenko et al., 2019).

Исследование соответствия структурной и функциональной организации генома дрозофилы получили новую перспективу за счет накопления данных о трехмерной организации хроматина. Последние исследования трехмерной организации генома показали, что геном разделен на топологически ассоциированные домены (ТАД, TAD – topology associated domains), которые разграничивают функциональные эпигенетические домены. ТАДы представляют собой участки ДНК, которые взаимодействуют друг с другом значительно чаще, чем с другими районами хромосом. Вопрос о том, являются ли ТАДы истинными физическими единицами или статистической характеристикой взаимодействий генов остается открытым. Было показано, что ТАДы являются единицами транскрипции (экспрессия генов внутри одного ТАДа происходит согласовано) и репликации (весь ТАД реплицируется в одно время; не может быть так, что одна часть ТАДа реплицировалась в одно время, а другая – в другое). Кроме того, ТАД, по-видимому, обычно целиком принадлежит либо эухроматину, либо гетерохроматину. Аналогично, ТАДы либо целиком ассоциированы с ламиной (находятся в непосредственной близости от нее), либо не ассоциированы с ней (Szabo et al. 2018).

Было показано, что диски политенных хромосом у *Drosophila* оказались топологически ассоциированными доменами, аналогичным ТАДам, присутствующим в диплоидных клетках (рис. 1, а; рис. 5, а-ж). Это указывает на то, что структурная организация политенных хромосом и хромосом нормальных диплоидных клеток имеет общие фундаментальные черты (Stormo and Fox, 2017).

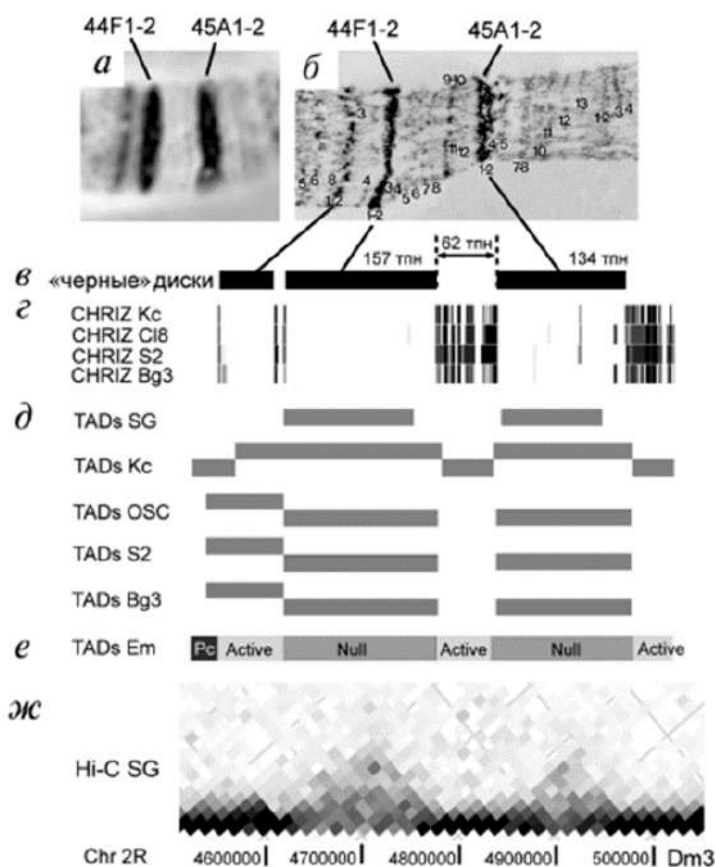


Рис.5. Доказательство соответствия черных, наиболее плотных дисков политенных хромосом *Drosophila* топологически ассоциированным доменам (ТАД-ам) в разных типах клеток на примере дисков 44F1 2 и 45A1 2. (Kolesnikova, 2018).

а - Морфология фрагмента ДНК хромосомы 2R, соответствующего ~500 т.п.н. и включающего два крупных компактных диска (окраска ацето-орсеином, фазовый контраст); б – Ультраструктура (ТЭМ) соответствующего фрагмента политенной хромосомы 2R; в – локализация черных компактных дисков ПХ на геномной карте хромосомы 2R, координаты дисков предсказаны в соответствии с алгоритмом; г – локализация на геномной карте сайтов обогащения белком CHRIZ; д – локализация на геномной карте ТАДов, выявленных методом Hi C в клетках слюнных желез и в четырех культурах клеток (Kc, OSC, S2, Bg3); е – ТАДы, характеризующиеся метками активного хроматина (Active), Polycomb/HD3K27me3 хроматина (Pc) и лишены меток активного хроматина (Null), выделенные при Hi C анализе эмбрионов (по 30); ж – фрагмент тепловой карты пространственных взаимодействий, построенной по данным Hi C для ПХ слюнных желез дрозофилы.

Изучение последовательности времени репликации в политенных хромосомах, показало, что общие закономерности порядка репликации в клетках с политенными хромосомами такие же, как в соматических. Было показано, что ранняя репликация

приурочена к районам с высоким уровнем транскрипции, высокой плотностью генов и присутствием множественных сайтов потенциальной инициации репликации. Отличительной особенностью репликации в политенных хромосомах являются низкая скорость продвижения репликационных вилок и зависимость продолжительности S-фазы от множества факторов. Так, в политенных хромосомах *D. melanogaster* было продемонстрировано, что скорость движения репликационных вилок зависит от присутствия в хроматине белков SUUR и Rif1 (Kolesnikova et al., 2019).

Было показано, что негистоновые регуляторные белки ADF1 (специфический транскрипционный фактор) и BEAF-32 (инсуляторный белок, ассоциированный с междисками) участвуют в позиционировании нуклеосом и формировании междиска 61C7/C8. При мутации сайтов связывания ADF1 или BEAF-32 нарушается способность формировать междиск, нуклеосомная организация нарушается (Schwartz et al., 2019).

Физические и биологические факторы среды влияют на структуру и функциональную активность политенных хромосом (Полуконова, 2015).

При низких температурах зимой и ранней весной у личинок *Chironomidae* наблюдалась эктопическая конъюгация политенных хромосом. Происходило объединение центромерных районов хромосом с образованием хромоцентра, или объединение теломерных районов хромосом. Было выявлено резкое уменьшение числа и размеров пухов, размеров колец Бальбиани, уменьшение числа дисков у *Camptochironomus tentans* и *Chironomus plumosus*, находящихся в состоянии диапаузы. При искусственном воздействии на личинок *Chironomidae* низкими температурами выявлено ингибирование пухов, характерных для данной конкретной стадии развития личинок. Свою активность сохраняли пухы, характерные для всего цикла развития. В результате влияния повышенных температур на политенные хромосомы личинок *Chironomidae* наблюдалась компактизация хромосом, слияние дисков, укорочение длины и потеря структурированности политенных хромосом. Воздействие высоких температур приводило к необратимым последствиям, в ходе чего междиски увеличивались, политенные хромосомы раскручивались, индуцировалась экспрессия генов белков теплового шока. Увеличение глубины обитания личинок в водоеме вызывает укорочение и высокую степень конденсации политенных хромосом у личинок *Chironomidae*, что приводит к приостановке развития и изменениям метаболизма. Радиоактивное излучение оказывает сильное повреждающее действие на молекулы ДНК, вызывая изменение политенных хромосом, выявляется увеличение пloidности и микроинверсий хромосом, конденсация и укорочение хромосом, активация генов белков теплового шока локализованных в прителомерных участках. Увеличение солёности водоема приводит к вакуолизации и увеличению размера пухов и к потере

дискоидального строения политенных хромосом личинок *Chironomidae*. Также было показано изменение функциональной активности и структуры политенных хромосом личинок *Chironomidae* под действием природных антибиотиков, ксенобиотиков и других химических факторов (Полуконова, 2015).

### 2.1.2. Политенные хромосомы растений

В клетках более 80% цветковых растений выявляют политенные хромосомы. Особенно часто они встречаются в клетках зародышевого мешка (Жимулев, 1992).

Политенные хромосомы растений впервые наблюдал Остервальдер в 1898 году в ядрах антиподальных клеток *Aconitum* (Osterwalder, 1898). Позднее политенные хромосомы выявлены в антиподальных клетках семейств *Ranunculaceae* и *Papaveraceae* (Hasitschka-Jenschke, 1959; Tschermak-Woess, 1956), *Hordeum vulgare* (Odenbach, 1965), *Triticum durum* (Ивановская, 1973) и *Aconitum neomontanum* (Yashimsky, 1937). Политенные хромосомы обнаружены также в ядрах синергид *Allium* (Hakansson, 1957), ядрах эндосперма *Allium nutans* (Hakansson, 1957), *Bryonia dioica* (Hasitschka-Jenschke, 1961), *Zea mays* (Tschermak-Woess, Enzenberg-Kunz, 1965), *Hordeum vulgare* (Ivanovskaya, 1968), и подвеска *Phaseolus coccineus* и *Phaseolus vulgaris* (Nagl, 1974), (таблица 1).

Таблица 1. Растения, у которых выявлены политенные хромосомы в антиподальных клетках (по Жимулеву, 1992, с дополнениями).

Растение	Источник
<b>Лук (сем. Амариллисовые)</b> <i>Allium amtophilium</i>	Hasitschka-Jenschke, 1957, 1958
<b>Кливия (сем. Амариллисовые)</b> <i>Clivia minia</i>	Tschermak-Woess, 1957 Nagl, 1981
<b>Ноголист (сем. Барбарисовые)</b> <i>Podophyllum peltatum</i>	Yashimsky, 1937
<b>Коленница (сем. Злаки)</b> <i>Aegilops bicornis</i> <i>Aegilops cylindrical</i> <i>Aegilops longitissima</i> <i>Aegilops ovata</i> <i>Aegilops sharonensis</i> <i>Aegilops speltoides</i>	Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)

<i>Aegilops tauschii</i> <i>Aegilops ventricosa</i>	
<b>Пшеница (сем. Злаки)</b> <i>Triticum aestivum</i>	Bennet et al., 1973 Bennet et al., 1975 Ивановская, 1973
<b>Пшеница (сем. Злаки)</b> <i>Triticum araraticum</i> <i>Triticum boeoticum</i> <i>Triticum dicoides</i> <i>Triticum dicoccum</i> <i>Triticum var farum</i>	Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)
<b>Пшеница (сем. Злаки)</b> <i>Triticum durum</i>	Ивановская, Прокофьева, 1963, 1970 Ивановская, 1968, 1973
<b>Пшеница (сем. Злаки)</b> <i>Triticum monococcum</i>	Ивановская, 1968 Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)
<b>Пшеница (сем. Злаки)</b> <i>Triticum urarty</i>	Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)
<b>Рожь (сем. Злаки)</b> <i>Secale cereale</i>	Петрова, 1978
<b>Рожь (сем. Злаки)</b> <i>Secale segetale</i>	Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)
<b>Тимофеевка (сем. Злаки)</b> <i>Phleum boeheimeri</i>	Joachimiak, 1981
<b>Тритикале (сем. Злаки)</b> <i>Triticale</i>	Петрова, 1978
<b>Ячмень (сем. Злаки)</b> <i>Hordeum liporinum</i> <i>Hordeum spontaneus</i>	Т.Ф. Петрова, 1989, личн. сообщ. (Жимулев, 1992)
<b>Ячмень (сем. Злаки)</b> <i>Hordeum vulgare</i>	Odenbach, 1965 Cass, Jensen, 1970

	Bennet et al., 1975 Петрова, 1978, 1985 Пушкина и др., 1989
<b>Аконит (сем. Лютиковые)</b> <i>Aconitum neomontanum</i> <i>Aconitum ranunculifolium</i> <i>Aconitum variegatum</i> <i>Aconitum vulparia</i>	Osterwalder, 1898 Huss, 1906 Yashimsky, 1937 Tschermak-Woess, 1956
<b>Весенник (сем. Лютиковые)</b> <i>Eranthis hiemalis</i>	Hasitschka-Jenschke, 1959
<b>Лютик (сем. Лютиковые)</b> <i>Ranunculus baudotii</i>	Turala-Szybovska, Wedzony, 1981 Wedzony, 1982
<b>Дицентра великолепная (сем. Маковые)</b> <i>Dicentra spectabilis</i>	Hasitschka-Jenschke, 1959
<b>Гипекоум (сем. Маковые)</b> <i>Hypocoum procumbent</i>	Huss, 1906
<b>Мак (сем. Маковые)</b> <i>Papaver rhoeas</i> <i>Papaver heldreichii</i>	Huss, 1906 Hasitschka-Jenschke, 1959
<b>Хохлатка (сем. Маковые)</b> <i>Corydalis cava</i> <i>Corydalis nobilis</i>	Hasitschka-Jenschke, 1959
<b>Пролеска (сем. Спаржевые)</b> <i>Scilla bifolia</i>	Nagl, 1976
<b>Эхиноцистис (сем. Тыквенные)</b> <i>Echinocystis lobate</i>	Turała, 1966

### 2.1.3. Политенные хромосомы клеток подвеска

Показано, что метафазные хромосомы диплоидных клеток фасоли могут иметь длину от 1,3 до 2,7 мкм, тогда как политенные хромосомы подвеска примерно в 30 раз длиннее (Nagl, 1962) (рис. 6 а, б). Подробно изучались политенные хромосомы клеток подвеска фасоли (*Phaseolus coccineus* и *Phaseolus vulgaris*) (Nagl, 1974). У подвеска, состоящего из 200 клеток, можно выделить три зоны – базальную, среднюю и область контакта с зародышем. Наибольшей политенизации подвергаются ядра 20 клеток базального слоя (их плоидность может достигать 8192С). Считается, что клетки подвеска выполняют секреторную функцию, обеспечивая питательными веществами формирующийся зародыш (Nagl, 1974). В ядрах клеток подвеска наблюдается постепенное увеличение степени эндополиплоидизации - от ядер клеток, примыкающих к зародышу, к базальным клеткам подвеска, политенные хромосомы гигантских ядер которых, по мнению авторов, имеют выраженные гетерохроматические полосы. В ядрах *Phaseolus vulgaris* помимо основных ядрышек выявили микроядрышки, которые исчезали при воздействии актиномицина D (Nagl, 1974). В работах Nagl, проведенных на суспензоре фасоли, были выявлены основные черты организации политенных хромосом растений, которые имеют ряд особенностей. В растительных политенных хромосомах не наблюдается четкой картины дисков из-за отсутствия конъюгации сестринских хроматид. Отсутствие четких полос может быть объяснено слабой связью деконденсированных хроматид во время эндоредупликации в конце S- периода (Nagl, 1972, 1976, 1977, 1978). Пуфы выражены слабо (Nagl, 1974).



Рис. 6. Политенные хромосомы подвеска *Phaseolus* sp.

а - Выделенные политенные хромосомы подвеска *Phaseolus coccineus*, С-бэндинг (Carvalho, 2000);

б - Политенные хромосомы подвеска *Phaseolus vulgaris* в сравнении с профазными ядрами корневого чехлика (Nagl, 1974)

Показано, что конъюгация сестринских хроматид в политенных хромосомах растений есть только в центромерах (Carvalho, 2000; Жимулев, 1992). В клетках подвеска *Phaseolus* иногда встречается конъюгация в теломерных участках хромосом (Nagl, 1991).

Предполагается, что политенные хромосомы растений могут иметь циклы диффузного и конденсированного состояния. В диффузном состоянии видны только эндохромоцентры, а иногда и диффузный хроматин. В конденсированном состоянии связанные сестринские хроматиды приобретают характерный рисунок политенных хромосом. Они имеют конденсированную область (центромеру) и терминальные деконденсированные области (теломеры). Аналогичный цикл «свертывания» наблюдался в клетках подвеска эмбриона *Psophocarpus tetragonolobus*. Переход от диффузного к конденсированному состоянию, по-видимому, зависит от уровня эндоредупликации и факторов окружающей среды.

#### **2.1.4. Политенные хромосомы клеток семядолей**

В семядолях некоторых видов растений, таких как горох *Pisum sativum*, были обнаружены гигантские хромосомы. После начального деления клеток, рост семядолей происходит за счет увеличения клеток, что в свою очередь ведет к увеличению количества молекул ДНК на клетку. Клетки семядолей многих бобовых культур имеют высокое содержание ДНК - до 240С у видов *Vicia* и до 100С у *Pisum sativum* (Smith, 1973, Scharve and Van Parijs, 1973, Millerd and Svencer, 1974, Davis and Brewster, 1975; Davies, Cullis, 1982). Такое количество ДНК в ядрах клеток семядолей позволяет за короткий период синтезировать и запасти белки и крахмал (Marks and Davies, 1979).

#### **2.1.5. Политенные хромосомы клеток гаустории**

В эндосперме также встречаются клетки с политенными хромосомами. Основная функция эндосперма – накопить и передать питательные вещества зародышу во время его развития (Raghavan, 1986). У многих покрытосеменных в эндосперме развиваются высокоспециализированные гаустории, которые проникают в материнские ткани. Ядра клеток гаусторий могут подвергаться эндоредупликации (Johri et al., 1992). Степень ploидности клеток может достигать 768С. Ядра с высоким (192С – 384С и до 768С) уровнем ploидности обнаружили в зрелых клетках гаустории (у 100 - 500 клеточного эндосперма). С увеличением ploидности в ядрах гаустории выявлялись политенные хромосомы. Ритмичное увеличение содержания ДНК, изменение размера ядер и структуры хроматина указывают на эндоредупликацию, как на механизм полиploидизации клеток гаустории (Calvaheira, 2000). Высокая степень ploидности во время дифференцировки гаусторий эндосперма, 1536 n, была описан у *Plantago atrata* (Czapska-Dziewanowska, 1965).



### 2.1.6. Политенные хромосомы клеток тапетума

Формирование политенных хромосом в клетках тапетума пыльника описаны у фасоли *Phaseolus acutifolius* (рис. 7, а) и вики *Vigna unguiculata* (L.) Walp (рис.7, б). Циклы эндоредупликации могут привести к образованию двух разных типов ядер: полиплоидных ядер или ядер с политенными хромосомами (Carvalho and Guerra, 2000).

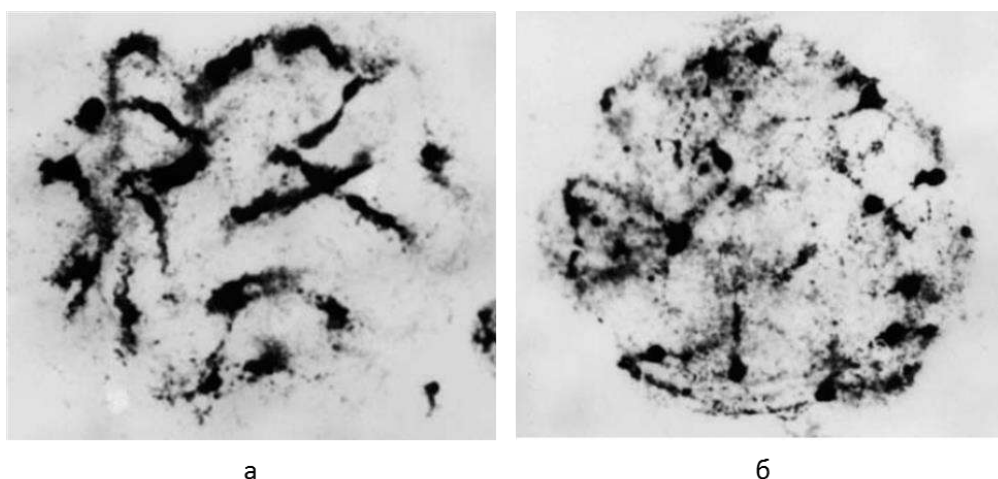


Рис.7. Политенные хромосомы тапетума вики *Vigna unguiculata* (а) и фасоли *Phaseolus acutifolius* (б). Окраска ацетоорсеином (Carvalho, 2000).

Во время мейоза геном клеток тапетума подвергается раундам эндоредупликации до момента образования стадии тетрад у пыльцы, когда происходит дегенерация ткани тапетума (Carniel,1963, D'Amato, 1984; Pritchard and Hutton,1972). Однако замечено, что именно на этой последней стадии ядра тапетума вида *Phaseolus* и *Vigna* достигали наивысшего уровня развития, хотя количество ядер уменьшалось.

Была предложена классификация ядер с политенными хромосомами клеток тапетума (Carvalho and Guerra, 1998). Первый тип – ядра с индивидуальными хромосомами, в которых нити хроматина сконденсированы в проксимальной части и расплетены в дистальной части. Второй – ядра, где хромоцентры ассоциированы с пучками хроматина. Третий – ядра, где хромоцентры не связаны с пучками хроматина.

В ядрах тапетума *Vigna unguiculata* выявляются хромоцентры, не ассоциированные с хроматиновыми фибриллами, политенизация наблюдается не во всех клетках (Kumar, Verna, 2011).

Была проанализирована организация хроматина в ядрах клеток тапетума разных видов рода *Phaseolus*. В результате эндоредупликации в ядрах тапетума могут формироваться большие эндохромоцентры и разной степени конденсированности участки хроматид (визуализуются как политенные хромосомы). Наиболее выражены политенные хромосомы у *P. coccineus* и *P. vulgaris*, у *P. acutifolius*, *P. lunatus*, *P. microcarpus* and *P.*

*peduncularis*, и эндохромоцентры, ассоциированные с политенными хромосомами. Показано изменение морфологии политенных хромосом, от более диффузного состояния к более конденсированному, что может отражать наличие циклов конденсации. Наблюдается увеличение размера хромоцентров без изменения их количества. Выявлены политенные хромосомы разной толщины.

### 2.1.7. Политенные хромосомы яйцеклетки и зиготы

Показано, что ядра яйцеклетки и зиготы растений *Ornithogalum caudatum*, *Haemanthus albiflos* (Morozova, 2002) и *Allium tuberosum* (Kojima and Nagato, 1992) также могут подвергаться политенизации. Обсуждается роль политении в полиморфизме полученных без участия пыльцевого родителя агамоспермных потомствах (Левитес и др., 2015).

Политения может быть индуцирована в условиях *in vitro*. Так, в клетках меристемы корней *Triticum aestivum* формируются политенные хромосомы в ответ на действие высокой температуры (Shang and Wang, 1991) или в корешках *Pisum sativum* при введении регуляторов роста – ауксинов и цитокининов (Marks and Davies, 1979; Therman and Murashige, 1984).

### 2.1.8. Вариабельность структуры политенных хромосом растений

Число клеток с политенными хромосомами и внешний вид политенных хромосом может варьировать в пределах одной ткани. Интерфазные ядра антиподальных клеток у *Papaver rhoeas* отличаются по организации хроматина. В части ядер присутствуют политенные хромосомы, в других ядрах короткие спирали фибрилл, некоторые ядра имеют фибриллярную структуру или хромоцентрическую организацию (рис.8) (Hasitschka, 1956).

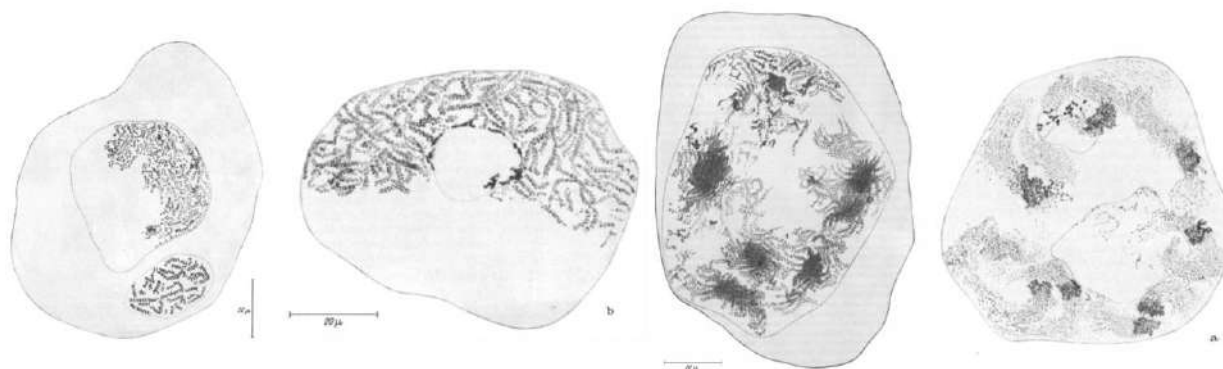


Рис.8. Политенные хромосомы в клетках антиподального комплекса зародышевого мешка мака (Hasitschka, 1956)

По классификации, предложенной Hasitschka, в ядре антипод мака выделяется пять основных морфотипов расположения политенных хромосом (рис.9) (Hasitschka-Jenschke, 1959). Под номером I представлено ядро в начале эндополиплоидизации, под номером III – ядро, с хромосомами, конъюгированными в области центромеры. Автор предполагает, что из состояния III возможен переход в три оставшихся состояния: в номер II, когда в ядрах конъюгация хроматид сохраняется только в хромоцентрах, в номер IV, когда в ядрах наблюдается распад политенных хромосом на отдельные хроматиды, в номер V – в ядрах которых сохраняется конъюгация конденсированных хроматид (Hasitschka-Jenschke, 1959).

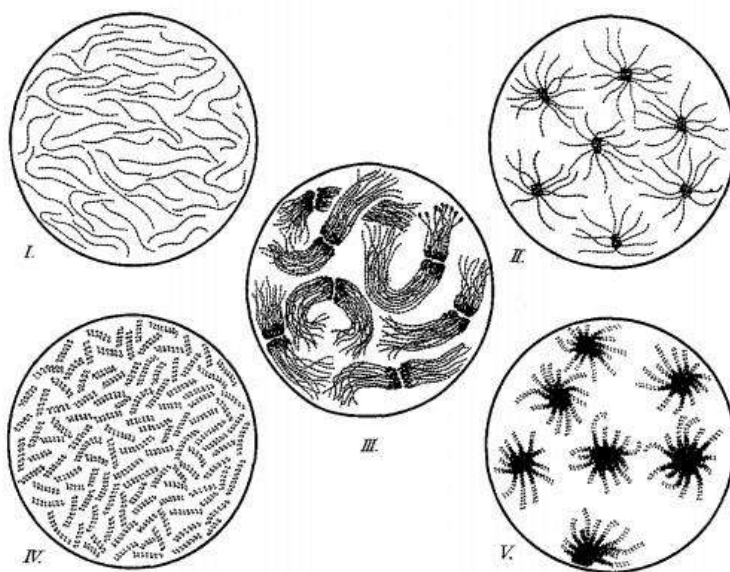


Рис.9. Варианты структуры ядер антипод мака *Papaver rhoeas*. I – фибриллярное ядро; II, V – хромоцентрические ядра; III – политенные хромосомы; IV – спиральные фибриллы хроматина (Hasitschka, 1959).

Процессы репликации ДНК в ядрах подвеска растений сходны с синтезом ДНК в слюнных железах двукрылых. Впервые было показано, что в ядрах с политенными хромосомами подвеска *Phaseolus* некоторые области политенных хромосом могут быть амплифицированы, в то время как другие области могут быть реплицированы недостаточно (Avanzi, 1970). Недорепликация хроматина была показана и у политенных хромосом в клетках подвеска настурции. При изучении репликации ДНК в эндомитотическом клеточном цикле клеток суспензора *Phaseolus* с помощью метода автордиографии, было показано, что гетерохроматин реплицируется в клетке в последнюю очередь. Это соответствует особенностям процесса эндоредупликации политенных хромосом животных (Calvalheira, 2000).

При воздействии факторов среды структура политенных хромосом растений может меняться. При низких температурах (12° С днем, 8° С ночью) гигантские хромосомы конденсируются, при этом проявляются диски и междиски (Nagl, 1969, 1970). Аналогичная

конденсация наблюдается после обработки политенных хромосом клеток подвеска актиномицином D и после обработки изолированных клеток *in vitro* ионами  $Ca^{2+}$  (Nagl, 1969; 1974). Структурные модификации политенных хромосом зарегистрированы в эухроматических, гетерохроматических и ядрышкоорганизующих районах.

### 2.1.9. Политенные хромосомы антиподальных клеток злаков

Короткая характеристика строения ядер с политенными хромосомами антиподальных клеток пшеницы была дана в работе Bennett. Автор выделил два типа эндополиплоидных ядер антиподальных клеток пшеницы - «resting type» (покоящийся тип) и «prophase-like» (профазоподобный тип). В ядрах покоящегося типа не выявляли определённых типов организации хромосом, а в ядрах с высокой степенью политенизации, профазоподобные хромосомы были объединены между собой как в букете (синапсис). В таких ядрах можно было видеть 21 глыбку плотноупакованного хроматина, каждая из которых соответствовала области центромер (Bennett et al., 1973).

Была дана характеристика политенных хромосом антиподальных клеток пшеницы *Triticum aestivum* (Ивановская, 1973; Блюденев, Конарев, 1978) и *Triticum durum* (Ивановская, 1973). В работе Ивановской описаны три варианта укладки хромосом в политенные хромосомы ядер антиподальных клеток. Первый тип - петли, отходящие от прицентромерных участков политенных хромосом в сторону оболочки ядра. На большинстве нитей, образующих петли, были различимы спирализованные хромомеры. Второй тип – параллельно расположенные хромосомы, лишённые петель. Хромосомы в таких участках не спирализованы и, по мнению авторов, соответствуют эухроматину. Третий тип – разобщенные хромосомы на концах хромосом. Предполагается, что прицентромерный гетерохроматин способен к частичной декомпактизации и образованию крупных петель (первый вариант укладки), а в теломерных районах наблюдается полное расхождение хромосом с образованием веерообразных структур (третий тип укладки) (Ивановская, 1973). Основной структурной единицей ядра антиподальных клеток была хромосома 0,2-0,3 мкм, при этом толщина хромосомы соответствовала толщине хромосомы в ядре эндосперма в G<sub>2</sub> периоде (Блюденев, Конарев, 1978).

Было охарактеризовано строение политенных хромосом в ядрах антиподальных клеток ячменя *Hordeum vulgare* (Петрова и др., 1985; Пушкина, 1989; Хрусталева и др., 2010).

Хромосомы антиподальных клеток ячменя состояли из хромосом толщиной 0,3 – 0,6 мкм, анастомозирующих друг с другом (рис.10). Для сравнения - средний диаметр

хромонемы в эндосперме – 0,3 мкм. Расстояние между петлями хромонемы составляло 0,5 мкм. Между петлями хроматина выявлялись лакуны шириной 1-3 мкм (Петрова и др., 1985).

В работе Пушкиной и соавторов было описано строение политенных хромосом антиподальных ядер ячменя в период их активного функционирования. Было показано, что размер политенных хромосом увеличивался с возрастом зародышевого мешка. Самые крупные политенные хромосомы имели длину 30-45 мкм. Отдельные политенные



Рис. 10. Ультраструктура части политенной хромосомы и ядрышка ядра антиподальной клетки зародышевого мешка ячменя (Петрова и др., 1985)

хромосомы были связаны между собой тонкими нитями. На электронномикроскопическом уровне хромосомы состояли из фибрилл с минимальной толщиной 20 нм. В клетках, содержащих частично деконденсированные хромосомы, было видно, что они образованы пучками сестринских хроматид, связанных в районе центромер и разобщенных в дистальных теломерных участках. В ядре происходили процессы активного синтеза РНК, наблюдались места скопления гранул РНП. Данные радиоавтографии показали, что репликация идет в полностью деконденсированном ядрах, где не удается выявить индивидуальные хромосомы. Небольшое количество метки обнаруживается в эухроматических районах индивидуальных хромосом (Пушкина, 1989).

В работе Хрусталева прослежены изменения структуры ядер антиподальных клеток в семяпочках ячменя. Было описано 6 стадий расположения хроматина и политенных хромосом. На первой стадии хроматин располагается около ядерной оболочки, на второй стадии наблюдается конденсация выпетливания нитей хроматина, контактирующих друг с другом. Стадии 1 и 2 выявляли в антиподальных ядрах семяпочек размером 0,3 мм. В семяпочках размером 0,5 мм, политенные хромосомы сильно компактизованы и индивидуализированы (третья стадия), авторы предположили, что на этой стадии антиподальные клетки наиболее активны. На стадии 4 хромосомы были сближены и сконцентрированы на одном полюсе ядра. На стадии 5 отдельные хромосомы не выявлялись, хроматин располагался на периферии ядра. Стадии 4 и 5 выявляли в семяпочках размером 1 мм. На стадиях 1 – 5 в ядрах выявляли 1-2 округлых ядрышка. Хроматин локализовался преимущественно на одной стороне ядра, на противоположной стороне ядра мелкие блоки хроматина. На стадии 6, наблюдались структурные изменения хроматина, его фрагментация, хаотичное расположение фрагментов в ядре, ядрышко не визуализировалось (Хрусталева и др., 2010).

## 2.2. Особенности строения и формирования зародышевого мешка злаков

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

### 2.2.1. Формирование зародышевого мешка злаков

Развитие зародышевого мешка у злаков (рис. 11, а) происходит по типу *Polygonum* (Johri, 1984). При таком типе развития зародышевого мешка мегаспора делится мейозом и формируются четыре дочерние мегаспоры. Три из образовавшихся мегаспор дегенерируют. Оставшаяся мегаспора, расположенная на халазальном конце зародышевого мешка, делится митотически (Батыгина, 1994). В результате митотических делений ядер формируется неклеточный зародышевый мешок, содержащий восемь ядер. Позже закладываются клеточные стенки между ядрами и формируются семь клеток – яйцеклетка, синергиды, три антиподальные клетки и центральная клетка. Яйцеклетка и две синергиды формируют яйцевой аппарат, располагающийся на микропиллярном конце. На противоположной яйцеклетке халазальном конце зародышевого мешка находятся три антиподальные клетки. Двухядерная центральная клетка располагается в центре зародышевого мешка, позже ядра могут сливаться (Schnarf, 1929; Эзау, 1980).

### 2.2.2. Двойное оплодотворение

Двойное оплодотворение у растений (рис. 11, б) включает в себя три фазы – прогамную, гамогенеза и постгамную. Прогамная фаза – фаза взаимодействия пыльцы и тканей пестика и прорастания пыльцевых трубок к семязпочкам. Гамогенез – это взаимодействие пыльцевых трубок с тканями семязпочек и двойное оплодотворение. Постгамная фаза (бывает не всегда) – фаза взаимодействия развивающегося зародыша с проникшими в избыточном количестве сперматозоидами (Кордюм, 2008).

С момента опыления (попадание пыльцы на рыльце пестика) до оплодотворения (слияние яйцеклетки и сперматозоида) у покрытосеменных растений проходит короткий промежуток времени, у пшеницы он составляет 15 мин (Кордюм, 2008). За это время два спермия спускаются по пыльцевой трубке, достигающей зародышевого мешка (Namatuna et al., 2012). После этого содержимое пыльцевой трубки попадает в одну из синергид и разрушает ее (Dresselhaus, 2006; Namatuna et al., 2012). Один из спермиев сливается с ядром яйцеклетки, другой – с ядром центральной клетки (Кордюм, 2008). В результате делений зиготы формируется зародыш, а в результате делений оплодотворенной центральной клетки формируется эндосперм. Таким образом, в зародышевом мешке после оплодотворения присутствуют ткани, содержащие ядра различной ploidy – зародыш с диплоидными ядрами, эндосперм с триплоидными ядрами и антиподальные клетки с гаплоидным числом хромосом (рис. 11 в; рис. 12).

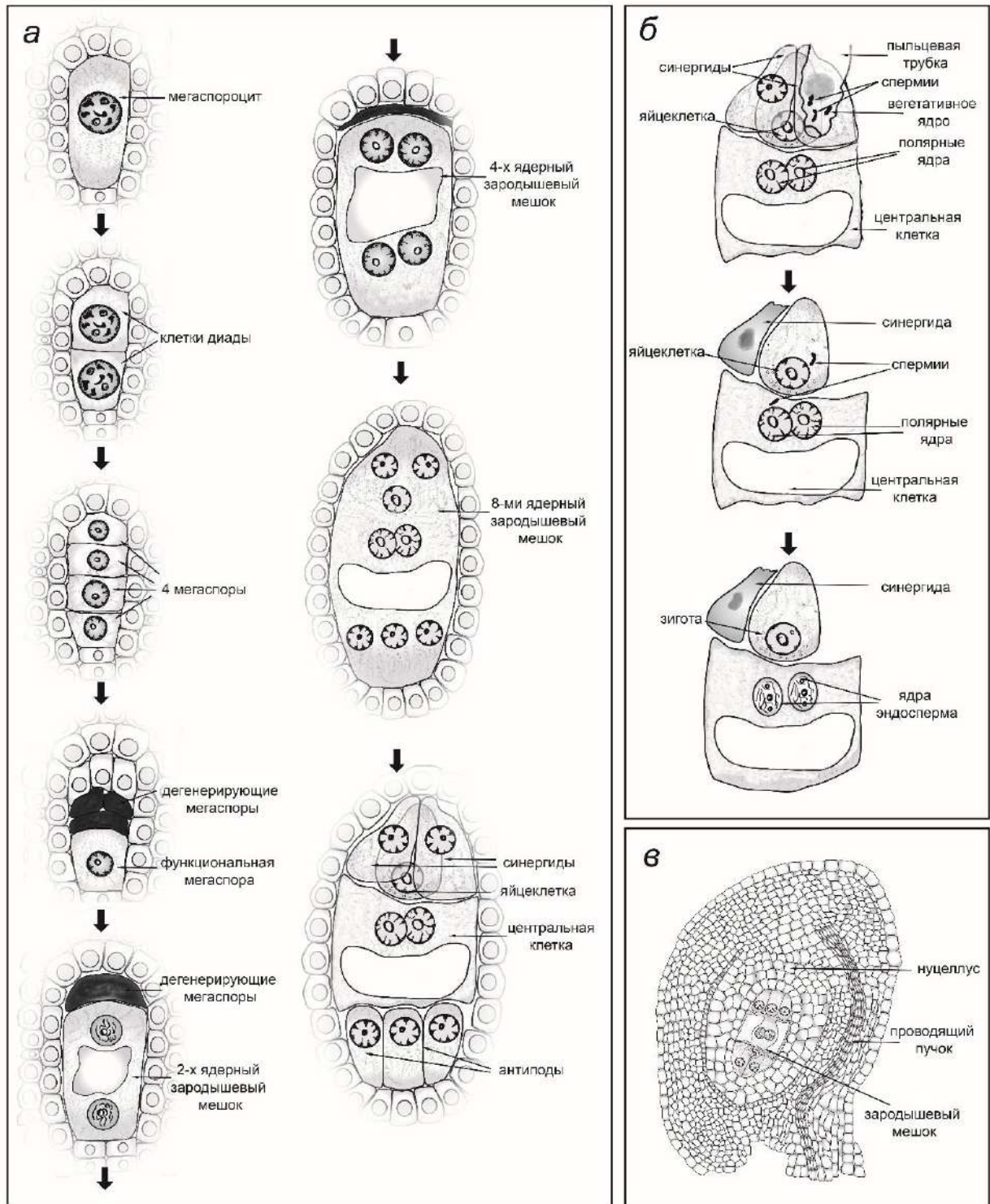


Рис. 11. Начальные этапы эмбриогенеза семени у *Arabidopsis thaliana* и злаков.

а – этапы формирования зародышевого мешка. Мегаспороцит делится мейотически, из образовавшихся четырех мегаспор три гибнут. Оставшаяся мегаспора в результате митотических делений дает начало восьми ядрам зародышевого мешка. В ходе целлюляризации формируется семь клеток – яйцеклетка, две синергиды, центральная клетка с двумя полярными ядрами и три антиподальные клетки.

б – двойное оплодотворение. Пыльцевая трубка подходит к синергиде. Один из спермиев сливается с яйцеклеткой, давая начало зиготе, а другой – с центральной клеткой зародышевого мешка, формируя эндосперм.

в – схема строения семяпочки. (Доронина и др., 2019)



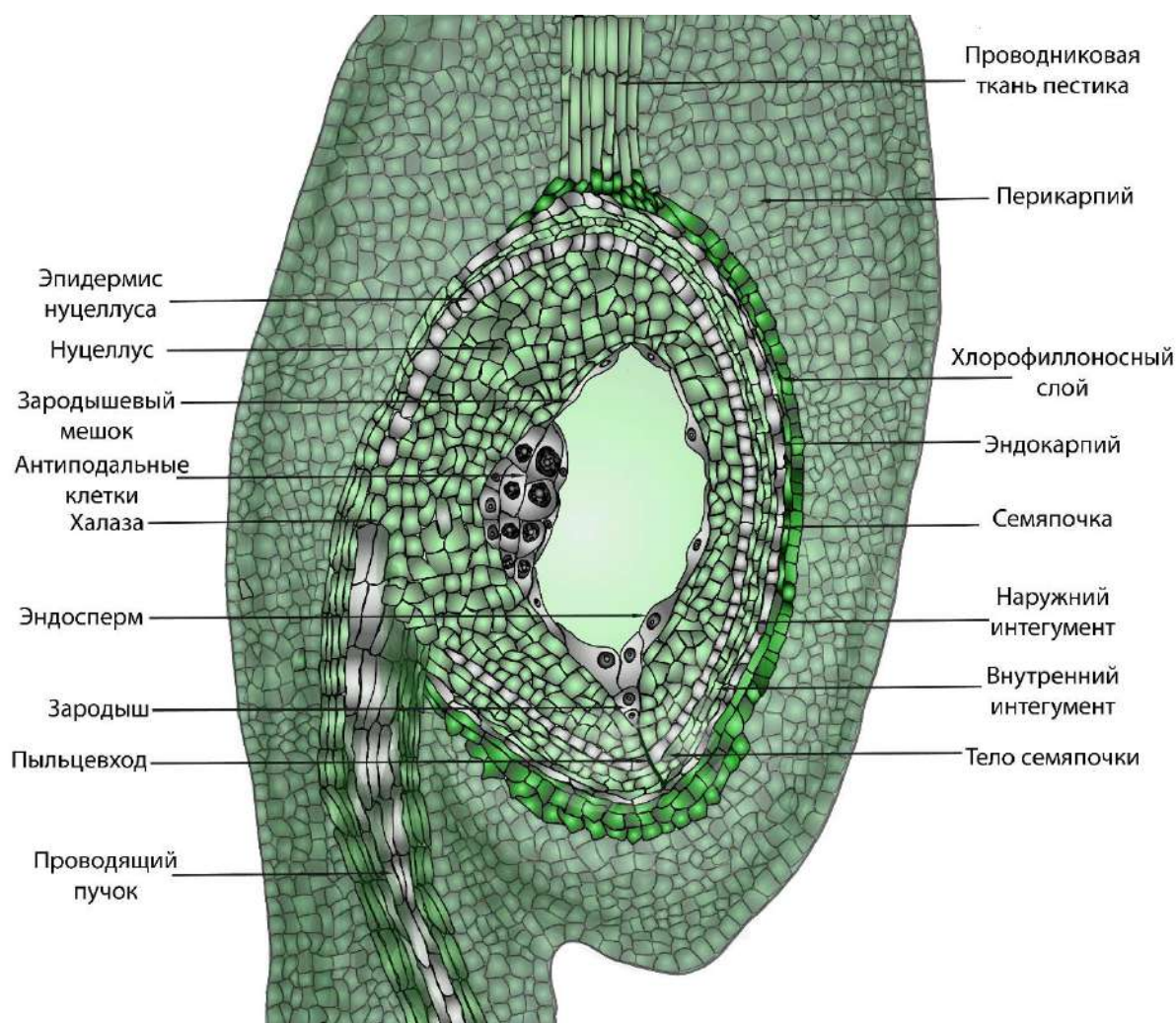


Рис. 12. Строение семяпочки пшеницы

После двойного оплодотворения из семяпочки начинает развиваться семя. Этапы формирования семени и последовательные стадии формирования тканей семени имеют свои особенности у разных групп растений.

Хорошо изучено строение тканей семяпочки у *Arabidopsis* (рис. 13, а) и злаков (рис. 13, б). При делении зиготы одна из клеток дает начало зародышу, другая – подвеску. Подвесок выполняет трофическую функцию, и связывает зародыш с тканями формирующегося семени (Peng, Sun, 2018). Зародыш в развитии проходит несколько стадий. Данные о дифференцировке ценоцита эндосперма у злаков и *Arabidopsis* обобщены в обзоре Olsen (Olsen, 2004). После двойного оплодотворения ядро первичной клетки эндосперма ядра злаков делится без цитокинеза, затем начинается процесс целлюляризации. Позднее в части клеток многослойного эндосперма накапливаются крахмальные зерна, другие клетки дифференцируются в алейроновый слой. У *Arabidopsis* ценоцитный эндосперм также претерпевает процесс целлюляризации, впоследствии

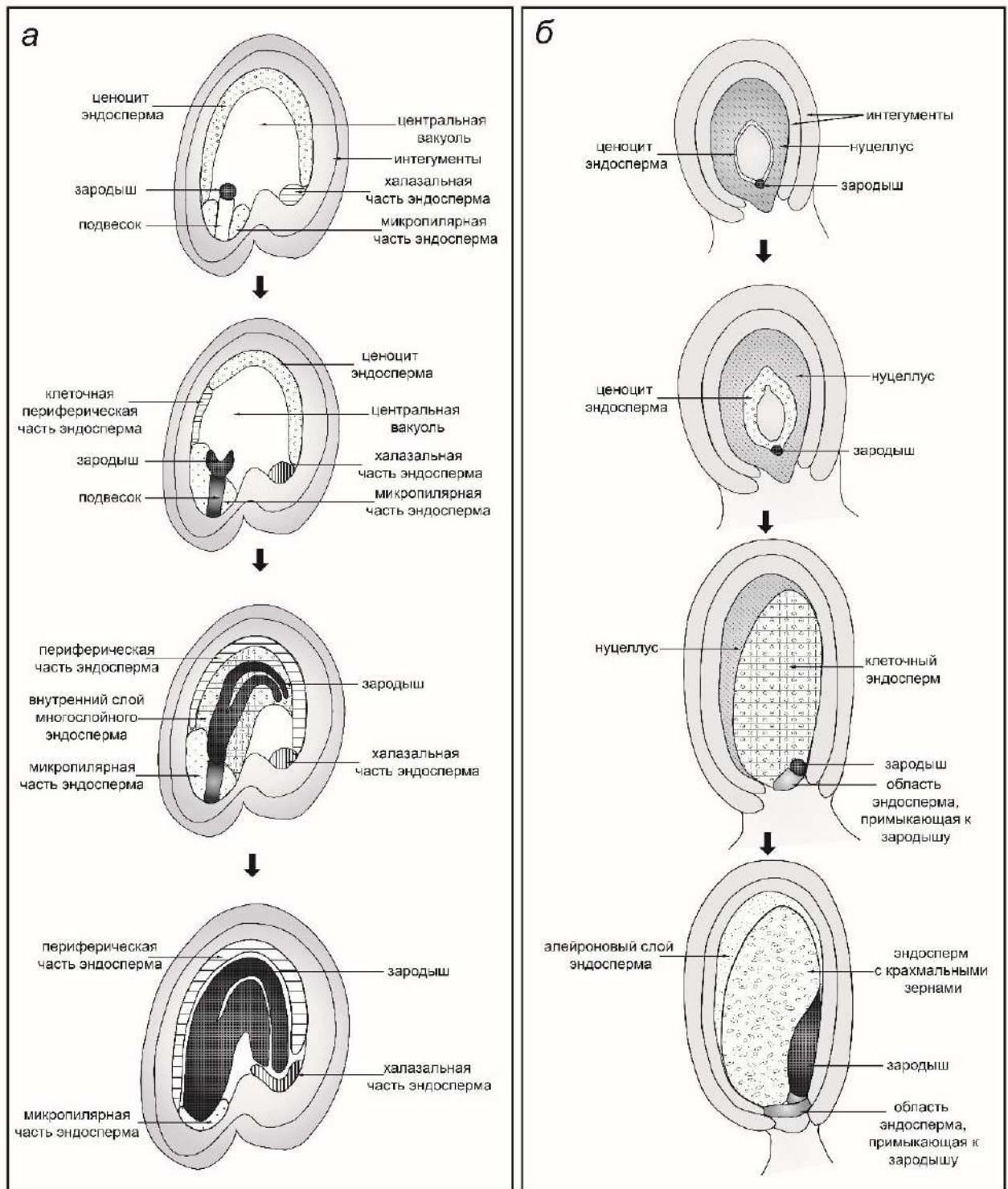


Рис. 13. Развитие семени *Arabidopsis thaliana* и *Zea mays*. На схеме представлены последовательные стадии дифференцировки тканей формирующегося семени. а – формирование семени *Arabidopsis thaliana*. По мере роста зародыша большая часть эндосперма подвергается ПКГ и абсорбируется, остаются три области – периферическая, микропилярная и халазальная. б – формирование семени *Zea mays*. В процессе развития семени эндосперм разрастается и дифференцируется на центральную область и алейроновый слой. Позднее, при прорастании, клетки алейронового слоя эндосперма выделяют гидролазы, которые делают вещества крахмального эндосперма доступными для зародыша. (Доронина и др., 2019)

– однослойная периферическая область, область, окружающая зародыш, и халазальная область (Olsen, 2004; Locascio et al., 2014).

На протяжении стадии активного функционирования антиподальных клеток злаков этапы онтогенеза антиподальных клеток тесно связаны с онтогенезом эндосперма (рис. 14, а-г). Основная функция эндосперма – это накопление питательных веществ – белков в форме алейроновых зерен, липидов и крахмала (Поддубная-Арнольди, 1976) для питания зародыша. В ходе онтогенеза эндосперм злаков проходит несколько стадий: стадию раннего развития (включающую в себя двойное оплодотворение, формирование синцития и клеткообразование); стадию дифференцировки (включающую пролиферацию) и стадию программированной клеточной гибели (Sabelli, Larkins, 2009).

Эндосперм у пшеницы относится к нуклеарному типу – т.е. первые несколько десятков делений проходят без цитокинеза, лишь по достижении определенного числа ядер начинается процесс целлюляризации (Sabelli, Larkins, 2009).

На нуклеарной стадии можно наблюдать митотические волны – группы ядер эндосперма, находящихся на последовательных стадиях митоза (Батыгина, 1987).

Первые деления клеток эндосперма характеризуются коротким периодом прохождения интерфазы без синтеза питательных веществ. На нуклеарной стадии в синцитии эндосперма выявляются много вакуолей, небольшое количество диктиосом, и ЭПР, имеющий вид концентрических колец (Батыгина, 1987). Считают, что питательными веществами в этот период эндосперм обеспечивают антиподальные клетки, транспортируя аминокислоты, витамины и другие вещества (Hoshikawa, 1960; Bennet et al., 1973; Huber, 1984; Sabelli, Larkins, 2009; Чабан, 2008; Чабан и др., 2011).

Процесс клеткообразования начинается спустя 40-50 часов после опыления, когда эндосперм содержит около 100 ядер. При этом, в области эндосперма, расположенном вблизи зародыша, клеточные стенки формируются раньше, чем в части эндосперма с противоположной стороны от микропиле (Huber, 1984). Одновременно повышается количество диктиосом в цитоплазме, а вакуолей становится меньше. Фрагмопласт, в области которого, будут формироваться первичные клеточные стенки, возникает как между сестринскими, так и между несестринскими ядрами эндосперма (Батыгина, 1987).

На 3-4 сутки после оплодотворения в клетках эндосперма начинается процесс синтеза крахмала. На 5-7 сутки процесс клеткообразования эндосперма завершается. На 10-12 сутки имеется уже сформированный клеточный эндосперм, и начинает дифференцироваться алейроновый слой (Батыгина, 1994).

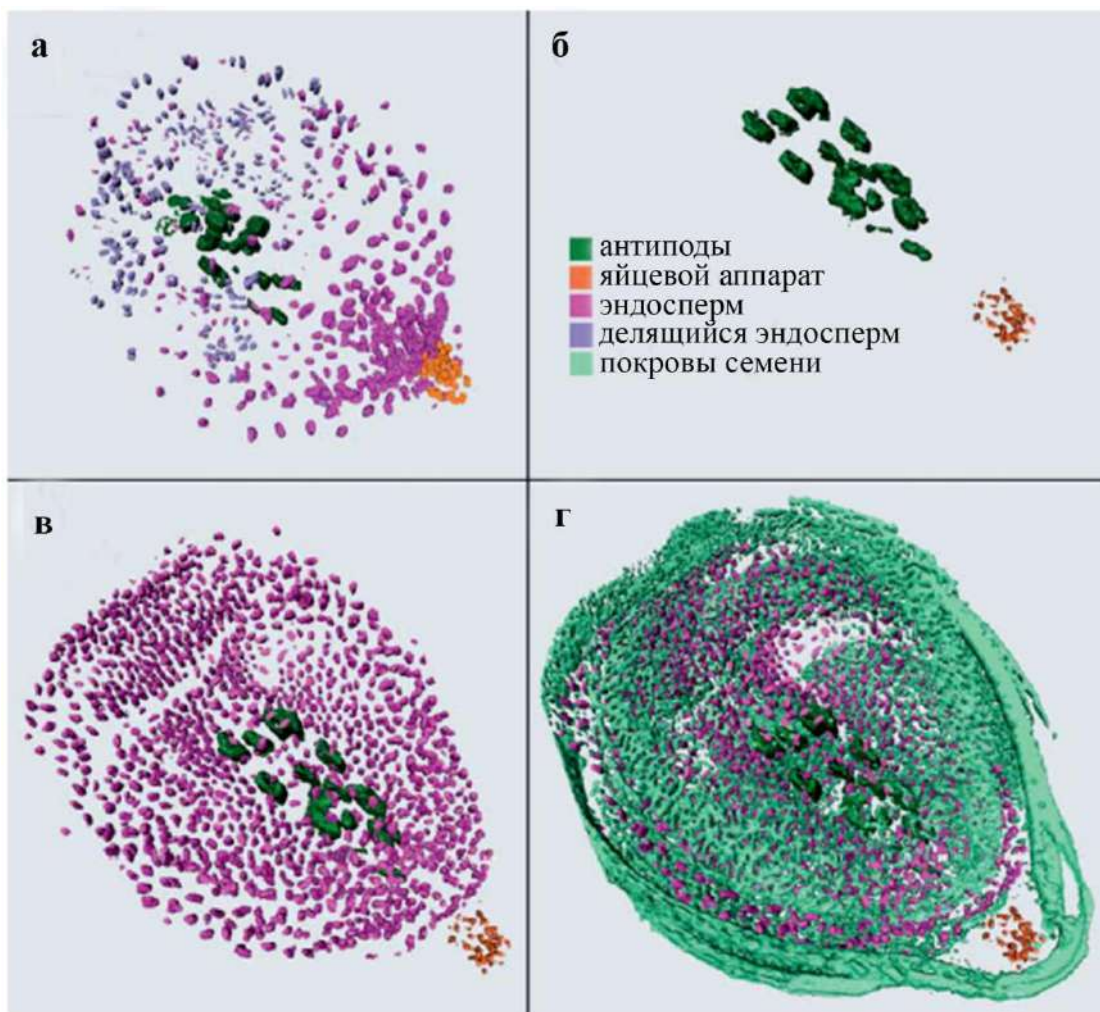


Рис. 14. Трехмерная реконструкция тканей зародышевого мешка пшеницы. б – ядра антиподальных клеток и яйцевого аппарата, ядра тканей зародышевого мешка на второй (а), третий (в) и четвертый (г) день после оплодотворения. (Wegel at al., 2005)

### 2.3. Антиподальные клетки злаков

Антиподальные клетки присутствуют в зародышевом мешке 80% цветковых растений, в т.ч. в зародышевых мешках типа *Polygonum*, к которому относятся злаки. У многих злаков антиподальные клетки делятся и образуют многоклеточную эфемерную ткань (Батыгина, 1994). Количество антиподальных клеток в зародышевых мешках злаков, а также количество ядер в клетках значительно варьирует (Таблица 2). Большая часть имеющихся на сегодняшний момент данных о количестве антиподальных клеток и их ядер взято из ранних работ, фактически не содержащих описания особенностей антиподальных клеток, а посвященных описанию структуры зародышевого мешка в целом.

Сведения об антиподальных клетках дикорастущих злаков фрагментарны. У некоторых видов дикорастущих злаков наблюдается увеличение числа антиподальных клеток и выявлены политенные хромосомы. Антиподальные клетки культурных злаков охарактеризованы лучше. В ряде работ была дана краткая характеристика ультраструктуры антипод разных злаков – кукурузы (Diboll and Larson, 1966; Diboll, 1968), риса (Maeda and Miyake., 1996; Maeda and Miyake., 1997), ячменя (Engell, 1994) и пшеницы (Morrison, 1954; Hoshikawa, 1960; You and Jensen, 1985). Тем не менее, существующие на данный момент данные об антиподальных клетках зародышевого мешка злаков не дают исчерпывающего представления о структуре этих клеток на разных этапах их развития.

Количество, продолжительность жизни и размеры антиподальных клеток зависят не только от конкретного вида растения, но и от сорта и условий, в которых произрастает растение. Были проведены исследования, в которых сравнивалось количество антиподальных клеток двухрядного и шестирядного ячменя (Бланковська, Шестопап, 2002), пшеницы, ржи и их гибридов (Трочинська, Бланковська, 2006), а также двухрядного ячменя разных сортов (Шестопап, Бланковська, 2006), в условиях выращивания их в теплице и в поле (Шестопап и др., 2004). Авторами была высказана идея, что количество антиподальных клеток может варьировать, а необходимый уровень их физиологической активности может достигаться соотношением определенного числа клеток и размеров их ядра и ядрышка. При неблагоприятных условиях среды, таких как низкая температура, слабое освещение, оптимальный уровень активности антиподальных клеток может достигаться увеличением числа клеток при уменьшении их объема или увеличением их объема при уменьшении их количества (Шестопап и др., 2004).

Таблица 2. Число антиподальных клеток у различных злаков (по Slover, 1937 с дополнениями и изменениями).

Латинское название	Русское название	Кол-во антипод	Кол-во антиподальных ядер	Автор
<i>Aegilops ovata</i>	Эгилопс яйцевидный			Schnarf, 1926
<i>Agrostis incana</i>	Полевица	6	2 ядра	Shadowski, 1926
<i>Agrostis perennans</i>	Полевица крупнометельчатая	3	2 ядра	Guignard, 1882
<i>Alepecurus pratensis</i>	Лисохвост луговой	3	3-4 ядра	Fischer, 1880
<i>Andropogon caucasicum</i>	Бородач кавказский	4-6	1 ядро	Shadowski, 1926
<i>Andropogon ischaemum</i>	Бородач обыкновенный	5-16	1 ядро	Shadowski, 1926
<i>Avena fatua</i>	Овес пустой	25-30	Многоядерные	Cannon, 1910
<i>Avena sativa</i>	Овёс посевной	11-30	Многоядерные	Tannert, 1905, Golinski, 1893
<i>Avena pubescens</i>	Овсец пушистый	3	1 ядро	Lotscher, 1905
<i>Avena flavescens</i>	Трищетинник желтоватый	5-16	Многоядерные	Shadowski, 1926
<i>Bambusa bambos</i>	Колючий бамбук	60		Schnarf, 1926
<i>Briza media</i>	Трясунка средняя	Много	Многоядерные	Fischer, 1880
<i>Briza maxima</i>	Трясунка большая	Много	Многоядерные	Westermaier, 1890
<i>Bromus villosus</i>	Костёр безостый	3-10		Beck and Horton, 1932
<i>Bromus marginatus</i>	Костёр горный	3-10		Beck and Horton, 1932
<i>Bromus rubens</i>	Костёр красный	3-10		Beck and Horton, 1932

<i>Cleistogenes serotina</i> (устар. <i>Diplachne serotina</i> )	Змеевка поздняя	8-14	1 ядро	Shadowski, 1926
<i>Chloris gayana</i>	Родсова трава	6	Многоядерные	Shadowski, 1926
<i>Coix lacryma</i>	Иовлевы слёзы	3	Многоядерные	Hofmeister, 1861
<i>Coleanthus subtilis</i>	Влагалищецветник маленький	3	Многоядерные	Schnarf, 1926
<i>Cynodon dactylon</i>	Свиной пальчатый	6-10	Многоядерные	Shadowski, 1926
<i>Dactylis glomerata</i>	Ежа сборная	5-8	2-3 ядра	Shadowski, 1926
<i>Ehrharta panicea</i>	Эрхарта прямостоячая	3-6	2 ядра	Fischer, 1880
<i>Eleusine indica</i>	Элевзина индийская	3		Cummins, 1929
<i>Elytrigia repens</i> (устар. <i>Agropyrum repens</i> )	Пырей ползучий	10-16		Mowery, 1929
<i>Eragrostis cilianensis</i>	Полевичка чилианская	4-6	1 ядро	Stover, 1936
<i>Eulalia japonica</i> ( <i>Miscanthus sinensis</i> )	Мискантус китайский	15-24	2-3 ядра	Shadowski, 1926
<i>Gynerium argenteum</i>	Пампасная трава	8-13	1 ядро	Shadowski, 1926
<i>Hordeum distichum</i>	Ячмень двурядный	Много		Westermaier, 1890
<i>Hordeum murinum</i>	Ячмень мышиный	5		Lotscher, 1905
<i>Hordeum vulgare</i>	Ячмень обыкновенный	6-20		Hofmeister, 1861, Lotscher, 1905

		50-70	1 ядро	Петрова и др., 1985
		35-55	1 ядро	Engell, 1994
		4-40	1 ядро	Бланковська, Шестопал, 2002
		~ 40	1 ядро	Шестопал, 2004
<i>Hordeum vulgare</i> (устар. <i>Hordeum</i> <i>tetrastichum</i> )	Ячмень обыкновенный	Много		Golinski, 1893
<i>Leymus arenarius</i> (устар. <i>Elymus</i> <i>arenarius</i> )	Колосняк песчаный	6-12		Hofmeister, 1861, Fischer, 1880
<i>Lolium italicum</i>	Плевел многоцветковый	3	Многоядерные	Westermaier, 1890
<i>Lolium</i> <i>tremulentum</i>	Плевел опьяняющий	3	Многоядерные	Westermaier, 1890
<i>Luzula pilosa</i>	Ожика волосистая	3		Fischer, 1880
<i>Koeleria cristata</i>	Тонконог крупноцветковый	4	Многоядерные	Fischer, 1880
<i>Melica nutans</i>	Перловник поникший	3		Fischer, 1880
<i>Melica altissima</i>	Перловник высокий	3		Fischer, 1880
<i>Molinia coerulea</i>	Молиния голубая	11-43	2 ядра	Shadowski, 1926
<i>Nardus stricta</i>	Белоус торчащий	Много		Coulon, 1923
<i>Oryza sativa</i>	Рис посевной	6-20	1 ядро	Kuwada, 1910
				Terada, 1928
				Juliano and Aldama, 1937
		5-10		Kono and Ohashi, 1967



		10-15		Jones and Rost, 1989
		3-5		Hoshikawa, 1993
<i>Oplismenus undulatifolium</i>	Остянка курчаволистная	10-18	2 ядра	Shadowski, 1926
<i>Paspalum dilatatum</i>	Гречка расширенная	5-14	2-3 ядра	Shadowski, 1926
<i>Poa annua</i>	Мятлик однолетний	12	2-4 ядра	Golinski, 1893
<i>Poa pratensis</i>	Мятлик луговой	3-6	Многоядерные	Nishimura, 1922, Anderson, 1927
<i>Poa compressa</i>	Мятлик сплюснутый	3-5		Anderson, 1927
<i>Saccharum officinarum</i>	Сахарный тростник	5	Многоядерные	Artschwager, 1929
<i>Secale cereale</i>	Рожь посевная	20		Hofmeister, 1858-61, Fischer, 1880, Golinski, 1893, Westermaier, 1890, Lotscher, 1905
		16-32	1 ядро	Трочинська Бланковська, 2006
<i>Sesleria coerulea</i>	Сеслерия голубая	3	Многоядерные	Fischer, 1880
<i>Sorghum bicolor</i>	Сорго двуцветное	Много		Hofmeister, 1842
<i>Sorghum helipense</i>	Сорго алеппское	4		Fischer, 1880
		Много	Многоядерные	Hofmeister, 1861
				Stephens, 1934
<i>Tragus racemosus</i>	Козлец кистистый	3-5	1 ядро	Shadowsky, 1926

<i>Triticum compactum</i>	Пшеница карликовая	36	Многоядерные	Koernicke, 1896
<i>Triticum repens</i>	Пшеница	10	2-3 ядра	Lotscher, 1905
<i>Triticum aestivum</i> (устар. <i>Triticum vulgare</i> )	Пшеница мягкая	Много	Многоядерные	Hofmeister, 1861
		36+		Jensen, 1918
		4		Percival, 1921
		8-12	Многоядерные	Golinski, 1893
		8-20		Morrison, 1955
		15-25		Bennett, 1973
		20 и более		Wei-Cheng et al., 1988
		24-36		Трочинська, Бланковська, 2006
		25-27		Чабан и др., 2011
<i>Zea mays</i>	Кукуруза обыкновенная	25		Hofmeister, 1849
				Westermaier, 1890
				Golinski, 1893
				Guignard, 1901
				Lotscher, 1905
				Miller, 1920
		25	5-6 ядер	Weatherwax, 1926
		20	Многоядерные	Dibol, 1968

### 2.3.1. Антиподальные клетки кукурузы (*Zea mays* L.)

Антиподальные клетки кукурузы, в отличие от антиподальных клеток других злаков являются многоядерными (Батыгина, 1994). В зародышевом мешке кукурузы выявляется 20-25 многоядерных антиподальных клеток (Diboll, 1968).

Описана структура антиподальных клеток в составе зрелого гаметофита кукурузы до (Diboll and Larson, 1966) и после (Diboll, 1968) двойного оплодотворения (рис.15 а, б; 16 а, б). Клеточные стенки антиподальных клеток, граничащих с нуцеллусом, формировали складки, в зрелом гаметофите до оплодотворения клеточные стенки между антиподальными клетками были сформированы не полностью, что вело к появлению многоядерного протопласта. По мнению авторов, такая структура оболочки клеток связана с активным перемещением питательных веществ через клеточную стенку (Diboll and Larson, 1966). Органеллы были многочисленны, плотность распределения органелл была выше по сравнению с другими клетками гаметофита (Diboll, 1968). В ядрышке преобладал гранулярный компонент. Митохондрии были округлыми или овальными. Пластиды содержали незначительное число крахмальных зерен. Диктиосомы были сформированы 6-8 цистернами с многочисленными везикулами. Цистерны ЭПР очень разнообразны по своему размеру – от цистерн, превышающих длину диктиосом, до цистерн, сравнимых по размеру с диктиосомами. В антиподальных клетках содержались либо одна крупная, либо много небольших вакуолей (Diboll and Larson, 1966).

Было показано, что в антиподах кукурузы экспрессируются гены, связанные с ауксиновым сигнальным путём. Предполагается, что на ранних стадиях развития зародышевого мешка ауксин синтезируется в центральной клетке, которая, транспортирует его антиподам. После пролиферации антиподы, как транзиторная ткань, передают ауксин в другие части семяпочки. Анализ мутантов по гену *Laxmidrib1* показал, что в отсутствие ауксина пролиферации антипод не происходит, что сопровождается снижением экспрессии генов *DR5* и *PIN1a*, связанных с метаболизмом ауксина. При этом морфология антиподальных клеток у мутантных растений была нормальная, поэтому авторы предполагали, что ауксин нужен именно для роста и пролиферации антиподальных клеток, а не для их дифференцировки (Chetoor and Evans, 2015).

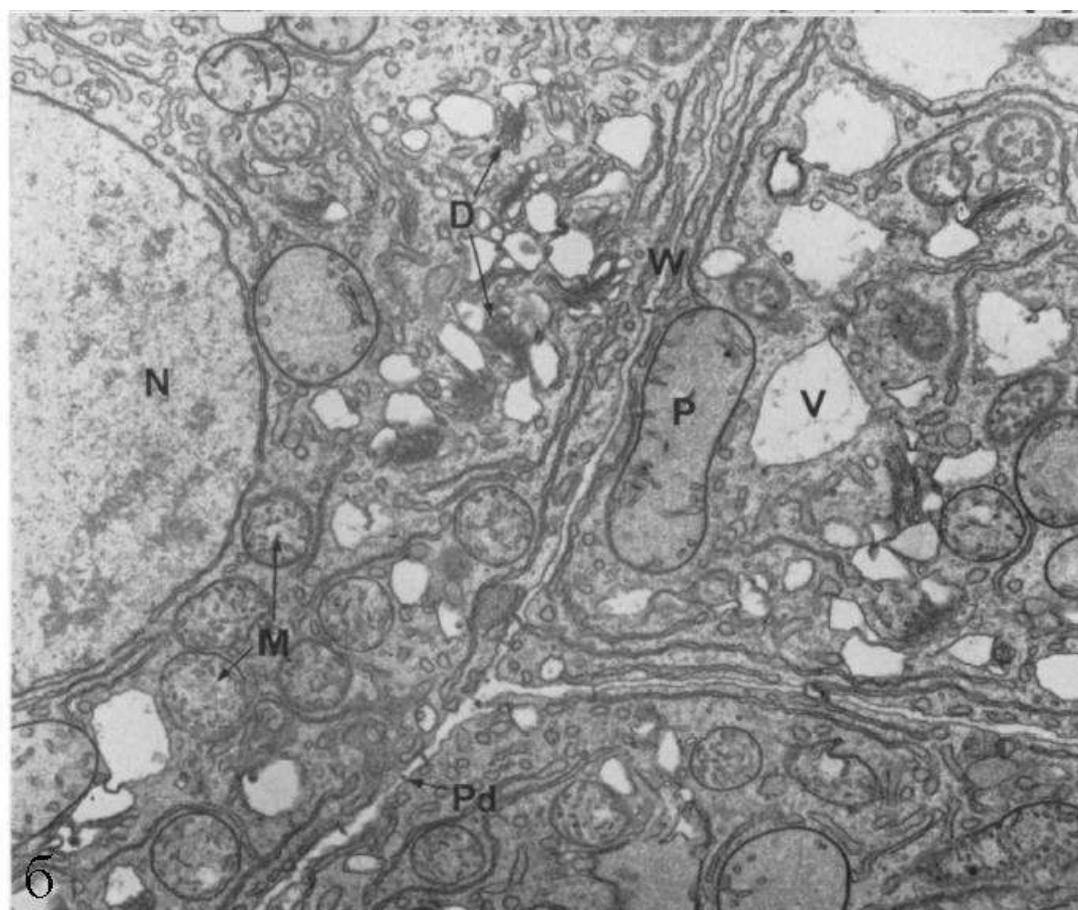
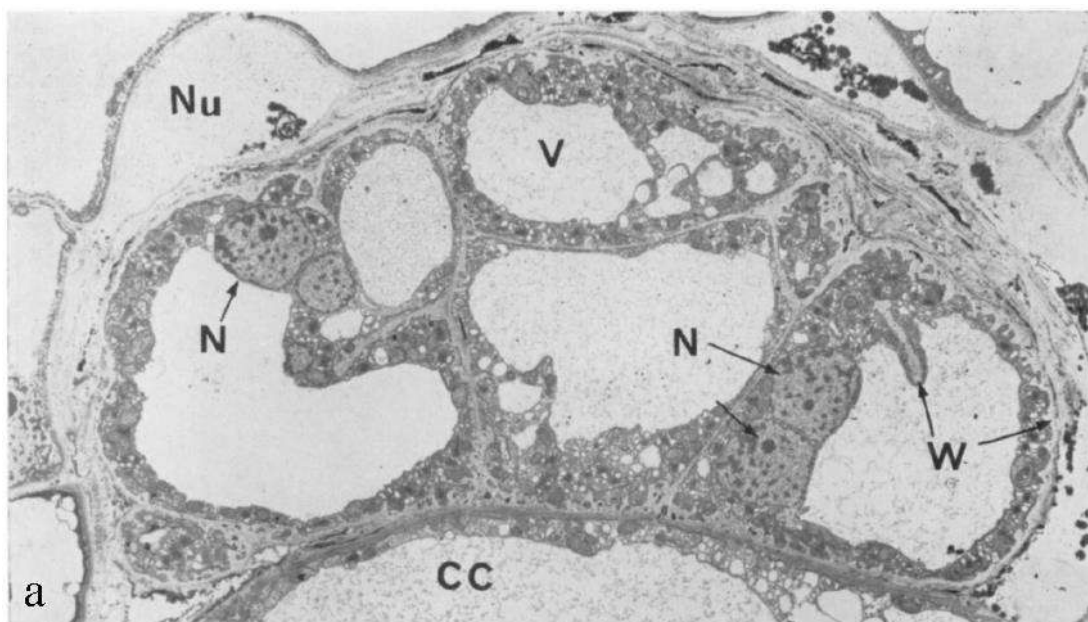


Рис. 15. Ультраструктура ядер и цитоплазмы антиподальных клеток кукурузы.  
 а – на поперечном срезе представлены клетки антиподального комплекса кукурузы, в двух клетках комплекса видны два ядра (N).  
 б – фрагменты цитоплазмы трех антиподальных клеток с многочисленными митохондриями (M), пластидами (P), диктиосомами (D) и вакуолями (V) (Diboll and Larson, 1966).

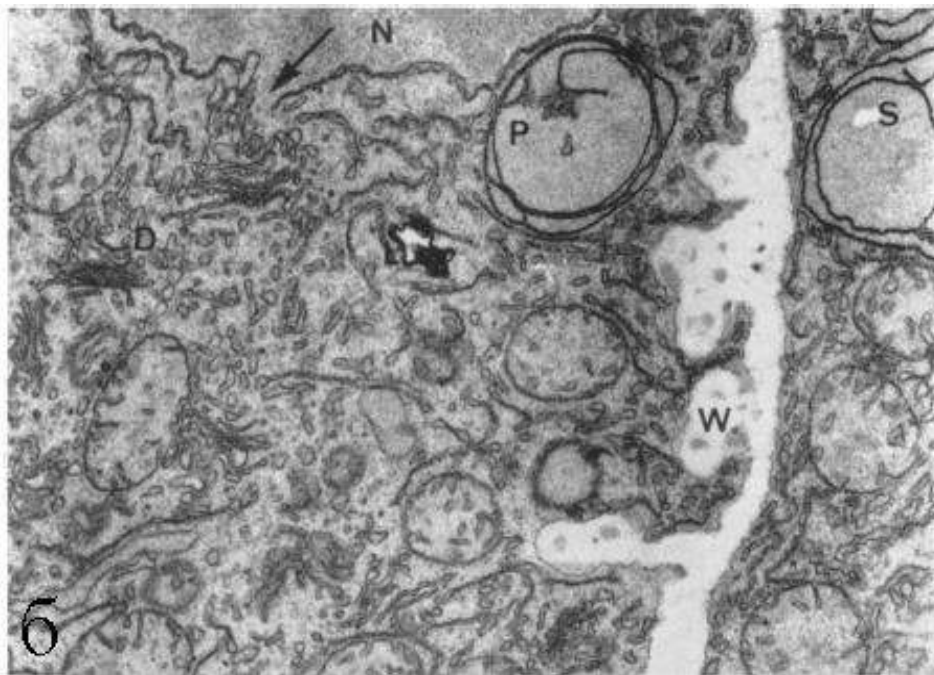
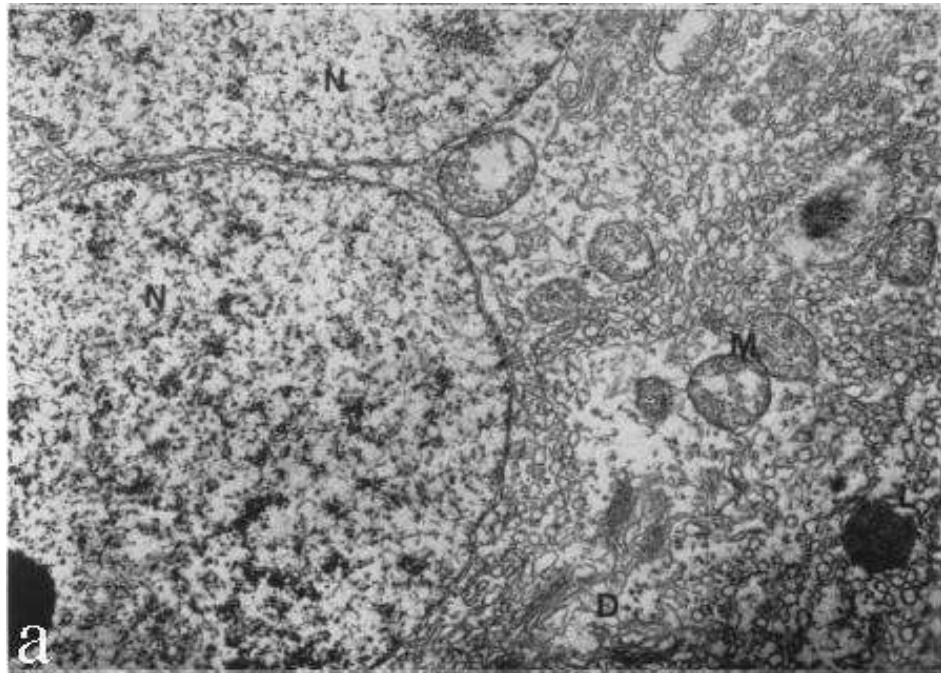


Рис. 16. Ультраструктура ядер и цитоплазмы антиподальных клеток кукурузы. а – фрагмент клетки с фрагментами ядер с дисперсным хроматином, митохондриями, диктиосомами, липидными каплями и развитым гладким ретикулумом цитоплазмы; б – фрагменты цитоплазмы двух клеток, видны диктиосомы, митохондрии, пластиды и инвагинации клеточной стенки (W) (Diboll and Larson, 1966).

### 2.3.2. Антиподальные клетки риса (*Oryza sativa* L.)

Характеристика антиподальных клеток риса на отдельных этапах онтогенеза зародышевого мешка, изученных методами световой микроскопии дана в ранних работах (Kuwada, 1910; Terada, 1928). В зародышевом мешке риса выявлено около 20 антиподальных клеток (Kuwada, 1910). Цитоплазма молодых антиподальных клеток была заполнена множеством бесцветных гранул, которые при обработке хлоридом цинка становились красновато-коричневыми. Подобные гранулы встречались также в яйцеклетке, синергидах и центральной клетке, однако быстро исчезали. В антиподальных клетках эти гранулы сохранялись дольше всего. По мнению авторов, содержимое гранул представляло собой амиродекстрин и амилозу (Terada, 1928). Дегенерация антиподальных клеток риса начиналась на седьмые сутки после оплодотворения. На этапе дегенерации антипод риса в клетках имелись огромные вакуоли, ядра клеток содержали большое количество крупных хромосом, из-за чего ядрышко становилось незаметным. Антиподальные клетки сохраняли жизнеспособность около 11 дней после оплодотворения (Terada, 1928).

В серии работ проведено сравнение ультраструктуры клеток антиподального комплекса риса до (Maeda and Miyake, 1997) и после опыления (Maeda and Miyake, 1996).

До опыления антиподальные клетки имели крупные ядра с вакуолизированным ядрышком, в ядрах выявлялось небольшое содержание гетерохроматина. Ядерная оболочка образовывала многочисленные инвагинации. В ядерной оболочке присутствовало большое количество ядерных поровых комплексов, вблизи ядерной оболочки выявлялись многочисленные осмиофильные гранулы. Авторы предполагают, что ядра находились в активном состоянии и активно транспортировали РНК в цитоплазму между инвагинациями ядерной оболочки. Там часто выявлялись цистерны ЭПР. Гранулярный ЭПР был представлен как короткими цистернами, так и концентрическими кругами цистерн. Концентрические круги цистерн часто окружали фрагменты цитоплазмы с пластидами. Единичные параллельные цистерны ЭПР чаще выявлялись в частях антиподальных клеток, соседствующих с центральной клеткой. В цитоплазме имелись многочисленные митохондрии с хорошо развитыми кристами и пластиды с небольшим количеством ламелл. Крахмальные зерна в пластидах были единичными, либо не выявлялись вовсе (Maeda and Miyake, 1997).

Для изучения морфологии антиподальных клеток после двойного оплодотворения были взяты семечки на стадии 4-5 часов после опыления. Антиподальные клетки были очень крупными, порядка 40 мкм в диаметре (в сравнении с клетками нуцеллуса 4 мкм в

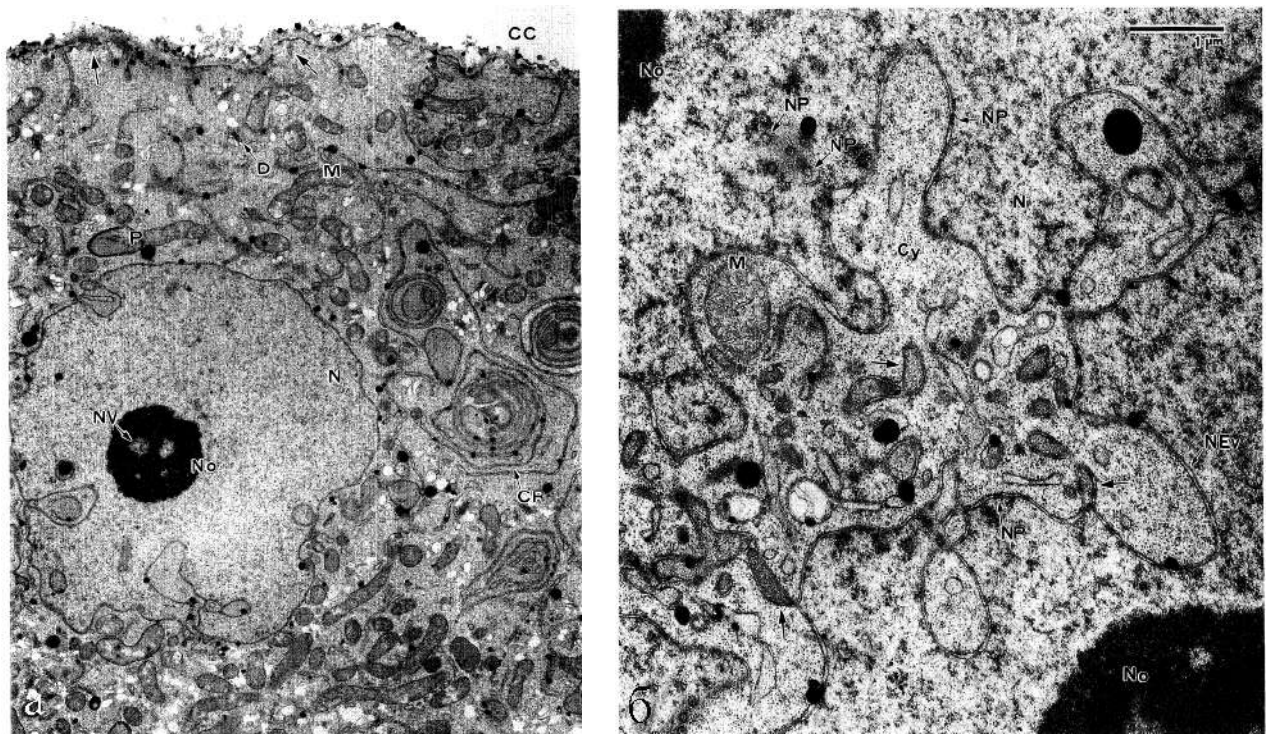


Рис. 17. Ядро (а) и участок цитоплазмы (б) антиподальных клеток риса (Maeda and Miyake, 1997).

диаметре). Крупные ядра антиподальных клеток размером около 25 мкм в диаметре имели многочисленные инвагинации (рис. 17, а). В ядре преобладал эухроматин, встречались отдельные блоки гетерохроматина. В цитоплазме выявляли многочисленные органеллы (рис. 17, б) – гранулярный ЭПР, пластиды, митохондрии, диктиосомы. В пластидах содержались небольшие крахмальные зерна. Диктиосомы были представлены 4-8 цистернами. Гранулярный ЭПР чаще всего был представлен короткими цистернами. В цитоплазме присутствовали липидные капли 0,4 мкм в диаметре, с плотным гомогенным содержимым. Гранулярный ретикулум в отдельных местах соединялся с плазматической мембраной вблизи клеточной стенки нуцеллуса, поэтому авторы предположили, что существует передача веществ от нуцеллуса к антиподальным клеткам. В цитоплазме антиподальных клеток до двойного оплодотворения, соседствующих с центральной клеткой, выявляются многочисленные диктиосомы, а также мелкие цистерны 0,1-0,2 мкм в диаметре, с рибосомами на поверхности (Maeda and Miyake, 1996).

### 2.3.3. Антиподальные клетки тритикале (*Triticale*)

В работе Kaltsikes (Kaltsikes, 1973) изучали тритикале сортов 6A190 и 6A250 (ржаные амфиплоиды) и Rosner, Armadillo 458, и 6517 (результат искусственной селекции). До оплодотворения антиподальные клетки тритикале претерпевали ряд митотических делений, после чего начинался процесс эндоредупликации и клетки значительно

увеличивались в размерах. Пролиферация антипод продолжалась до 15-20 часов после опыления.

Число антиподальных клеток в комплексе варьировало от 10 до 30 в зависимости от стадии развития и сорта. Среди антиподальных клеток выявлялись несколько групп, различных по размеру и объему. В большей части сортов с течением времени объем клетки, измеренный микроденситометром возрастал. В большинстве ядер клеток изученных сортов наблюдалось 7 гетерохроматиновых блоков, соответствующих теломерам хромосом ржи. В ядрах выявлены одно, реже несколько ядрышек. Антиподальные клетки достигали пloidности 256 С, в среднем содержание ДНК на клетку антиподального комплекса составляло 80С. Антиподальные клетки сохраняли свою морфологию 72 часа после опыления. Процесс гибели антиподальных клеток начинался на 3-5 сутки после опыления в зависимости от сорта тритикале, затем антиподальные клетки деградировали, их клетки удлинялись, истончались и сморщивались (Kaltsikes, 1973). По предположению авторов антиподальные клетки вовлечены в метаболическую активность, продукцию РНК, поэтому существование антиподальных клеток необходимо для развития полноценного зерна (Kaltsikes, 1973; Kaltsikes et al., 1975).

#### **2.3.4. Антиподальные клетки ячменя (*Hordeum vulgare* L.)**

Петрова с соавторами наблюдали в зрелом зародышевом мешке ячменя 50-70 антиподальных клеток и исследовали структуру гигантских хромосом ядер (Петрова и др., 1985). Ядра антиподальных клеток были очень крупными, до 60 мкм в диаметре (рис. 18, а). На стадии Д10 (по числу ядер эндосперма) зрелого зародышевого мешка в ядрах антиподальных клеток были различимы 7 гигантских хромосом, которые достигали своей максимальной величины и имели уплощенную форму. Положение конденсированных участков хроматина по длине каждой хромосомы различалась. Центральные части хромосом были более конденсированы, в области теломер сильно разрыхлены и контактировали с ядерной оболочкой. В каждом ядре были выявлены 1-2 крупных ядрышка. При изучении ультраструктуры ядер было выявлено, что ядерная оболочка образует глубокие инвагинации и содержит многочисленные поры. Хроматин контактирует с ядерной оболочкой лишь в отдельных местах. Хромосомы имеют хромонемное строение, толщина хромонем 0,3-0,6 мкм и представляют собой ячеистую сеть. Хроматин занимает не всю территорию ядра. Помимо хроматина в ядре встречаются гранулы и фибриллы различной величины. Ядрышки содержат электронно-плотные фибриллы и периферическую гранулярную зону. Кроме крупных ядрышек встречались мелкие ядрышкоподобные образования, которые располагались между петель хроматина,



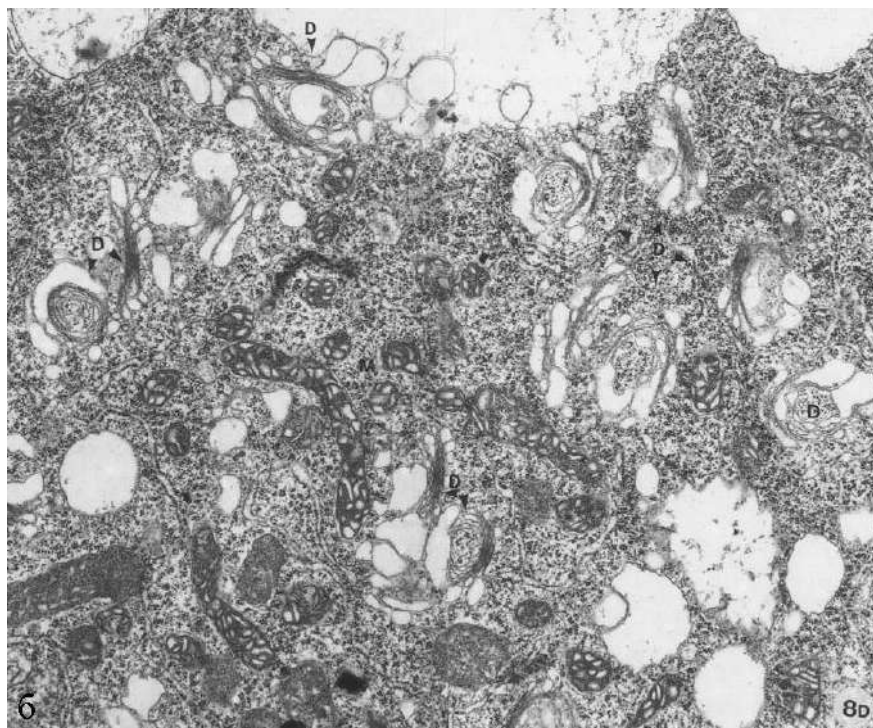
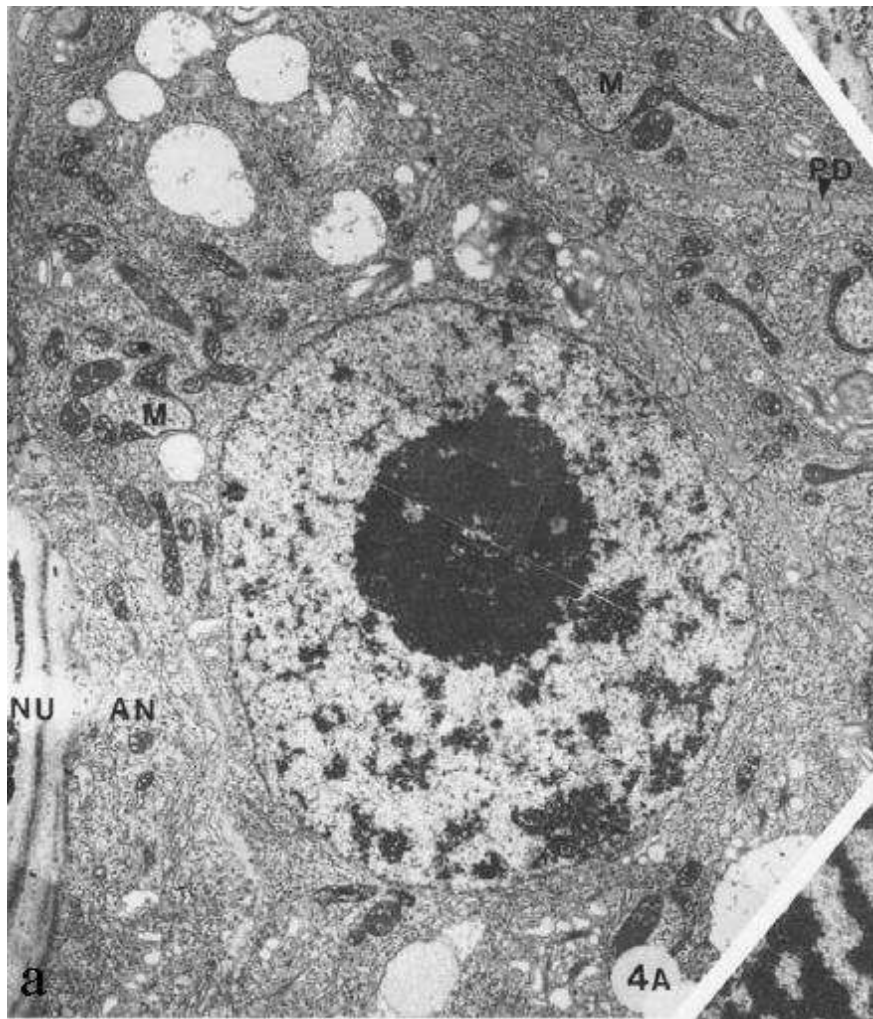


Рис. 18. Хромонемно-хромоцентрическое ядро (а) и органеллы цитоплазмы (б) антиподальных клеток ячменя (Engell, 1994)

содержали как фибриллы, так и гранулы и формировали нуклеолонемы и тельца иной морфологии из фибрилл и гранул на периферии. У таких ядрышкоподобных телец выявлялись светлые «шапочки». Встречались неактивные, по мнению авторов, ядрышки с небольшим числом гранул или вовсе без них. Авторы предположили, что эти разнообразные ядрышкоподобные структуры могут быть результатом амплификации рибосомных генов (Петрова и др., 1985).

Подробно прослежен онтогенез антиподальных клеток зародышевого мешка ячменя (*Hordeum vulgare*), число антиподальных клеток достигало 35-50 клеток (Robertson, 1986; Engell, 1994). Этап пролиферации исходных антиподальных клеток не был изучен. Клетки сохранялись 60-70 часов (5-6 дней) после опыления. На начальных этапах развития комплекс имел вид веера. До и еще 30 часов после оплодотворения антиподальные клетки имели прямоугольную форму, затем клетки вытягивались, этот процесс сопровождался вакуолизацией цитоплазмы. Крупные вакуоли появлялись уже через 45 мин после опыления (Engell, 1994). В работе (Engell, 1994) проследили за изменением размеров ядра и ядрышка. До и сразу после оплодотворения ядра антиподальных клеток были сравнимы по размеру с другими клетками зародышевого мешка. Антиподальные клетки увеличивались почти в 2 раза через 20 часов, и в 5 раз через 50 часов после опыления. Ядрышко также увеличивалось в размерах, в 2 раза к 20 часам, и в 8 раз к 50 часам после опыления. Через день после опыления ядрышки становились лопастными и в них выявлялись вакуоли. Форма ядра также менялась, через 43-50 часов после оплодотворения появлялись инвагинации ядерной оболочки. На ранних стадиях развития гетерохроматин был равномерно распределён по нуклеоплазме, позже в ядре выявляли кластеры гетерохроматина (Engell, 1994). Через 45 мин после опыления на периферии цитоплазмы антипод наблюдались крупные вакуоли. С течением времени одна-две крупных вакуоли выявлялись на каждом из концов клетки. С течением времени клетки сильно удлиняются и значительную часть цитоплазмы занимают крупное ядро и крупные вакуоли (Engell, 1994).

Клеточные стенки антипод ячменя имели рыхлую структуру. Толщина и морфология клеточных стенок антипод отличалась в зависимости от того, с какими клетками антиподы контактировали, - с антиподальной клеткой, центральной клеткой, эндоспермом, или клетками нуцеллуса. Наиболее толстые клеточные стенки наблюдали в местах контакта антипод с клетками нуцеллуса. Со временем клетки нуцеллуса погибают и антиподальные клетки контактируют уже с остатками клеток нуцеллуса. Более тонкие клеточные стенки с большим количеством плазмодесм были между контактирующими антиподами. Наименьшую толщину имели клеточные стенки антипод, контактирующих с центральной клеткой, а в последующем, с эндоспермом. Такие клеточные стенки содержали

мало плазмодесм. С течением времени, они утолщались, приобретали более регулярную структуру, количество плазмодесм увеличивалось (Engell, 1994).

Судьба отдельных органелл прослежена на ультраструктурном уровне (рис. 18, б). Многочисленные органеллы выявлялись на всех этапах развития клеток комплекса, часто между инвагинаций ядерной оболочки. Митохондрии и пластиды сферической и яйцевидной формы были схожи и их было трудно отличить друг от друга. Однако пластиды были крупнее, их матрикс темнее. Митохондрии распределялись по всей цитоплазме. В антиподальных клетках, контактирующих с клетками нуцеллуса, митохондрии в основном локализовались на периферии клеток. Форма митохондрий варьировала, от сферической до палочковидной и кольцевидной (что соответствовало, вероятно, чашеобразным митохондриям). На срезах часто встречались гантелеобразные митохондрии. При этом круглые митохондрии чаще располагались на периферии клеток, отделяющих соседние антиподальные клетки, а митохондрии иной морфологии чаще встречались по всему объему клетки. Кристы имели вид мешочков. Через несколько дней после оплодотворения (48-50 часов) число митохондрий уменьшалось. Пластиды также распределялись по всей цитоплазме, их форма варьировала от округлой до яйцевидной. Пространства тилакоидов были неравномерны по толщине, крахмальные зерна в пластидах не откладывались. Число пластид уменьшалось через 24 часа после опыления (Engell, 1994).

На всех этапах онтогенеза антиподального комплекса ячменя выявлялся ЭПР. Шероховатый ЭПР был, как правило, представлен длинными параллельными цистернами, а гладкий – концентрическими кругами. Через 68 часов после оплодотворения количество цистерн ЭПР уменьшалось, наблюдались ЭПР с расширенными цистернами. Выявлялись также многочисленные диктиосомы аппарата Гольджи, сформированные из 3-4 цистерн в форме полумесяца. Наибольшее число диктиосом располагалось вблизи ядра и в центральной области антиподальных клеток, граничащих с нуцеллярными клетками и клетками эндосперма диктиосом было больше. Через 20 часов после опыления число цистерн в составе диктиосом увеличивалось до 5-6 цистерн. Вблизи диктиосом наблюдались везикулы. Цитоплазма содержала многочисленные рибосомы, как в форме свободных полирибосом, так и в связи с шероховатым ЭПР (Engell, 1994).

### **2.3.5. Антиподальные клетки пшеницы (*Triticum aestivum* L.)**

В ранних работах (Morrison, 1954; Hoshikawa, 1960) была дана краткая характеристика антиподальных клеток пшеницы. Количество антиподальных клеток составляло 8-20 (Morrison, 1954) или до 40 (Hoshikawa, 1960) клеток, они занимали значительную часть зародышевого мешка, деления антиподальных клеток завершались еще

до оплодотворения. В антиподальных клетках выявляли крупные ядра с большими вакуолизированными ядрышками. Хромосомы состояли из многочисленных фибрилл, объединенных в пучки. На 3-5 день после опыления наблюдались признаки пикноза ядер, хроматин ядер объединялся. На 5-7 день антиподальные клетки разрушались, на 9 день после оплодотворения антиподальных клеток не наблюдалось (Morrison, 1954). В диссертации Губера (Huber, 1984) посвященной эндосперму пшеницы, приведена короткая характеристика судьбы антиподальных клеток. По мнению автора, эти клетки претерпевали ряд делений, затем принимали участие в питании формирующегося эндосперма и деградировали (Huber, 1984).

Строение антипод пшеницы было охарактеризовано в зрелом мегагаметофите (You and Jensen, 1985) (рис.19).

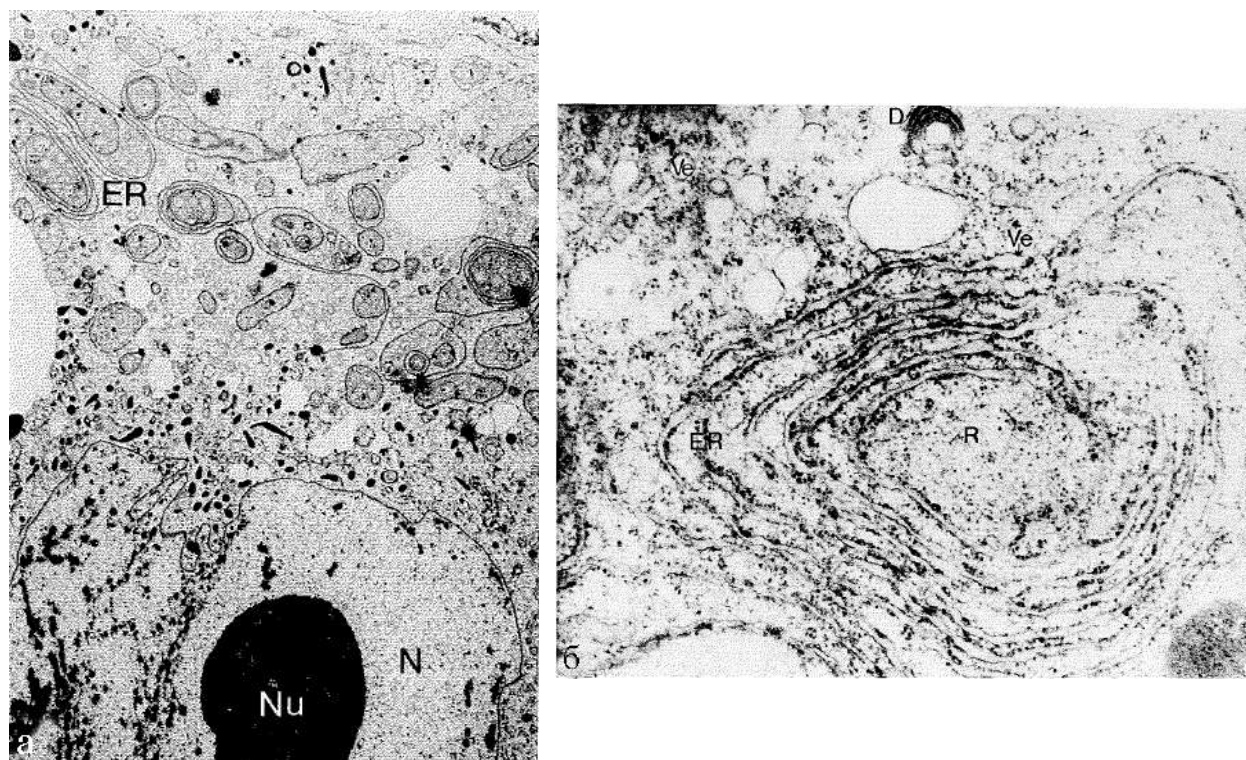


Рис. 19. Фрагмент антиподальной клетки пшеницы с лопастным ядром и ядрышком (а), ЭПР антиподальной клетке пшеницы (б) (You and Jensen, 1985).

Ядра антиподальных клеток были крупными, неправильной формы, имели инвагинации ядерной оболочки, содержали несколько ядрышек и располагались в центре клеток. В цитоплазме антиподальных клеток содержалась одна или несколько крупных вакуолей и несколько мелких. Органеллы были сконцентрированы вблизи ядерной оболочки. ЭПР был представлен либо длинными параллельными цистернами, либо концентрическими кругами. Часто концентрические круги цистерн ЭПР охватывали участки цитоплазмы с органеллами (You and Jensen, 1985). Хлоропласты в антиподальных

клетках отсутствовали (Батыгина, 1994), однако были обнаружены амилопласты (You and Jensen, 1985).

В работе Лазаревой и Ченцова (Лазарева и Ченцов, 2004) впервые было показано, что антиподальные комплексы меняются в течение развития, а антиподальные клетки в пределах одного комплекса имеют различную морфологию. Авторами было выделено три типа ядер антиподальных клеток. Первый тип клеток имел небольшие округлые ядра. В ядрах этого типа выявляли одно ядрышко, несколько миниядрышек, многочисленные, переплетающиеся фибриллы - хромонемы, индивидуальные политенные хромосомы не выявлялись. Клетки второго типа имели крупные овальные ядра с обособленными гигантскими хромосомами, теломерные участки которых веерообразно расплетались на хромонемы вблизи ядерной оболочки и от одного до четырех ядрышек и несколько миниядрышек (рис.20, а). Диски в составе политенных хромосом не выявлялись. В клетках третьего типа ядра были сильно уплощены, хромосомы агрегированы, хромонемы в составе хромосом не выявлялись. В таких ядрах ядрышки имели неправильную лопастную форму, компоненты ядрышка в виде глобул обнаруживались на периферии или в лакунах хромосом (рис.20, б). Показано, что на начальных этапах развития комплекса все ядра имели морфологию первого типа, затем в комплексе начинали преобладать клетки с ядрами второго типа и на финальных стадиях развития почти все клетки имели ядра третьего типа (Лазарева и Ченцов, 2004).

При Ag-Nor окрашивании белков ядрышка антиподальных клеток гигантские ядрышки окрашивались неравномерно. Кроме крупных ядрышек в клетках первого и второго типа выявлялись миниядрышки. Их наличие связано, вероятно, с наличием латентных ядрышковых организаторов. В клетках третьего типа кроме лопастных ядрышек в областях хромосом выявлялись множественные аргентофильные глобулы. Миниядрышки наблюдались в ядрах антиподальных клеток первого и второго типа, если в эндосперме зародышевого мешка не наблюдались митозы. Если же ядра эндосперма делились, то высеребривалась поверхность хромонем в составе политенных хромосом. Фибрилларин и белок р53 в клетках первого типа и второго типа выявлялся только в зоне ядрышек и зоне миниядрышек. В клетках третьего типа, кроме ядрышка, фибрилларин выявлялся в области хромосом, в некоторых клетках находился только в лакунах политенных хромосом (Лазарева и Ченцов, 2004).

В работе Чабан и соавторов (Чабан и др.2011) прослежен онтогенез и архитектура клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы. Особое внимание было уделено этапу пролиферации трех инициальных антиподальных клеток (рис. 21). Впервые на серии полутонких срезов прослежены последовательные митотические деления

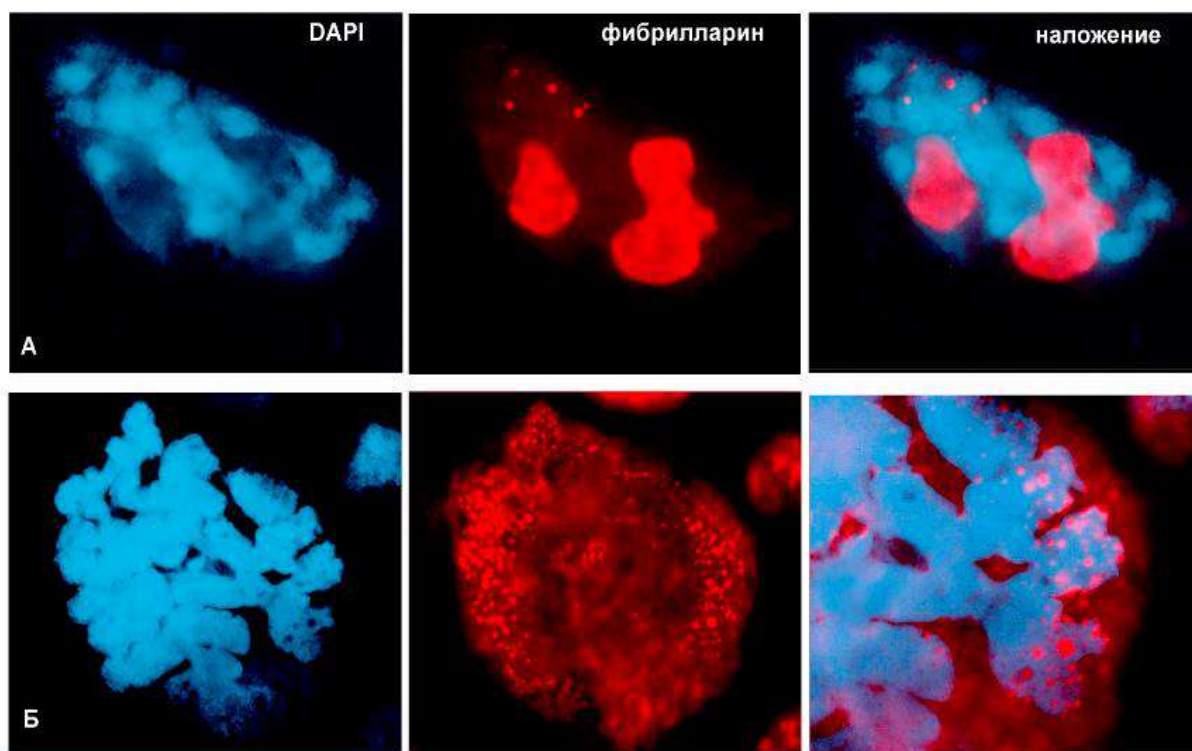


Рис. 20. Иммуноцитохимическое выявление фибрилларина в ядрах антиподальных клеток, а – ядра второго типа на средних стадиях развития комплекса, б – ядра третьего типа на финальных стадиях развития комплекса (Лазарева и Ченцов, 2004).

антиподальных клеток, приводящие к формированию трех ярусов клеток антиподального комплекса (Чабан, 2008; Чабан и др., 2011).

Было показано, что в развитии антиподального комплекса пшеницы выделяются три последовательно сменяющие друг друга этапы – пролиферации, дифференцировки и гибели. У пшеницы 3 инициальные антиподальные клетки, располагаются друг над другом в халазальной области зародышевого мешка (рис. 21, а). Нижняя базальная клетка делится первой. Оставшиеся две клетки проходят 3-4 цикла деления, при этом деления происходят асинхронно (рис. 21, б). Каждая из инициальных клеток, делясь, формирует ярус антиподального комплекса (Чабан и др., 2011).

По окончании этапа пролиферации антиподальный комплекс содержит 2 клетки в базальном ярусе, около 8 в среднем и не менее 16 клеток в апикальном ярусе. В среднем в антиподальном комплексе пшеницы выявляется 25-27 клеток, группами расположенных друг над другом (рис. 21, в). Ядра пролиферирующих антипод по размеру не отличаются от ядер клеток нуцеллуса, окружающих зародышевый мешок. Дифференцировка антиподальных клеток начинается после поворота семяпочки (рис. 21, г, д). На этапе дифференцировки комплекса происходит прогрессивный рост клеток и запускается процесс эндоредупликации. Эндоредупликация сопровождается перестройкой хроматина, что приводит к формированию гигантских политенных хромосом. В работе показана

положительная корреляция между размером антиподальных клеток и их пloidностью. Размер и содержание ДНК разных клеток в составе комплекса было неодинаковым, что позволило авторам предположить, что антиподальные клетки проходят разное число раундов эндоредупликации (Чабан и др., 2011).

Впервые подтверждена секреторная роль антиподальных клеток и

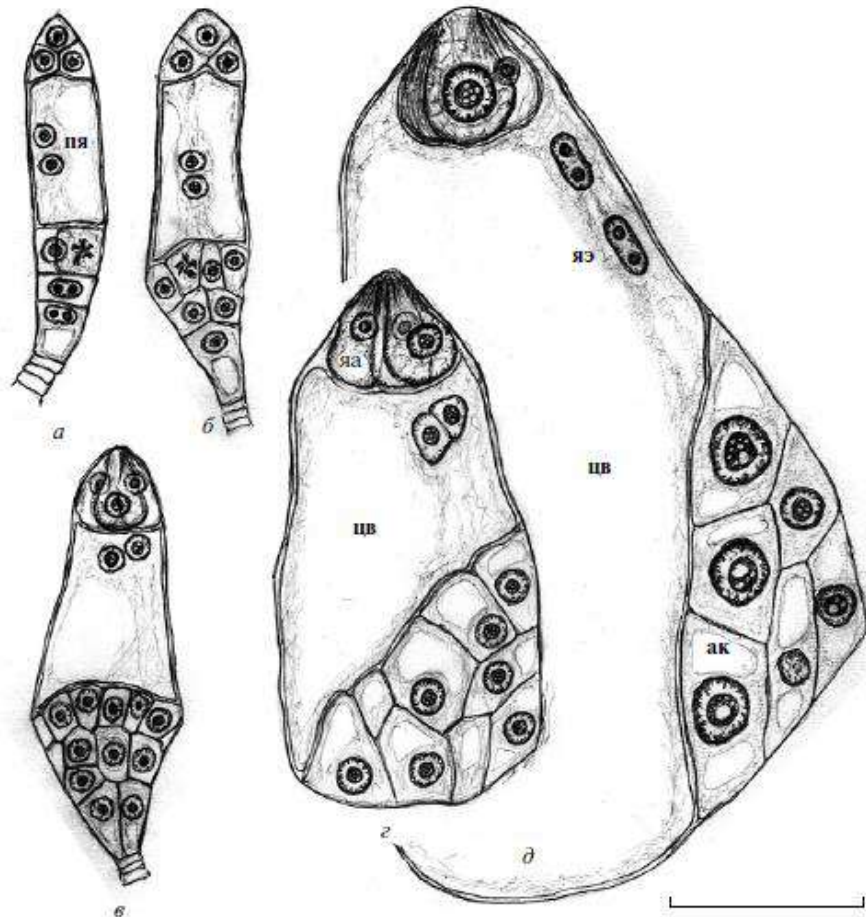


Рис. 21. Динамика развития антиподального комплекса от начала пролиферации антипод до оплодотворения зародышевого мешка и формирования зиготы.

*а, б, в, г* – зародышевые мешки до оплодотворения.

*а* – начало пролиферации инициальных антиподальных клеток;

*б, в* – этапы пролиферации антиподальных клеток, приводящие к формированию трехъярусного комплекса;

*в* – завершение процесса пролиферации, начало эндоредупликации ядер антиподальных клеток;

*г* – сформированный зародышевый мешок с полиплоидными антиподальными клетками, готовый к оплодотворению;

*д* – зародышевый мешок, с высокополиплоидными антиподальными клетками, после оплодотворения и образования зиготы (з) и первых ядер эндосперма (яэ).

На схеме: полярные ядра – пя; центральная вакуоль – цв; яйцевой аппарат – яэ. Масштаб 100 мкм. (Чабан и др., 2011).

проиллюстрирована экстррузия хроматина (рис. 22) и гранулярного компонента в цитоплазму нуклеарного эндосперма. (Чабан и др., 2011).

Некоторые особенности ультраструктуры антиподальных клеток пшеницы в ходе ПКГ описаны в работе Wei-Cheng (Wei-Cheng et al., 1988). Было показано, что на этапах гибели уменьшается отложение каллозы в клеточных стенках между антиподальными

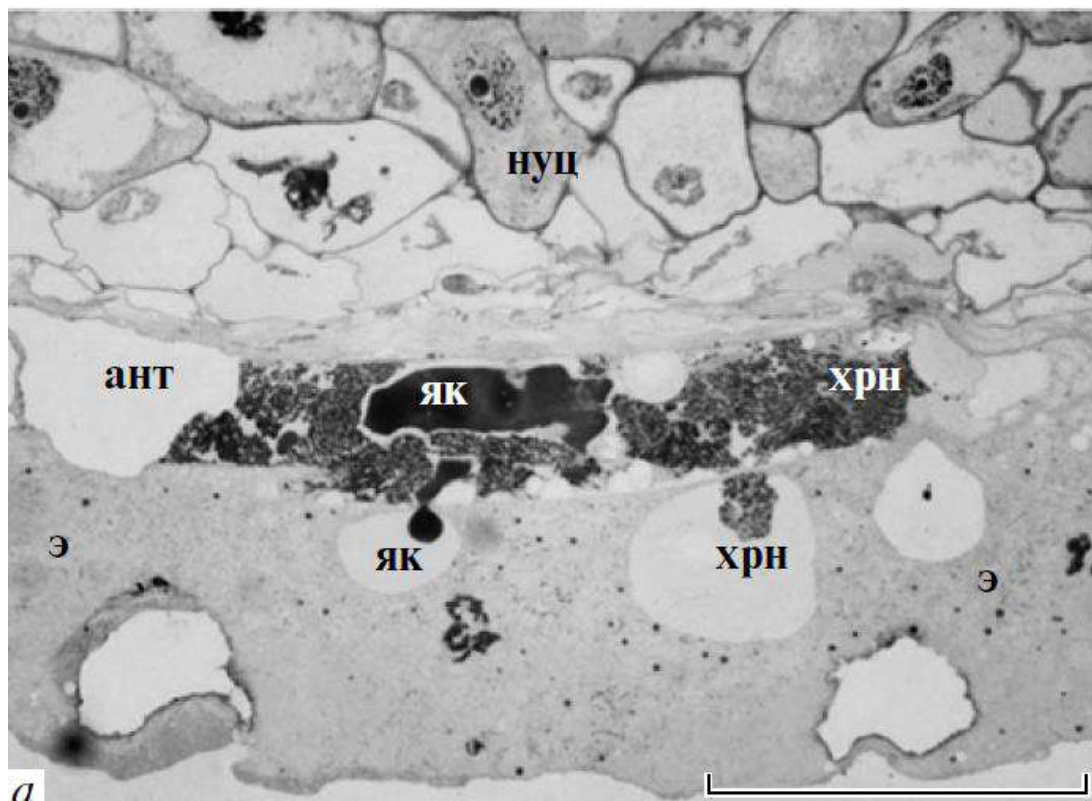


Рис. 22. Экструзия ядрышка и хроматина из клеток антипод в синцитий эндосперма. Экструзия участков хроматина (хрн) и материала ядрышка (як) из ядра антиподы (ант) в вакуоли нуклеарного эндосперма на дорсовентральном срезе семязачатка. Клетки нуцеллуса – нуц. Масштаб 20 мкм. (Чабан и др., 2011).

клетками и эндоспермом. Авторы предполагают, что разрушенные в ходе гибели фрагменты цитоплазмы антиподальных клеток мигрируют в форме макрокомплексов в эндосперм. Кроме этого, авторы показали, что в эндосперм через широкие каналы в клеточных стенках перемещаются ядерный материал, цистерны ЭПР, пластиды и митохондрии. Высказано предположение, что этот процесс может играть роль в обеспечении питания и развития эндосперма (Wei-Cheng et al., 1988).

Показано, что программа гибели антиподальных клеток происходит параллельно с целлюляризацией эндосперма. Этот процесс сопровождается конденсацией хроматина, распадом ядрышек (рис.23) и экструзией хроматина и компонентов ядрышка в цитоплазму антипод, и затем, в эндосперм. Первыми начинают разрушаться антиподы, примыкающие к халазе зародышевого мешка (Чабан, 2008). Высказано предположение, что индукторы



гибели антиподальных клеток пшеницы вырабатываются в эндосперме в процессе его целлюляризации (Чабан и др., 2011).

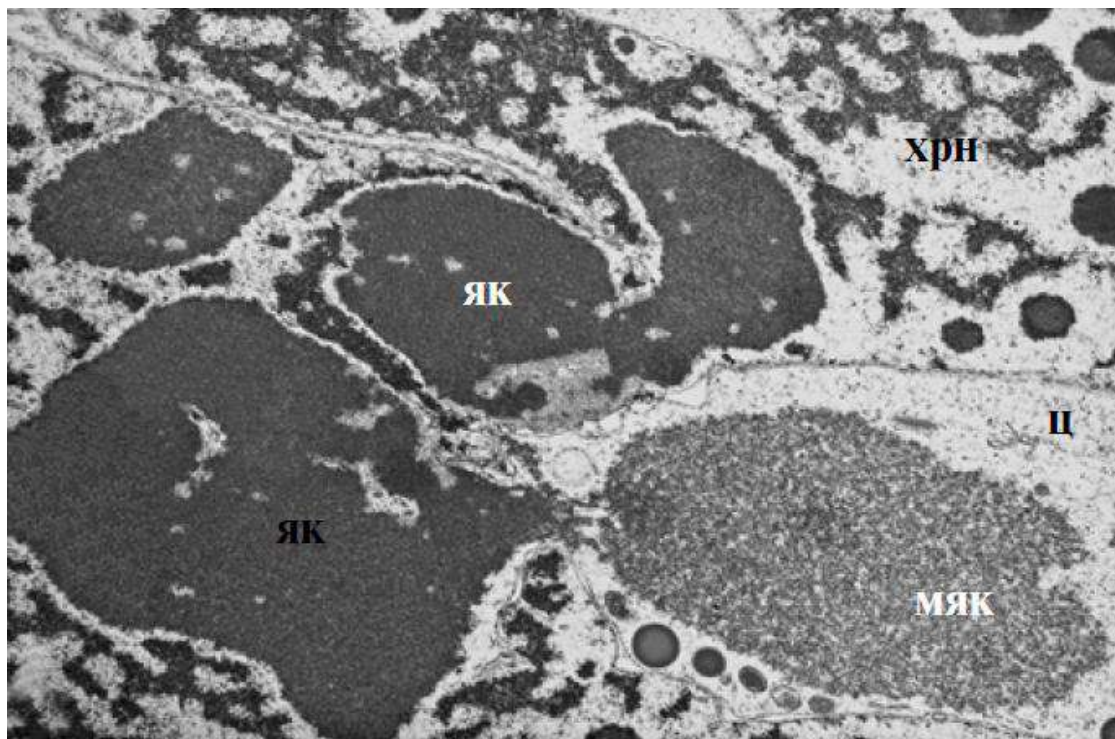


Рис. 23. Экструзия материала ядрышка из ядра в цитоплазму антиподальных клеток пшеницы. Выход части материала ядрышка (мяк) в цитоплазму(ц) антиподы, (электронная микрофотография фрагмента антиподальной клетки,  $\times 5000$ ) (Чабан и др., 2011)

В пользу предположения о ключевой роли антиподальных клеток в формировании эндосперма, и о роли эндосперма, как индуктора гибели антиподальных клеток свидетельствует анализ ультраструктуры антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков. В неоплодотворенных зародышевых мешках, выделенных из семян колоса, в котором остальные семечки были оплодотворены, не происходит формирования эндосперма, однако, выявляются полностью сформированные комплексы дифференцированных антиподальных клеток (рис.24). Каждое ядро содержит активно функционирующие гигантские политенные хромосомы, с четко визуализируемыми хроматидами и крупными ядрышками. При этом вокруг ядерной оболочки выявляются многочисленные мелкие вакуоли, а в цитоплазме – крупные вакуоли, с примыкающими мелкими вакуолями. (Чабан и др., 2011).

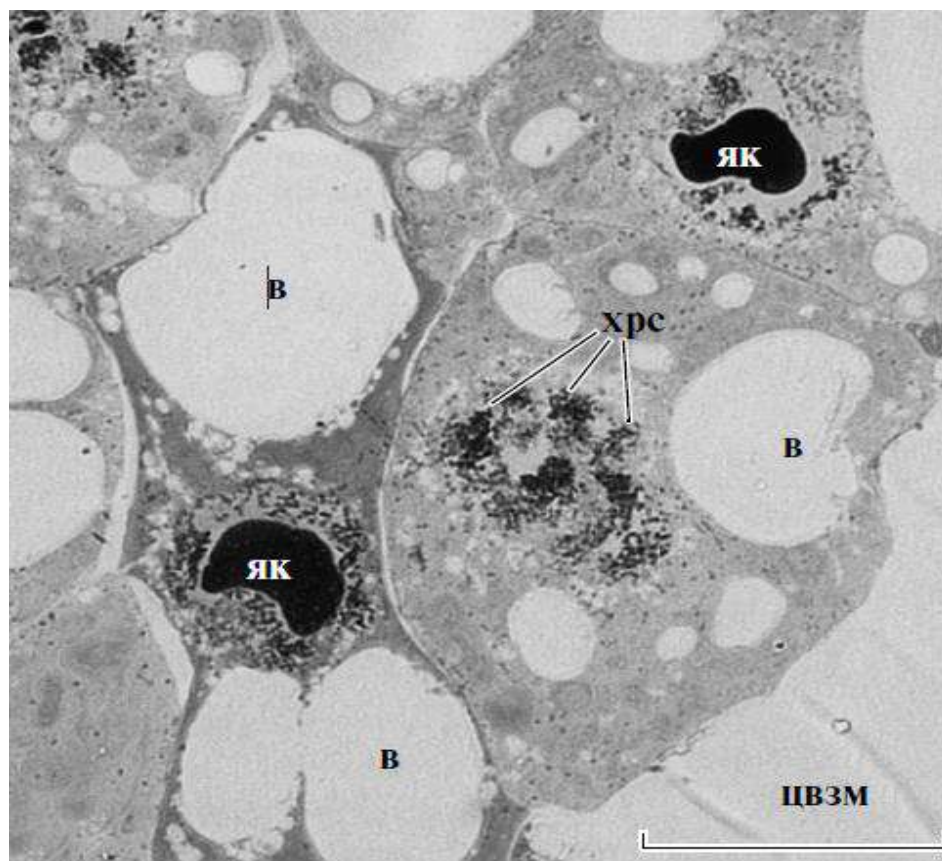


Рис. 24. Структура антипод неоплодотворенных зародышевых мешков. В ядрах клеток апикального яруса гигантские хромосомы декомпактизованы (хрс, стрелки), в цитоплазме многочисленны мелкие вакуоли локализованы вокруг ядер и крупных вакуолей, что отражает, по мнению авторов, высокую функциональную активность антиподальных клеток. Масштаб 50 мкм. (Чабан и др., 2011)

В работе (An and You, 2004) изучали окрашенные DAPI ядра антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы в процессе ПКГ (рис.25). На ранних этапах развития антиподального комплекса, форма ядер клеток была округлой. Позднее, у некоторых клеток комплекса, выявлялись ядра с изрезанным контуром, а свечение некоторых ядер было интенсивнее, чем в кластерах, находящихся на более ранних этапах развития комплекса. Авторы отмечали, что на этой стадии происходило образование клеток эндосперма (не иллюстрировано), и начинался процесс гибели антипод. Указывалось, что: «в большинстве ядер антиподального комплекса хроматин сильно конденсировался и агрегировал, в то же время, в других клетках конденсированный хроматин начинал исчезать, и лишь часть хроматина оставалась на периферии ядра» (An and You, 2004).

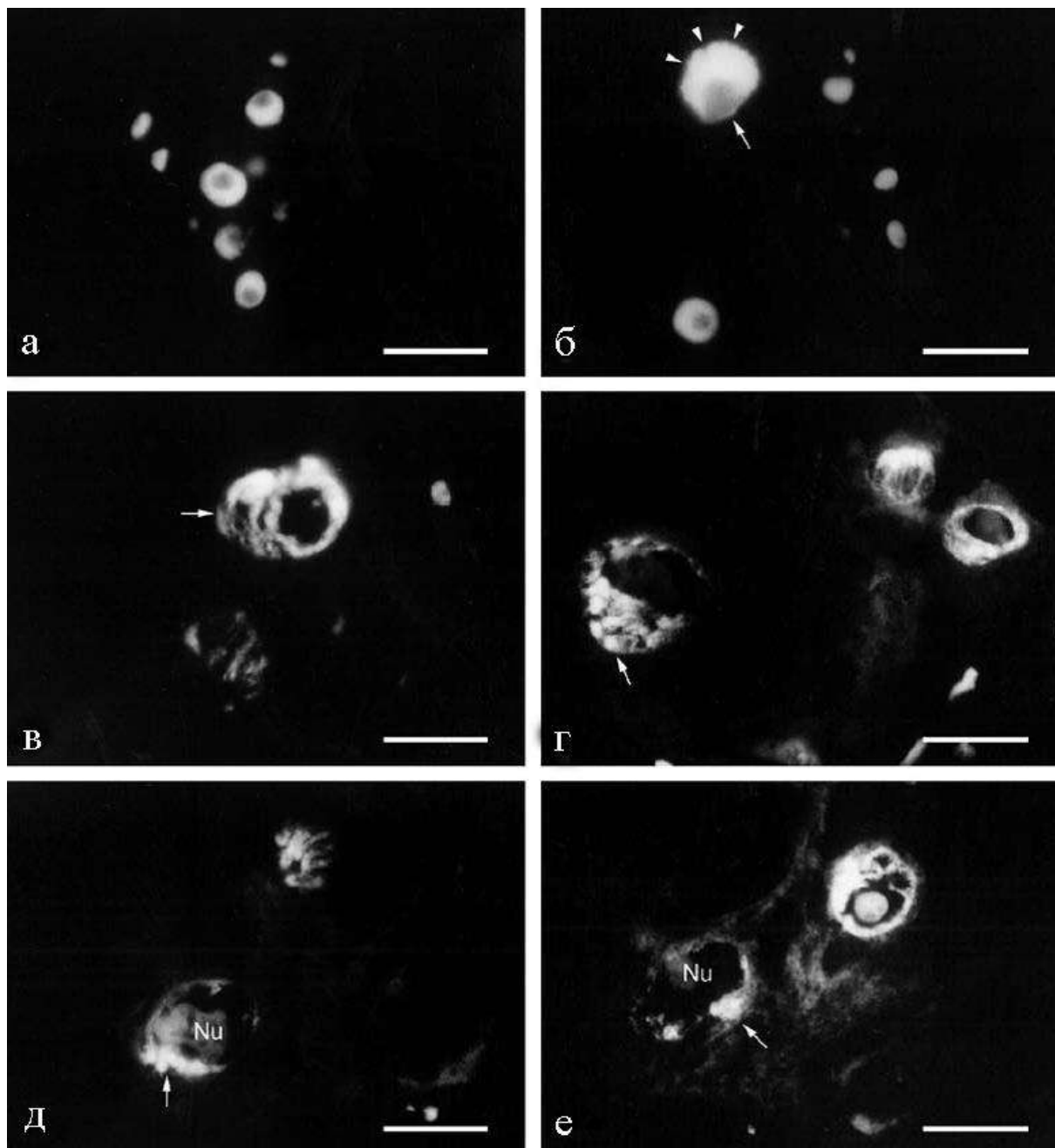


Рис. 25. Ядра антиподальных клеток пшеницы в процессе ПКГ, DAPI.  
 а – нормальные ядра, б – начало дегенерации антипод, неправильная форма ядра (стрелка), в, г – конденсированный хроматин, объединенный в компактные кластеры (стрелка), д, е - хроматин на периферии ядра (стрелки). (An and You, 2004).

## **2.4. Пути программируемой клеточной гибели растительных клеток**

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

### **2.4.1. Варианты клеточной гибели животных клеток**

Клетки, подвергшиеся воздействию экстремальных физических, химических или механических раздражителей, разрушаются неконтролируемым образом, такие варианты гибели обозначаются термином «случайная клеточная гибель» (accidental cell death, ACD). Напротив, гибель клеток может быть индуцирована генетически закодированным механизмом. На течение вариантов «регулируемой клеточной гибели» (regulated cell death, RCD) могут влиять, конкретные фармакологические или генетические вмешательства. Термин «программируемая гибель клеток» (programmed cell death, PCD) используется для обозначения случаев клеточной гибели, которые происходят как часть программы развития или для сохранения физиологического гомеостаза тканей взрослого человека (Galluzzi et al., 2015). Процессы программируемой клеточной гибели играют важную роль при формировании и обновлении тканей многоклеточных организмов, ответе на проникновение патогенов и стрессорные воздействия. ПКГ, обеспечивая элиминацию клеток и тканей, выполнивших свою функцию, является ключевым инструментом многих морфогенезов (Galluzzi et al., 2015).

Основным и наиболее изученным вариантом программируемой клеточной гибели животных является апоптоз. При апоптозе клетка расщуровывается на отдельные апоптотические тельца, поглощаемые макрофагами, поэтому воспалительная реакция не развивается. Апоптоз может быть индуцирован внешними сигналами через рецепторы смерти, либо внутренними сигналами с вовлечением митохондрий. Кроме апоптоза по внешнему (intrinsic apoptosis) и внутреннему (extrinsic apoptosis) пути у животных выделяют следующие типы программируемой клеточной гибели: некроз, зависимый от проницаемости митохондрий (MPT-driven necrosis); некроптоз (necroptosis); зависимая от аутофагии клеточная гибель (autophagy-dependent cell death, ADCD); зависимая от лизосом клеточная гибель (англ. lysosome-dependent cell death, LDCD); иммуногенная клеточная гибель (immunogenic cell death, ICD); ферроптоз (ferroptosis); пироптоз (pyroptosis); партанатоз (parthanatosis); энтоз (entosis); нетоз (NETosis) (Galluzzi et al., 2018).

### **2.4.2. Варианты клеточной гибели растительных клеток**

Программируемая клеточная гибель необходима для осуществления многих процессов и в жизни растений – ответе на абиотический и биотический стрессы, дифференцировке тканей, старении.

Несмотря на значительный прогресс методов тестирования гибнущих клеток, достигнутый в последние десятилетия, знания о морфологии и регуляции ПКГ у растений остаются ограниченными, по сравнению с хорошо изученными вариантами ПКГ у животных (Galluzzi et al., 2018).

В 2005 году был организован номенклатурный комитет по клеточной гибели (Kroemer et al., 2005). Классификация ПКГ у животных постоянно пересматривается и уточняется (Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012, 2015, 2018). Однако клеточная гибель растений комитетом не рассматривается, и общепринятой классификации ПКГ растений в настоящее время не существует.

Первые варианты классификаций ПКГ растений базировались на основании причин, вызывающих клеточную гибель. ПКГ при дифференцировке тканей (ксилемы, феллемы, отчасти флоэмы, склеренхимы, нуцеллуса, тапетума, подвеска, интегументов и др.) и процессе старения выделялась в отдельную группу ПКГ, вызванной дифференцировкой (developmental-induced programmed cell death (dPCD)) (Daneva et al., 2016). В другую группу выделяли ПКГ, индуцируемую действием различных стрессовых факторов среды, в которой произрастало растение (environmental-induced programmed cell death (ePCD)) (Maizel, 2015). Иногда во второй группе отдельно выделялась клеточная гибель, вызванная действиями патогенов (pathogen-induced programmed cell death (pPCD)). В результате анализа транскриптомов растений было показано, что в случае dPCD или ePCD экспрессируются разные гены (Olvera-Carrillo et al., 2015), следовательно, эти варианты ПКГ имеют существенные различия в молекулярных механизмах протекания. Однако данная классификация не учитывает неоднородности разных вариантов ПКГ, включенных в одну группу.

На основании морфологических характеристик были предложены две категории ПКГ у растений (рис.26 а, б): вакуолярная клеточная гибель, сопровождающаяся аутолизом содержимого клетки («аутолитическая» ПКГ, рис. 26, а) и программируемый некроз («неаутолитическая ПКГ», рис. 26, б), сопровождающийся сжатием протопласта, отхождением протопласта от клеточной стенки и деградацией органелл (Van Doorn et al., 2011; Van Doorn, 2011). Некоторые варианты клеточной гибели растений сочетают в себе черты как «аутолитической», так и «неаутолитической» гибели (Van Doorn et al., 2011).

Частью физиологических процессов здорового организма у растений, как и у животных, является формирование аутофагосом для селективной деградации органелл. Аутофагосомы формируются и в ходе вакуолярной клеточной гибели у растений (Üstün et al., 2017, Wang et al., 2018). Была описана митофагия – деградация митохондрий; хлорофагия – деградация хлоропластов или частей хлоропластов (РУБИСКО –

рибулозобисфосфаткарбоксилаза-содержащих телец); пексофагия – деградация пероксисом; ретикулофагия – деградация фрагментов эндоплазматического ретикулаума (ЭПР); протеафагия – деградация протеасом, агрефагия – деградация убиквитинированных агрегатов белков и ксенофагия – деградация вирусных частиц (Üstün et al., 2017). При макроаутофагии происходит формирование мембраны аутофагосомы, которая окружает клеточный материал, обреченный на деградацию. Предполагается, источником мембран для аутофагосом является ЭПР (Zhuang et al., 2017). Аутофагосома транспортируется к литической вакуоли и сливается с ней, и там происходит окончательная деградация клеточного материала (Hofius et al., 2011). Как и у животных, у растений в регуляцию аутофагии вовлечены ATG-гены (autophagy-related genes) (Hofius et al., 2011). При индукции вакуолярной клеточной гибели происходит формирование большого количества аутофагосом, впоследствии сливающихся с вакуолью (Minina et al., 2013). На финальных этапах происходит разрыв тонопласта и деградация всего протопласта с органеллами, а иногда и клеточной стенки (Van Doorn et al., 2011). Необходимо отметить, что у животных аутофагия выделена в отдельный вид клеточной гибели (Galluzzi et al., 2018). Некоторые авторы называют вакуолярную клеточную гибель у растений аутофагической. Термин «вакуолярная клеточная гибель» употребляется значительно чаще, чем «аутофагическая гибель», однако нельзя исключить, что этот вариант гибели (или какая-то часть случаев, относимых сейчас к этому варианту ПКГ) являются аналогом аутофагической гибели у животных (рис. 27).

При неаутолитической клеточной гибели («программируемом некрозе» по классификации Van Doorn (Van Doorn et al., 2011) плазматическая мембрана разрывается и отходит от клеточной стенки, протопласт сжимается (Reare and McCabe, 2008, Kasprzyk et al., 2011). При этом происходит значительная конденсация хроматина, фрагментация ДНК, расширение цистерн ЭПР и выход цитохрома с из митохондрий (Reare and McCabe, 2008). Reare и McCabe выступили с критикой предложенного Van Doorn термина «программируемый некроз». По их мнению, некроз кроме разрыва мембран сопровождается набуханием органелл и клетки, вакуолизацией цитоплазмы, а вариант гибели, описанный Van Doorn, характеризуется, напротив, сжатием протопласта и его отхождением от клеточной стенки, а также выходом цитохрома с из митохондрий, что роднит этот тип гибели с апоптозом. Поэтому ими был предложен термин «апоптоз-подобная гибель» вместо термина «программируемый некроз» (Reare and McCabe, 2013).

Общепринятой классификации ПКГ растений в настоящее время не создано. В этой ситуации многие авторы даже не пытаются отнести конкретные варианты к определенному

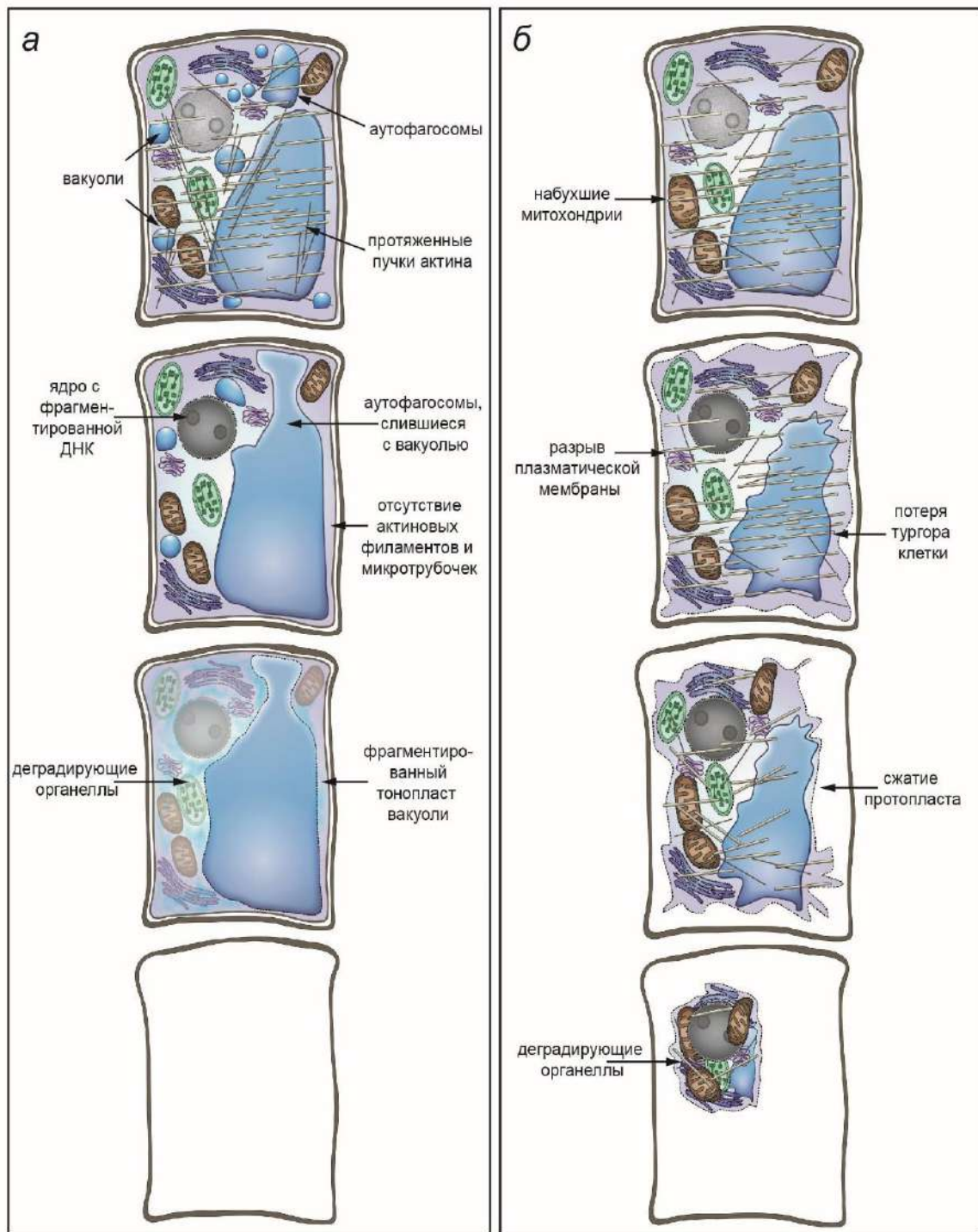


Рис. 26. Строение клеток растений в процессе программируемой клеточной гибели. а – вакуолярная клеточная гибель (Van Doorn et al., 2011) или аутолитическая клеточная гибель (Van Doorn, 2011). В клетках наблюдается интенсивная вакуолизация цитоплазмы, формирование аутофагосом, сливающихся с литической вакуолью, формирование длинных тяжей актиновых филаментов. Затем микротрубочки и актиновые филаменты деполимеризуются, происходит фрагментация ДНК, разрыв тонопласта вакуоли приводит к деградации органелл. б – программируемый некроз (Van Doorn et al., 2011), или неавтолитическая клеточная гибель (Van Doorn, 2011), или апоптоз-подобная гибель (Reare, McCabe, 2013). В клетках происходит набухание митохондрий, разрыв плазматической мембраны, фрагментация ДНК. Клетка теряет тургор, протопласт отходит от клеточной стенки и сжимается, органеллы деградируют. (Доронина и др., 2019)

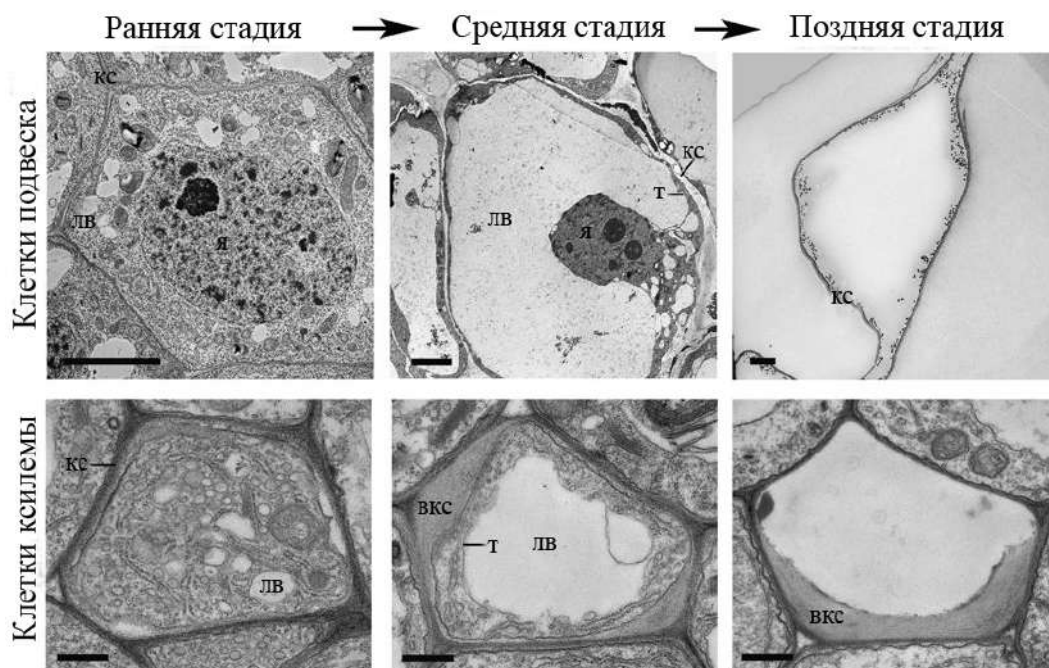


Рис. 27. Вакуолярная клеточная гибель (адапт. Из Van Doorn et al., 2011). Гибель клеток подвеска *Picea abies* (масштаб 5  $\mu\text{m}$ ) и клеток ксилемы *Arabidopsis thaliana* (масштаб 500 нм). вкс – вторичная клеточная стенка, кс – клеточная стенка, лв – литическая вакуоль, т-тонопласт.

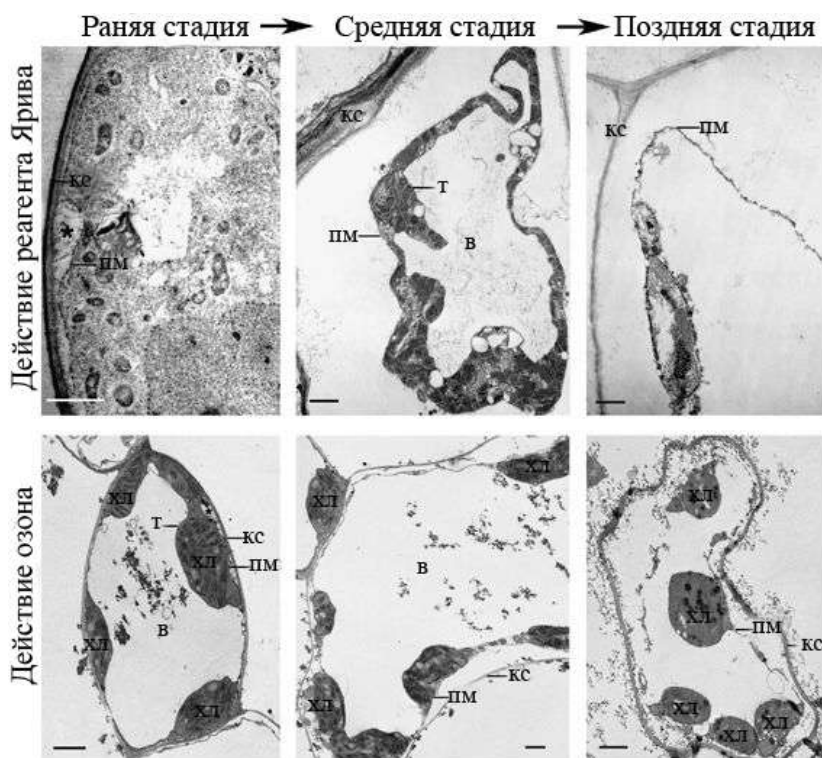


Рис.28. Программируемый некроз по классификации van Doorn, апоптоз-подобная гибель по классификации Reap and McCabe (адапт. из Van Doorn et al., 2011). Гибель клеток культуры *Arabidopsis thaliana* под действием реагента Ярива (бензилглюкозид) и при действии озона (масштаб 2  $\mu\text{m}$ ). в – вакуоль, кс – клеточная стенка, пм – плазматическая мембрана, т – тонопласт.



типу ПКГ, ограничиваясь описанием и анализом происходящих морфологических и биохимических событий.

ПКГ играет ключевую роль в выполнении программ развития и дифференцировки тканей и органов растения, такие случаи ПКГ выделяются в гетерогенную группу – developmental-induced cell death (Daneva и др., 2016). Именно с этим путём ПКГ связано развитие и формирование семени растений, так как судьба тканей семени строго детерминирована.

#### **2.4.3. Ферменты и гормоны – участники этапов ПКГ растений**

В процессе ПКГ растений в ядрах клеток гибнущих тканей обнаружены разрывы ДНК, при этом никогда не были выявлены апоптотические тельца, что не соответствует процессам пути классического апоптоза животных клеток. У растений нет цистеиновых протеаз – каспаз, принимающих участие в апоптозе животных клеток, а в гибели клетки участвуют другие цистеиновые протеазы – метакаспазы и сериновые протеазы - фитаспазы (Sueldo and Hoorn, 2017; Buono et al., 2019; Valandro et al., 2020).

Цистеиновые протеазы метакаспазы, обнаруженные у растений, родственны каспазам и имеют ряд схожих с ними черт. Они синтезируются в виде неактивного предшественника и локализуются в цитоплазме (Tsiatsiani et al., 2011), при активации ПКГ подвергаются автокаталитическому процессингу и созреванию (Vercammen et al., 2004). Но в отличие от каспаз, расщепляющих субстрат после аспарагиновой кислоты, расщепление субстратов метакаспазами происходит после аминокислотных остатков аргинина и лизина. (Tsiatsiani, 2011; Vonneau et al., 2008; Фомичева, 2012; Escamez et al., 2016). Группа метакаспаз подразделяется на два подкласса – I – метакаспазы, имеющие N-терминальный богатый пролином конец и II – метакаспазы, этого домена не имеющие (Tsiatsiani et al., 2011).

Цистеиновой протеиназой является также специфическая для растений протеаза VPE (vacuolar processing enzyme). VPE содержится в вакуоли и высвобождается в процессе вакуолярной клеточной гибели (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011; Shimada et al., 2018). VPE имеет биохимическую активность, схожую с активностью каспазы-1 животных клеток, расщепляя сходные субстраты и принимая участие в широком спектре вариантов клеточной гибели, включая ответы на окислительный, тепловой и солевой стресс, устойчивость к патогенам, развитие цветка и старение (Hatsugai et al., 2015).

В клетках растений присутствуют протеазы с аспартатной субстратной специфичностью, расщепляющие субстраты каспаз (Chichkova et al., 2012), но являющиеся не цистеиновыми, а сериновыми протеазами из группы субтилиин-подобных протеаз

(Zamyatnin, 2015). Фитаспазы вырабатываются в клетке конститутивно, зрелые фитаспазы выводятся из цитоплазмы здоровых клеток в апопласт, затем повторно вводятся в клетку при индукции ПКГ (рис.29) (Vartapetian et al., 2011; Фомичева, 2012; Chichkova et al., 2012, Фомичева, 2012).

В клетках растений присутствует также широкий спектр других менее изученных

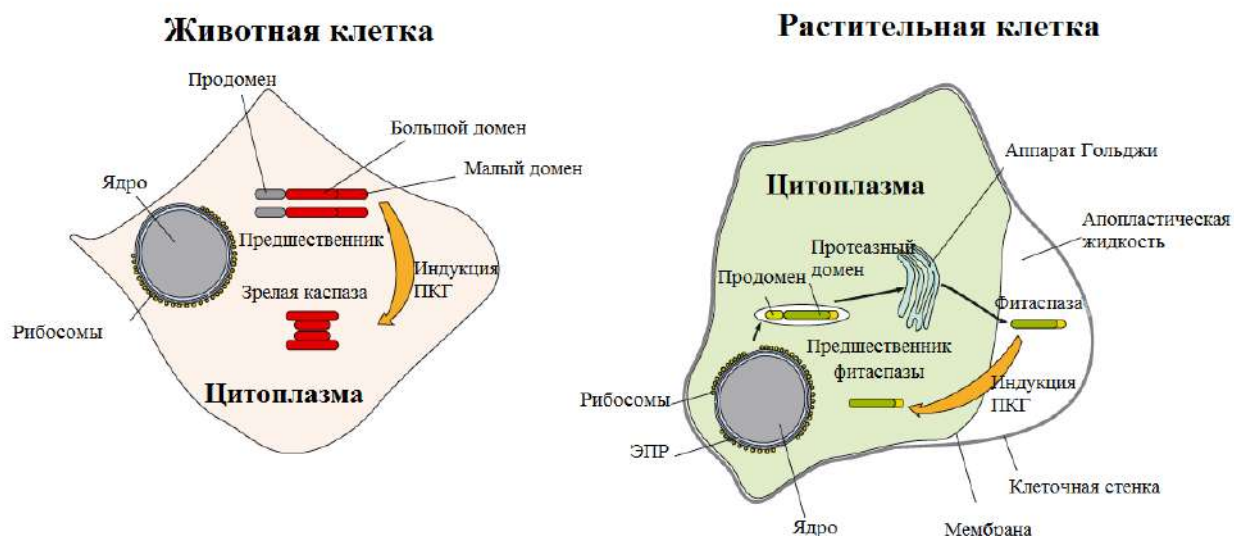


Рис. 29. Пути активации каспаз и фитаспаз после индукции ПКГ (адаптировано из Chichkova et al, 2012).

протеаз - CEP1- подобными протеазы, RD19A, RD21A, ХВСР3 и ХСР2-подобные протеазы, СТВ3 (CathB) и SAG12-подобными протеазы и др. (рис.30) (Zamyatnin, 2015).

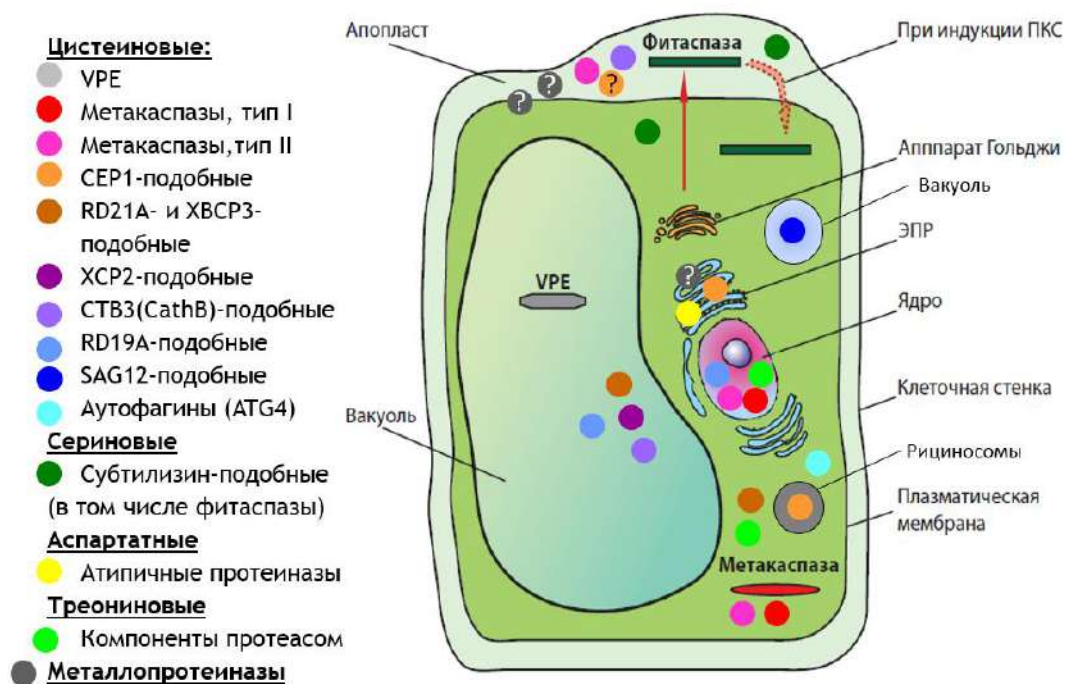


Рис. 30. Локализация протеаз растительной клетки (по Фомичевой, 2012 с изм. и доп.)

Важными регуляторами ПКГ у растений являются растительные гормоны. Салициловая кислота (Khan et al., 2015; Mammarella et al., 2015), абсцизовая кислота, жасмоновая кислота и этилен (Kazan, 2017) участвуют в клеточной гибели, обусловленной проникновением патогена, старением или гибели клеток в результате формирования устойчивости к абиотическим стрессам. Действие одного гормона может подавлять или активировать действие другого (O'donnell et al., 2001; Tuominen et al., 2004). Существует несколько петель регуляции, которые могут быть различными на разных этапах протекания клеточной гибели (Overmyer et al., 2003).

Таким образом морфологические признаки и регуляторы ПКГ у растений и животных сильно отличаются.

Для развития и формирования семени необходимы пролиферация и дифференцировка клеток новых тканей, а также упорядоченная их деграция в результате процесса программируемой гибели клеток (PCD). ПКГ тканей семени происходит в строго определённой временной последовательности, убирая выполнившие своё предназначение структуры и координируя потоки питательных веществ между различными тканями семян. Развитие семени начинается с оплодотворения и завершается образованием зрелых семян. На ранних стадиях развития семени, после двойного оплодотворения материнские ткани, такие как нуцеллус, околоплодник и ядерные проекции, подвергаются дегенерации с помощью ПКГ, что позволяет мобилизовать их клеточное содержимое для питания новых тканей, таких как зародыш, комплекс антиподальных клеток и сначала неклеточный синцитий, затем клеточный эндосперм (An, You, 2004; Radchuk et al., 2009; Domínguez and Sejudo, 2014;). Поэтому ткани семени злаков являются модельными системами для изучения процессов ПКГ у растений.

Морфология антиподальных клеток злаков при ПКГ мало изучена. Так, у *Hordeum vulgare* и *Oryza sativa* при гибели ядерная оболочка формирует инвагинации, хроматин агрегирует (Engell, 1994, Maeda and Miyake, 1996). У гибнущих антиподальных клеток пшеницы наблюдается уплотнение хроматина, уплощение ядер, разрывы ДНК, выявляемые методом TUNEL (Чабан и др., 2011). Предполагается, что индуктором ПКГ антиподальных клеток злаков является целлюляризация ценоцита эндосперма (Чабан и др., 2011; Доронина и др., 2019; Doronina and Lazareva, 2021). Однако, в современной литературе отсутствуют какие-либо биохимические характеристики ПКГ антиподальных клеток злаков.

Описаны некоторые аспекты регуляции гибели антиподальных клеток *Arabidopsis*, погибающих до опыления (Heydlauff and Groß-Hardt, 2014). Показано, что у нокаутных мутантов по генам факторов сплайсинга м-РНК LACHESIS, CLOTNO и ATROPOS антиподальные клетки *Arabidopsis* локализованы в центре зародышевого мешка, их мембраны и ядра объединены, образовавшаяся клетка сходна с центральной клеткой (Heydlauff and Groß-Hardt, 2014). Предполагается, что белок GCD1 (GAMETE CELL DEFECTIVE 1) и тРНК-синтаза SYCO ARATH (кодируемая геном *FIONA*) митохондрий центральной клетки способствуют созреванию яйцеклетки и гибели антиподальных клеток, т.к. у мутантов по генам *FIONA* и *GCD1* антиподальные клетки выживают (рис.31) (Kagi et al., 2010). Экспрессия митохондриального белка aac2A199D в яйцеклетке вызывает гибель антиподальных клеток, а его экспрессия в центральной клетке предотвращает их гибель (Wu et al., 2012). Показано, что у трансгенных растений *Arabidopsis* с повышенной

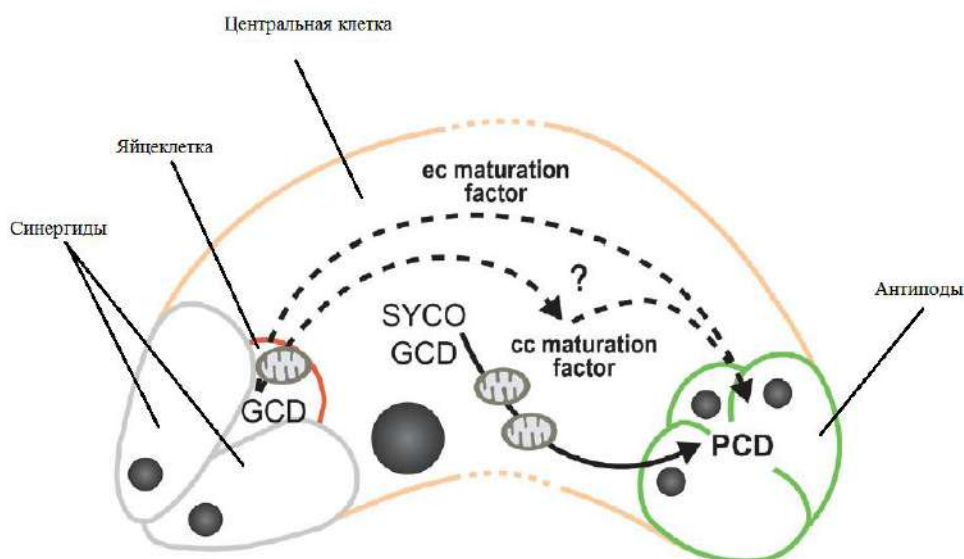


Рис. 31. Участники регуляции гибели антиподальных клеток у *Arabidopsis thaliana*. Белок GCD1 (GAMETE CELL DEFECTIVE 1) и тРНК-синтаза SYCO ARATH (кодируемая геном *FIONA*) митохондрий центральной клетки способствуют созреванию яйцеклетки и гибели антиподальных клеток. (Heydlauff and Groß-hardt, 2014)

экспрессией гена биосинтеза ауксина *YUC* клеточная гибель антиподальных клеток не наступает. Поэтому предполагается, что синтез ауксинов препятствует гибели антиподальных клеток у *Arabidopsis* (Pagnussat et al., 2009). До сих пор не показано участие протеаз в ПКГ антиподальных клеток.

В процессе формирования семени клетки, структуры и ткани последовательно сменяют друг друга, при этом одни обеспечивают функционирование других. Например, у растений с хорошо развитым подвеском он осуществляет поддержку и питание зародыша,

антиподальные клетки злаков обеспечивают существование и правильное формирование эндосперма, который аккумулирует питательные вещества для последующего развития зародыша. При созревании семени ПКГ является инструментом удаления ненужных клеток и тканей, освобождая пространство и, вероятно, обеспечивая доступность питательных веществ для формирования новых тканей. Биохимические характеристики гибели антиподальных клеток культурных злаков, подвеска и эндосперма большинства покрытосеменных растений необходимы для понимания механизмов формирования семени.

К сожалению, многие аспекты ПКГ клеточных типов зародышевого мешка и семени до сих пор остаются неизученными. Недостаточно изучены молекулярные механизмы ПКГ. Выявлены отдельные белки-регуляторы процессов ПКГ, однако сигнальные каскады, участниками которых являются эти белки, остаются неизвестными.

Отрывочны данные о функционировании протеаз, регулирующих ПКГ. Не известно, участвуют ли протеазы в ПКГ мегаспор, синергид и антиподальных клеток. Сигнальные каскады, приводящие к активации изученных протеаз, до сих пор не выяснены. Известна субстратная специфичность протеаз, принимающих участие в ПКГ, тем не менее в большинстве случаев деградомы (природные субстраты) метакаспаз, фитаспаз и других протеаз растений до сих пор не определены.

## 2.5. Заключение

1. Политенные хромосомы являются специализированным типом интерфазных хромосом, формирующимися в клетках, выполняющих синтетическую и секреторную функцию. Структура политенных хромосом клеток животных и клеток растений различается. Политенные хромосомы растений устроены неклассическим образом – они не имеют картины дисков и соматической конъюгации между гомологичными хромосомами. Антиподальные клетки являются примером растительных клеток с политенными хромосомами.
2. Антиподальные клетки располагаются в зародышевом мешке и до двойного оплодотворения формируют сложный трехрусный комплекс. После двойного оплодотворения антиподальные клетки питают эндосперм на стадии ценоцита. Целлюляризация эндосперма запускает программируемую клеточную гибель антиподальных клеток.
3. Программируемая клеточная гибель растений отличается от программируемой клеточной гибели животных. У растений отсутствует классический апоптоз, но выделяется два варианта клеточной гибели – аутолитическая (вакуолярная) и неаутолитическая (апоптоз-подобная и программируемый некроз). В зависимости от причин, вызывающих клеточную гибель, выявляются клеточная гибель, обусловленная дифференцировкой клеток (dPCD) и клеточная гибель, вызванная факторами окружающей среды (ePCD). Гибель антиподальных клеток является примером dPCD.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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

#### 3.1. Объект исследования, взятие материала и фиксация

##### 3.1.1. Объект исследования

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

##### 3.1.2. 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 (рис. 1).

##### 3.1.3. 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 MgSO<sub>4</sub>) (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 0,1М фосфатном буфере Зоренсена (pH=7,3) с добавлением сахарозы (0,015г/мл) (Sigma).

Фиксация проводилась в течение 2 часов.

##### 3.1.4. Приготовление тотального препарата

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

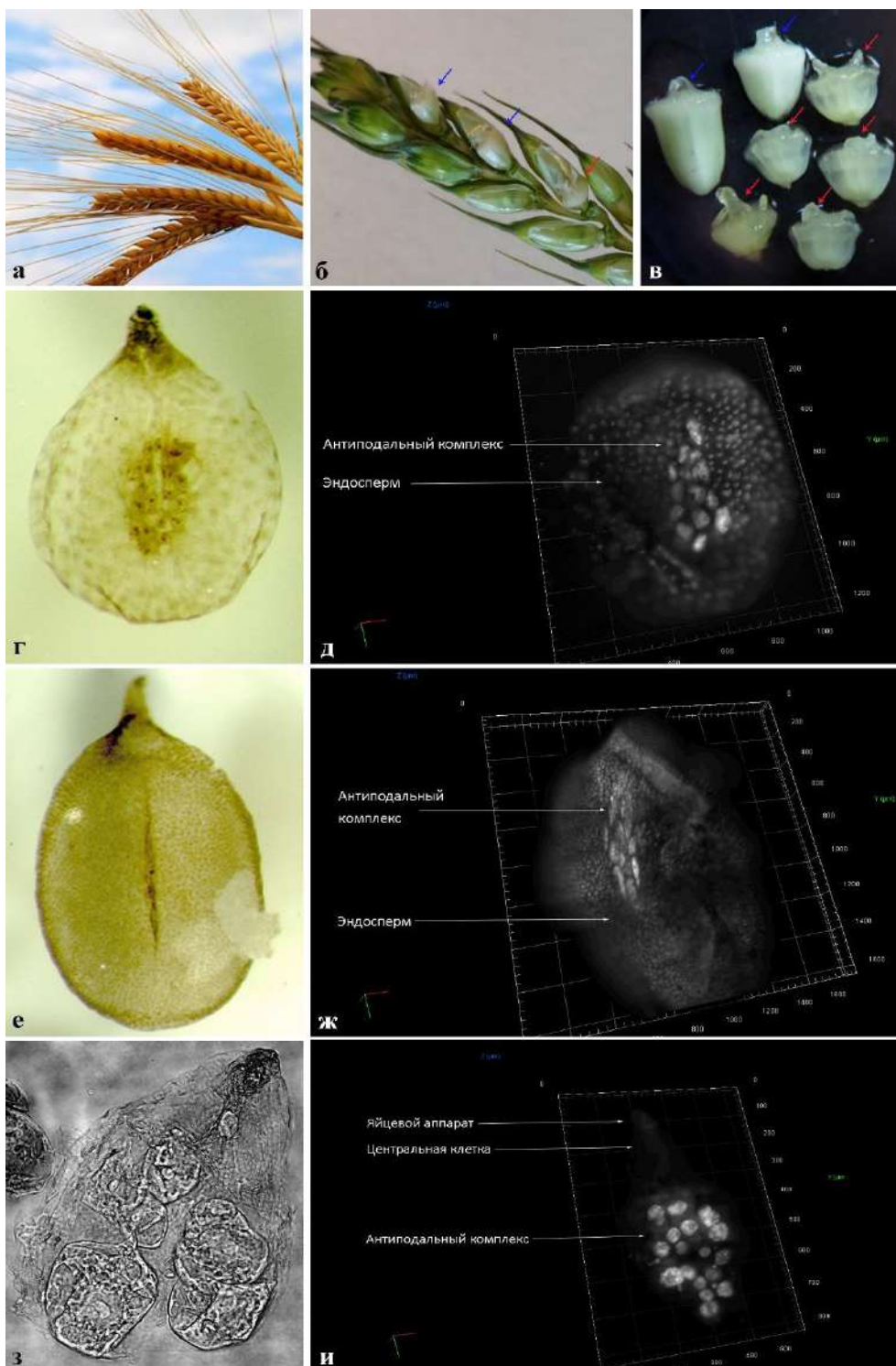


Рис.32. Объект исследования. а – общий вид растений *Triticum aestivum*; б, в – выделенные семечки в чашке Петри; оплодотворенные семечки (синие стрелки), неоплодотворенные (красные стрелки); г – тотальный препарат оплодотворенного зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки антипод (масштаб 300 мкм); д - тотальный препарат зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки антипод, пропидий иодид, light-sheet микроскопия; е – тотальный препарат оплодотворенного зародышевого мешка пшеницы на стадии гибели антипод (масштаб 300 мкм); ж – тотальный препарат оплодотворенного зародышевого мешка пшеницы на стадии гибели антипод, пропидий иодид, light-sheet микроскопия; з - тотальный препарат неоплодотворенного зародышевого мешка пшеницы, фазовый контраст (масштаб 100 мкм); и – тотальный препарат неоплодотворенного зародышевого мешка пшеницы, пропидий иодид, light-sheet микроскопия.





Рис. 33. Иллюстрация метода по периодизации развития клеток антиподального комплекса пшеницы.

а – материнские растения, б – материнские растения с удаленными верхними и нижними колосками и удаленными центральными цветками, в – материнские растения с отрезанными остями и верхними частями колосковых чешуй, г – цветок материнского растения, содержащий тычинки (т) и пестики (п), д – кастрированные материнские растения, содержащие только пестики (п), е – материнские растения под изоляторами, ж – тычинки с отцовскими растениями, з – материнские и отцовские растения под изоляторами.

### **3.1.5. Периодизация развития антиподальных клеток**

В качестве материнских растений (рис. 33) выбирали растения, только вышедшие из влагалища листа с еще зелеными пыльниками и нераспушившимися рыльцами. В процессе подготовки к кастрации с материнских растений пшеницы удаляли верхние и нижние слабо развитые колоски, у оставшихся пинцетом удаляли центральные цветки и оставляли два боковых цветка, ости и верхние части колосковых чешуй обрезали. Тычинки цветков удаляли пинцетом, оставляли только пестики. Материнские растения помещали под изоляторы, соломины колосьев, помещенных под изоляторы в нижней части стебля, обматывали ватой и завязывали суровой ниткой. Для гибридизации использовали ограниченно свободное опыление. Рядом с материнскими растениями укрепляли тычины с пробирками для гибридизации. Затем отбирали колосья отцовской формы, у которых начали цвести один-два цветка, из расчета два отцовских растения на одно материнское. Колосья отцовской формы срезали, обрезали ости и верхние части колосковых чешуй. В пробирки для гибридизации ставили срезанные отцовские растения, размещая их на половину колоса выше материнских растений, и помещали их вместе с материнскими под общий изолятор для гибридизации. Соломины колосьев, помещенных под изоляторы в нижней части стеблей, обматывали ватой и завязывали суровой ниткой.

После гибридизации фиксировали следующие точки – 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 дней после опыления.

## **3.2. Световая микроскопия: пробоподготовка, получение и анализ изображений**

### **3.2.1. Окрашивание ДНК ядер DAPI**

Для изучения структуры ядер антиподальных клеток, ДНК окрашивали в течение 5 минут в 0,05% водном растворе флуорохрома DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) в разведении 1 мкл на 1 мл, отмывали и заключали в Мовиол (Mowiol U 44, Hoechst, Германия).

Окрашенные клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы Plan Apo  $\times 20$  и  $\times 63$ . Изображения записывались с помощью цифровой камеры AxioCam HRm.

### **3.2.2. Определение количества ДНК ядер антиподальных клеток в программе ImageJ**

Цитофотометрию количества ДНК ядер антипод проводили на препаратах, окрашенных реактивом Шиффа по Фельгену на спектрофотометре SMP-20 (Opton,

Германия) с использованием зонда 2,5, при увеличении объектива x10, окуляра x10 и при освещении 2В. В качестве контроля были выбраны триплоидные клетки эндосперма (одно из ядер телофазной клетки). Окрашенные по Фельгену ядра изучали с помощью светового микроскопа Olympus BX50 (рис. 34, б).

Количество ДНК ядер антиподальных клеток оценивали на снимках ядер антиподальных комплексов, окрашенных DAPI (на ув. ×20) в программе ImageJ. После вычитания фона («Tresholding»), выделяли индивидуальные ядра кластера («Analyse particles») и определяли показатель интенсивности свечения каждого ядра «Integrated Optical Density». В качестве репера плоидности на тех же снимках выбраны ядра триплоидных клеток эндосперма (рис. 34, а).

Данные по содержанию ДНК представлялись в виде столбчатых гистограмм, для определения размера кармана гистограммы была использована формула Фридмана-Диакониса.

Определение содержания обоими методами показывало аналогичные результаты, поэтому для сбора статистических данных в дальнейшей использовался только метод определения содержания ДНК с помощью программы ImageJ.

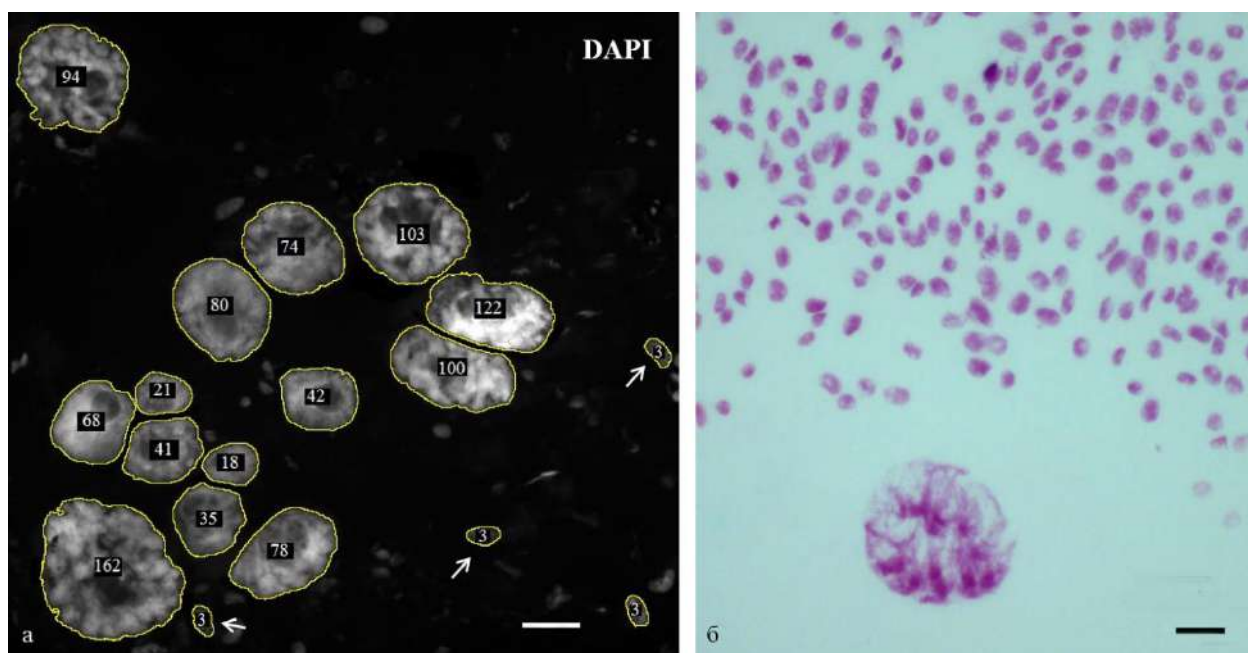


Рис. 34. а. Ядра антиподальных клеток ДНК, окрашенные DAPI. Снимок использовался для оценки количества ДНК в программе ImageJ. Цифрами указано количество С в каждом ядре. Ядра клеток эндосперма (стрелки). б. Ядра, окрашенные по методу Фельгена для последующего проведения цитофотометрии

### **3.2.3. Определение площади и округлости ядер антиподальных клеток в программе Image J**

Площадь и округлость ядер антиподальных клеток оценивали на снимках ядер антиподальных комплексов, окрашенных DAPI (на ув.  $\times 20$ ) в программе ImageJ. На снимках выделяли индивидуальные ядра кластера («Analyse particles») и определяли показатель площади («Area») и округлости («Circularity»). Данные площади ядер представлялись в виде столбчатых гистограмм, для определения размера кармана гистограммы была использована формула Фридмана-Диакониса, данные по округлости ядер – в виде диаграммы размаха.

### **3.2.4. 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.

Клетки изучали с помощью светового микроскопа Leica DM 1000 с объективами Nant  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ .

### **3.2.5. Выявление разрывов в ДНК по методу TUNEL**

Для выявления разрывов в ДНК по методу TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) тотальные препараты зародышевых мешков пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 (Molecular Probs, UK) на PBS (Эко Сервис, Россия) в течение 30 мин, затем, после двукратной отмывки буфером, 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, помещая зародышевые мешки в раствор 2 $\times$ SSC на 15 мин. После двукратной отмывки буфером препараты заключали в Mowiol.

Клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы Plan Apo  $\times 20$  и  $\times 63$ . Изображения записывали с помощью цифровой камеры AxioCam HRm.

### **3.2.6. Ag-NOR окрашивание аргентофильных белков ядрышка по методу Howell and Black, 1980**

Выделенные из семяпочек, фиксированных в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 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 по 10 мин в каждой смене и помещали в каплю красящей смеси.

Для приготовления красящей смеси к 2 частям 50% AgNO<sub>3</sub> добавляли 1 часть 2% желатины, содержащей 1% муравьиной кислоты (по объему), достигая pH=3.

Окрашивание проводили во влажной камере при 37°C до приобретения красящей смесью темно-коричневого цвета. Препараты промывали в 5 сменах деионизованной воды и заключали в Mowiol.

Клетки изучали с помощью светового микроскопа Leica DM 1000 с объективами N Plant×4, ×10, ×40, ×100.

### **3.2.7. 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, затем отмывали в кислом фосфатном буфере (PBS, pH=3,8).

Окрашенные клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы Plan Apo ×20 и ×63. Изображения записывались с помощью цифровой камеры AxioCam HRm.

### 3.2.8. Приготовление хромосомных препаратов

Семяпочки, фиксированные в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 гидратировали в спиртах понижающейся концентрации, промывали водой, из семяпочек выделяли зародышевые мешки (рис. 35). Выделенные 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 (рис. 35, а, б).

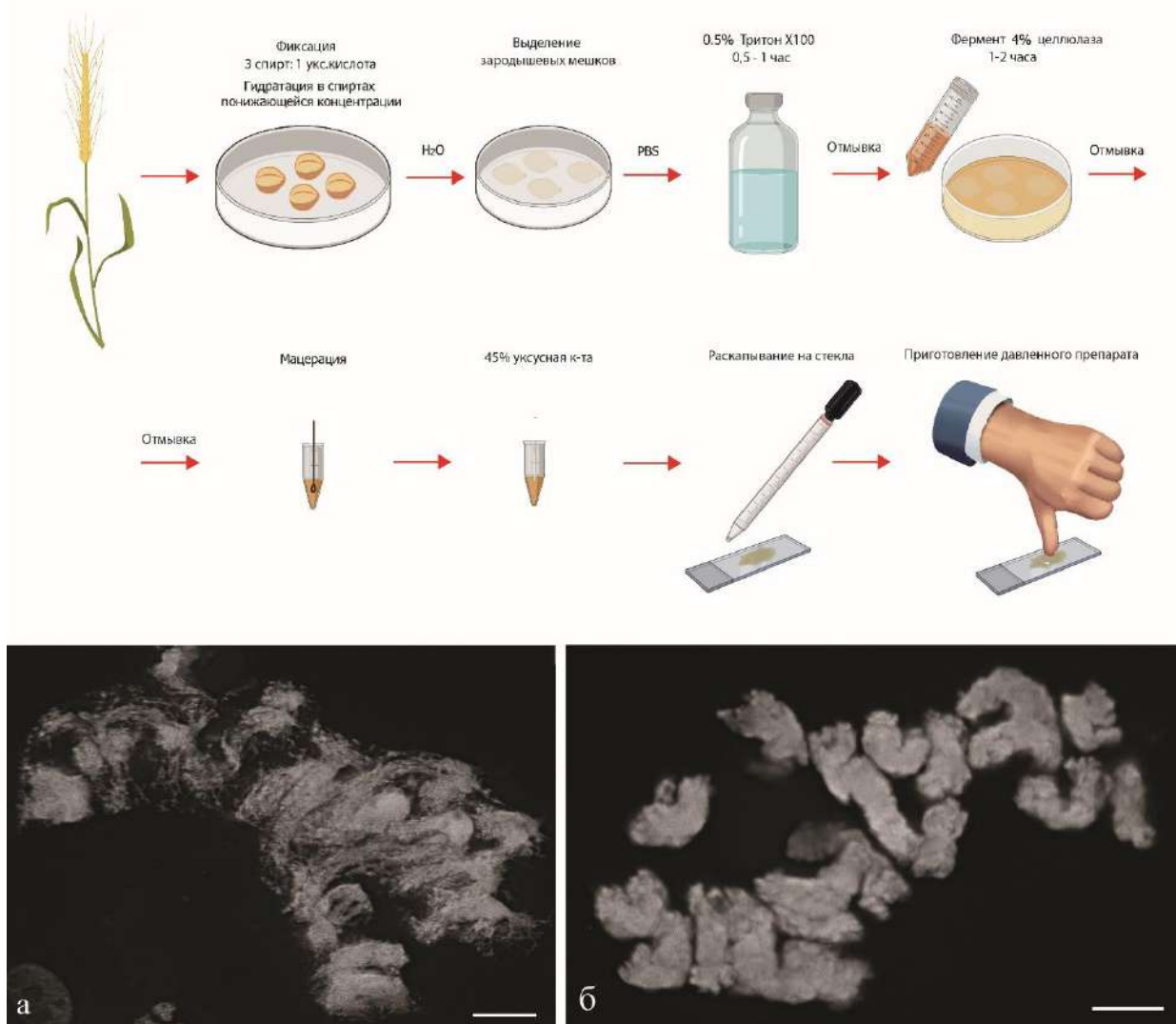


Рис. 35. Приготовление препаратов выделенных политенных хромосом антиподальных клеток. а – выделенные хромосомы антиподальных клеток на стадии средней дифференцировки, б - выделенные хромосомы антиподальных клеток на стадии поздней дифференцировки

### 3.2.9. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Выделенные зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 (Merck) на PBS в течение 30 мин, отмывали PBS, обрабатывали РНКазой во избежание гибридизации зондов с РНК-последовательностями в течение 30 минут при 37°C, отмывали 2xSSC. Далее зародышевые мешки помещали в смесь 50% формамида и 2xSSC на 30 минут при 60°C, затем помещали в гибридизационную смесь, содержащую 50% формамид, SDS, додецилсульфат натрия, SSC и олигонуклеотиды. Далее проводили денатурацию при 92°C в течение 3 минут. Затем проводили гибридизацию в течение ночи при 37°C. После гибридизации проводили серию отмывок – 4xSSC при 40°C, 2xSSC при 37°C, 2xSSC при комнатной температуре. Зародышевые мешки докрашивали DAPI и заключали в Mowiol. В качестве зондов были выбраны последовательности консервативного для растительных теломер повтора 5-CCCTAAACCCTAAACCCTAAA-3, конъюгированные с Cy3 (Cuadrado Á. et al., 2009).

Окрашенные клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы Plan Apo ×20 и ×63. Изображения записывались с помощью цифровой камеры AxioCam HRm.

### 3.2.10. Иммуноцитохимическое выявление клеточных органелл

Для выявления ядрышек, ЭПР, аппарата Гольджи, митохондрий зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 на PBS в течение 30 мин. Затем, после двукратной отмывки буфером и помещали в каплю PBS, содержащую первые антитела, на ночь во влажную камеру в темноте на столе. После инкубации препараты отмывали в двух сменах PBS по 10 мин в каждой и переносили в каплю PBS, содержащую вторые антитела, на 1 час при 37°C. Препараты отмывали в двух сменах PBS по 10 мин в каждой и заключали в Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, США).

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 в разведении 1:50, для выявления аппарата Гольджи использовали мышинные моноклональные антитела к белку маркеру 58K/FTCD (formiminotransferase cyclodeaminase) (в разведении 1:100), для выявления митохондрий использовали кроличьи поликлональные антитела к цитохрому c (Agrisera, Швеция) в разведении 1:100.

В качестве вторых антител использовали ослиные иммуноглобулины против мыши, конъюгированные с Alexa 488 (ReadyProbes) в разведении 2:1000 и козы антигеном кролика, конъюгированные с TRITC (Jackson Immuno Research, США) в разведении 1:100.

Для выявления микротрубочек и актиновых филаментов, зародышевые мешки пермеабелизовали в 0,5% растворе Triton X100 на PHEM в течение 30 мин. Затем, после двукратной отмывки буфером помещали в каплю 10мМ Трис (pH=7,6), содержащую мышиные антитела клон DM1-α против α-тубулина (Sigma, США) для выявления тубулина (разведение 1:100) на ночь во влажную камеру в темноте на столе. После инкубации препараты отмывали в 10 мМ Трис, затем в 20мМ Трис (pH=8,2) по 10 мин в каждом и переносили в каплю 20мМ Трис, содержащую ослиные иммуноглобулины против мыши, конъюгированные с Alexa 488 (Invitrogene, Калифорния) на 1 час при 37°. Препараты отмывали в двух сменах PBS по 10 мин в каждой и заключали в Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, США).

Для проверки специфичности иммуноцитохимического окрашивания были сделаны соответствующие негативные контроли (окраска только вторыми антителами - ослиными иммуноглобулинами против мыши, конъюгированными с Alexa 488 (в разведении 2:1000) при выявлении ядрышек, ЭПР, аппарата Гольджи и козыми антителами против кролика, конъюгированными с TRITC (в разведении 1:100) при выявлении митохондрий).

Окрашенные клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, используя стандартный набор фильтров и объективы ×20 и ×63. Изображения записывались с помощью цифровой камеры Axioscam HRm.

### **3.3. Электронная микроскопия**

Для изучения ультраструктуры антиподальных клеток из фиксированных семяпочек выделяли зародышевые мешки и дофиксировали их в течение 2 часов в 1% водном растворе OsO<sub>4</sub> (при выявлении РНК по методу Бернарда препараты не осмировались), после чего обезвоживали в серии спиртов 10°→20°→30°→40°→50°→60° по 30 мин в каждой смене. В 70° спирте с добавлением 2% уранилацетата препараты оставляли на ночь в холодильнике. Затем продолжали обезвоживание в спиртах восходящей концентрации – 80°, 96° по 30 мин в каждой смене, и двух сменах ацетона по 60 мин в каждой смене. Препараты пропитывали последовательно в смесях ацетона:эпона (3:1), ацетона:эпона (1:1), ацетона:эпона (1:3) в течение 2 часов в каждой смеси и переносили в чистый эпон 812, в котором полимеризовали 24 часа при 37°C и еще 24 часа при 60°C. Ультратонкие срезы



получали с помощью микротомы LKB–III (Швеция), помещали на покрытые формваром бленды, окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу. 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.

### **3.4. Определение уровня экспрессии генов методом RT-ПЦР**

Для получения РНК образцы антиподальных клеток, зародышевых мешков, участки корней в виде мелких фрагментов фиксировали в растворе для сохранения РНК (RNAlater, Qiagen, Germany). Для выделения РНК фиксирующий раствор удаляли, к образцам добавляли лизирующий буфер с бета-меркаптоэтанолом из набора Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA) и растирали ткани тefлоновым пестиком непосредственно в микропробирках. Дальнейшие операции осуществляли по прописи, рекомендуемой фирмой-производителем набора. Первую нить кДНК синтезировали с помощью набора MMLV RT (Евроген, Россия). Равные аликвоты реакционных смесей использовали непосредственно в качестве матриц в реакции 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  $\Delta C_q$ . Для каждого гена проводили три независимых определения уровня экспрессии. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Microsoft Excel.

### **3.5. Обработка изображений**

#### **3.5.1. Обработка изображений световой и электронной микроскопии**

Обработка изображений производилась в программах ImageJ и Photoshop CS6.

#### **3.5.2. Деконволюция**

Чтобы повысить качество полученных с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа изображений проводили деконволюцию с использованием программы ImageJ. С помощью плагина Diffraction PSF 3D с учетом оптических характеристик микроскопа и длин волн эмиссии флуорофоров создавалась PSF (функция

точки светорассеяния). Полученную PSF в дальнейшем использовали для деконволюции с помощью плагина Iterative Deconvolve.

### **3.6. Статистическая обработка данных**

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

### **3.7. Схемы**

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

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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

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.

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.

Были также использованы тезисы докладов (см. раздел 8.2)

### 4.1. Общая структура комплексов антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели

В работе изучались клетки многочисленных (153) зародышевых мешков, выделенных из семязачатка комплексов антиподальных клеток, которые имеют трехуровневую структуру и отличаются друг от друга по морфологии ядра и цитоплазмы. Комплекс антиподальных клеток содержит от 20 до 27 клеток. На ранней стадии дифференцировки все клетки антиподальных комплексов имеют одинаковую величину ядра, неструктурированный хроматин и две вакуоли в цитоплазме (рис. 36, а). На средней стадии дифференцировки в часть ядер апикального яруса индивидуализуются политенные хромосомы. На поздней стадии дифференцировки политенные хромосомы выявляются в ядрах апикального и среднего яруса (рис. 36, б). На стадии клеточной гибели клетки заметно увеличиваются в размерах, уплощаются и вытягиваются (рис. 36, в). На поздних стадиях гибели происходит дальнейшее вытягивание комплекса на фоне многоклеточного

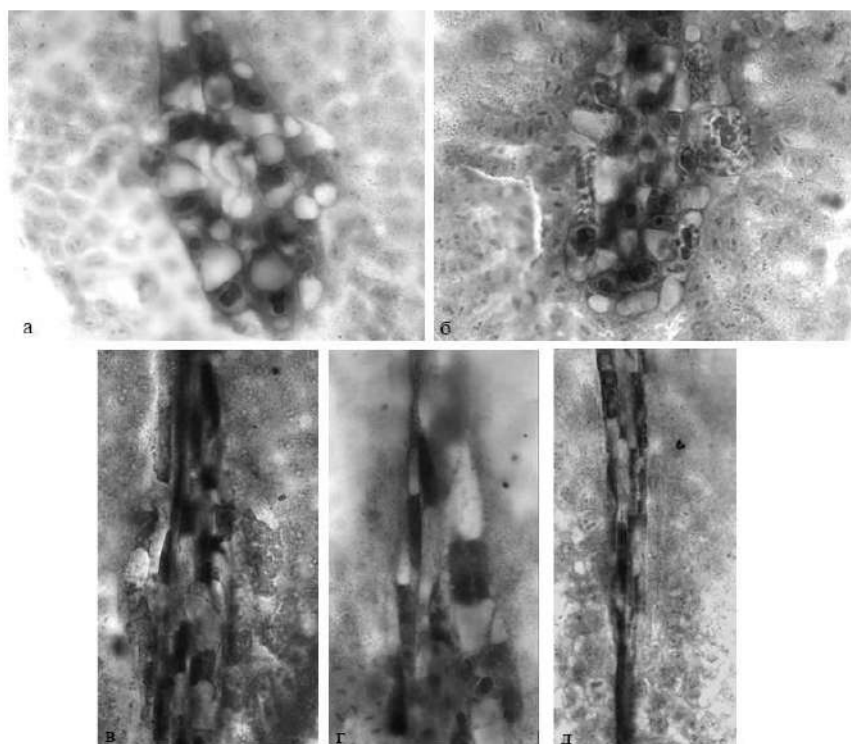


Рис. 36. Структура антиподальных комплексов в ходе онтогенеза, тотальные препараты. а – ранняя стадия дифференцировки, б – средняя стадия дифференцировки, в – поздняя стадия дифференцировки, г – начальная стадия гибели, д – финальная стадия гибели

эндосперма (рис. 36, г). Размер однослойного зародышевого мешка с клеточным эндоспермом составляет  $600 \times 1700$  мкм, его антиподального комплекса  $200 \times 600$  мкм.

## 4.2. Структура ядер антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели

### 4.2.1. Структура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

На рисунках представлены ядра антиподальных комплексов зародышевых мешков пшеницы на ранней (рис. 37, а), средней (рис. 37, б) и поздней стадиях дифференцировки (рис. 37, в).

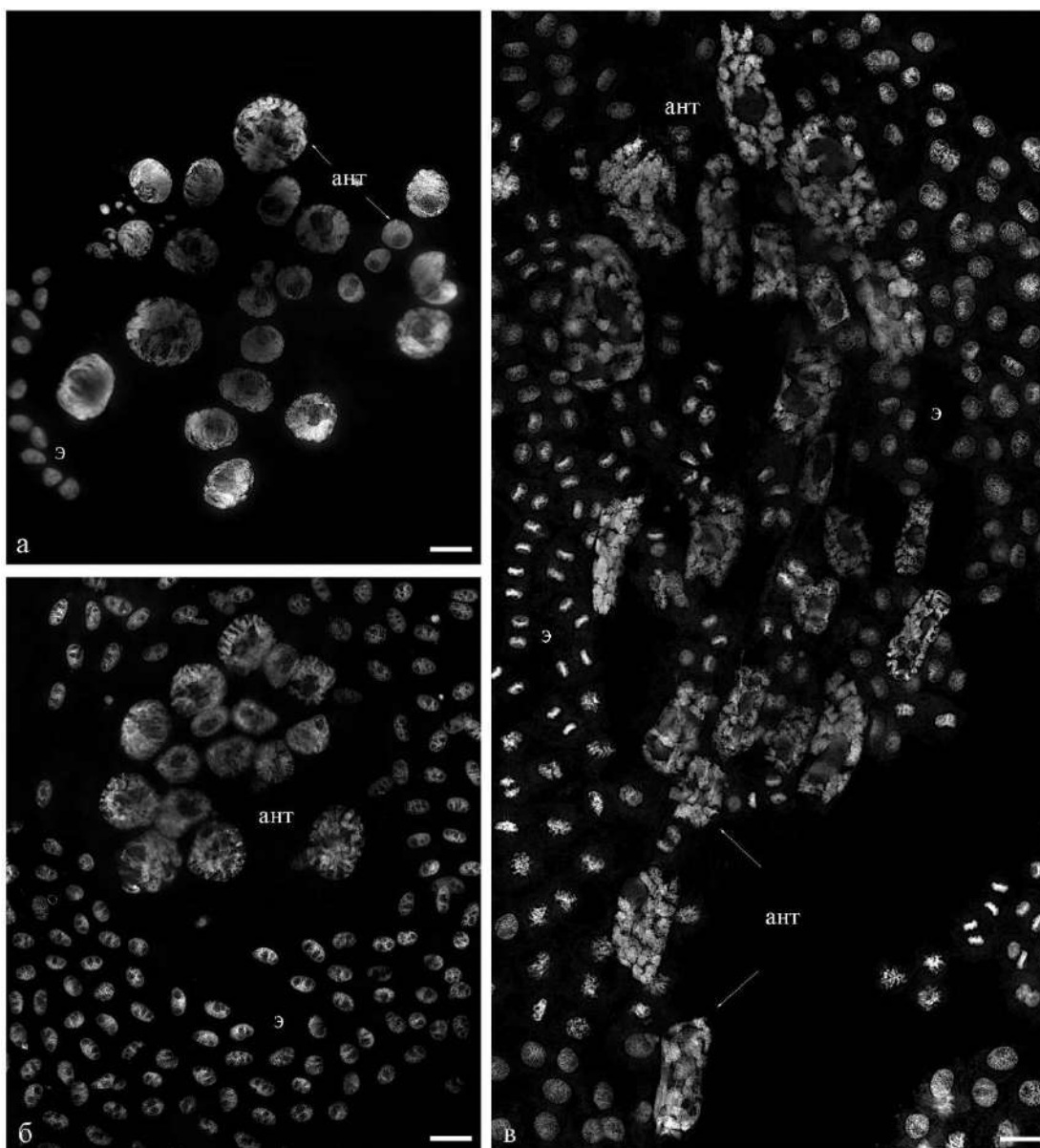


Рис. 37. Ядра антиподальных комплексов зародышевых мешков пшеницы, находящиеся на стадиях дифференцировки. DAPI. Стадии: ранняя дифференцировка – а; средняя дифференцировка – б; поздняя дифференцировка – в. ант - антиподальные ядра; э – ядра эндосперма. Масштабный отрезок – 30 мкм.

Заметно, что в течение дифференцировки круглые ядра с диаметром до 20 мкм клеток комплексов увеличиваются в размерах (до 30 мкм), позднее ядра приобретают овальную форму до 30 мкм на 80 мкм.

На ранней стадии дифференцировки в ядрах антиподальных клеток не выявляются отдельные политенные хромосомы (рис.37, а). Небольшими округлые ядра с фибриллярным хроматином базального яруса комплекса сохраняют свою морфологию до конца средней стадии дифференцировки (рис. 38, а, г). Ядра клеток среднего и апикального ярусов на средней и поздней стадии дифференцировки заметно увеличиваются в размерах и в них выявляются гигантские политенные хромосомы (рис. 37, б, в; рис. 38, б, в, г, д).

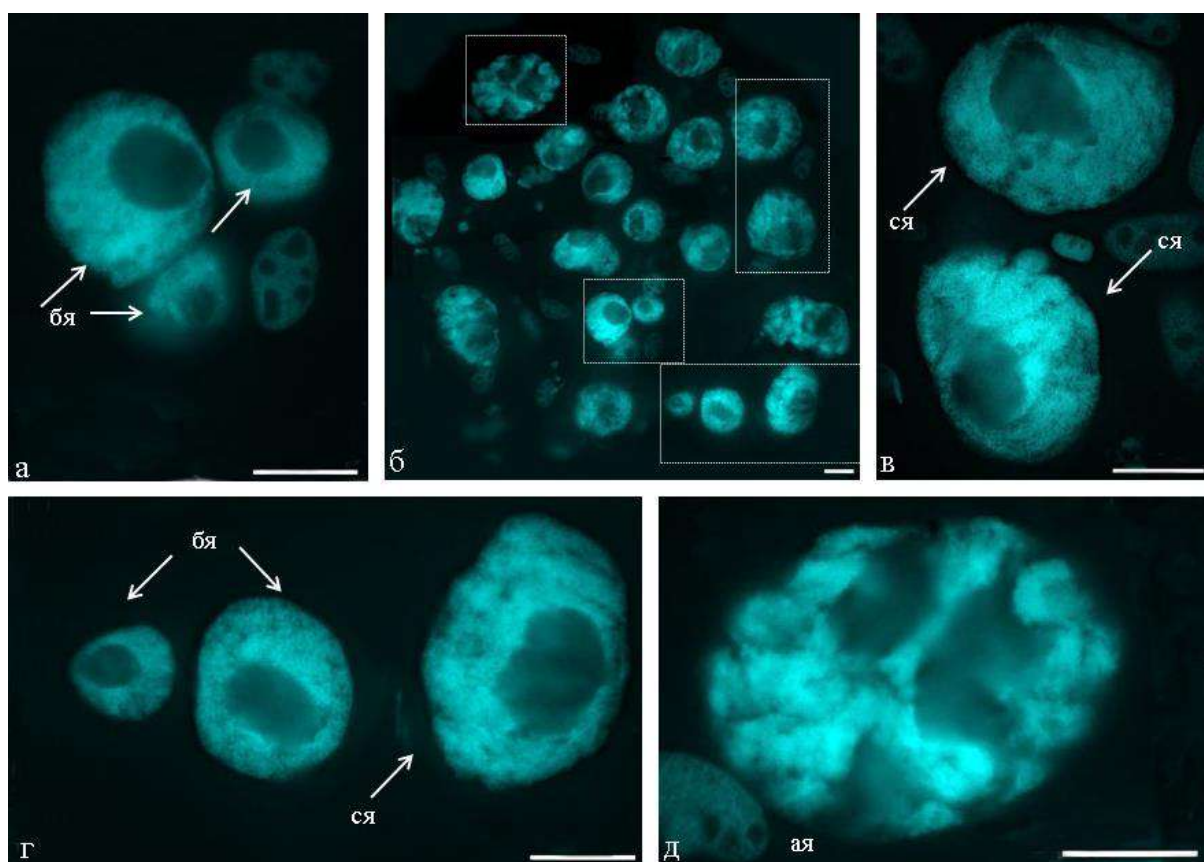


Рис.38. Ядра антиподальных клеток на средней стадии дифференцировки. DAPI. а, в, г, д – ядра антиподальных клеток; б – комплекс антиподальных клеток. бя – ядра клеток базального яруса, ся – ядра клеток среднего яруса, ая – ядра клеток апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.

На поздней стадии дифференцировки политенные хромосомы наблюдаются в ядрах клеток всех ярусов и ядра приобретают овальную форму (рис. 37, в; рис. 39 а, б, в). Особенно это заметно в крупных ядрах клеток апикального яруса (рис. 39, б, в)

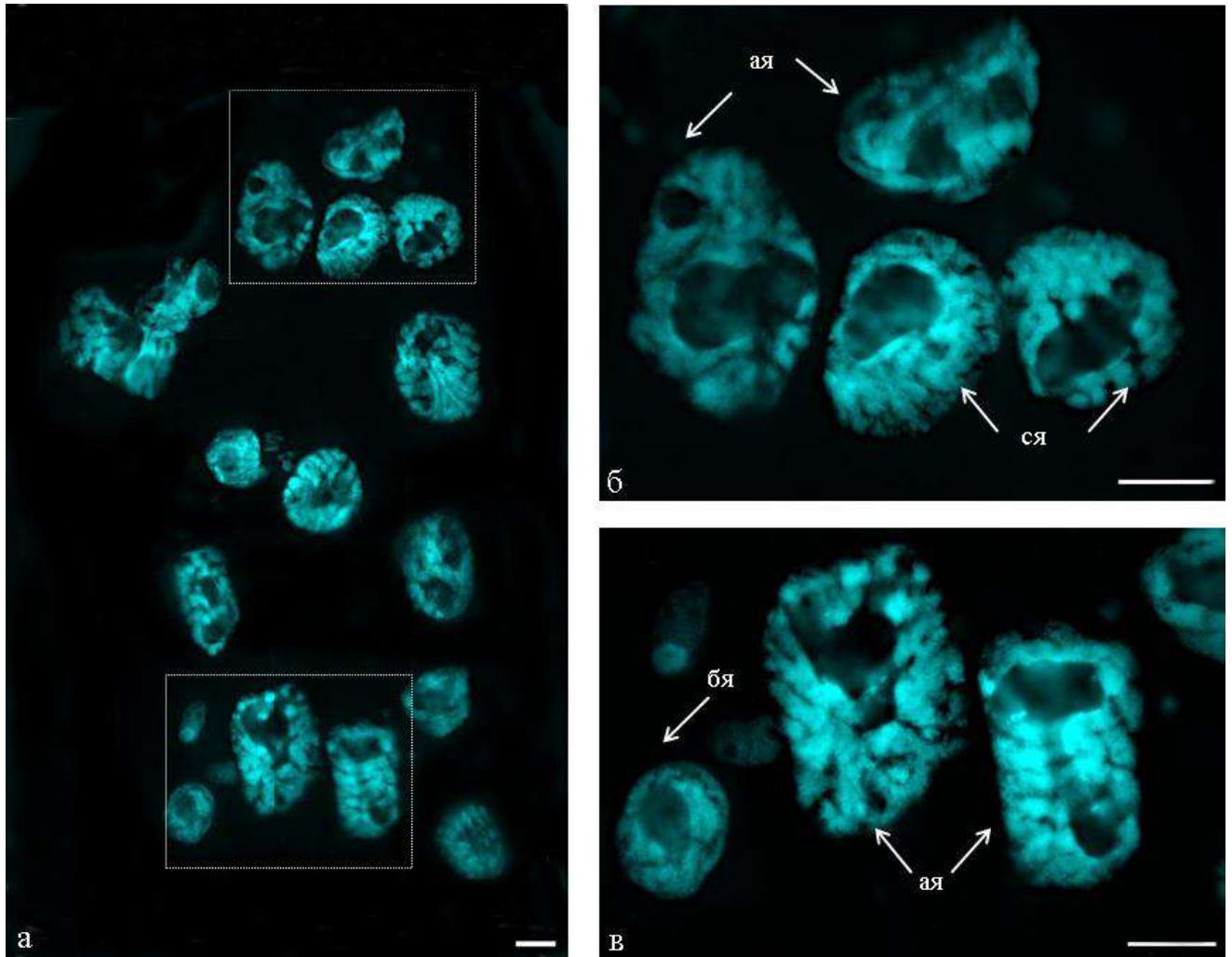


Рис. 39. Ядра антиподальных клеток на средней стадии дифференцировки. DAPI. а – комплекс антиподальных клеток; б, в - ядра антиподальных клеток; бя - ядра клеток базального яруса, ся - ядра клеток среднего яруса, ая - ядра клеток апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.

На стадии гибели ядра антиподальных комплексов вытягиваются (рис.40, а) (до 100 мкм длиной, шириной 10 мкм). Индивидуальные политенные хромосомы на стадиях гибели сближаются, объединяются (рис. 40, б) и, позднее, фрагментируются.

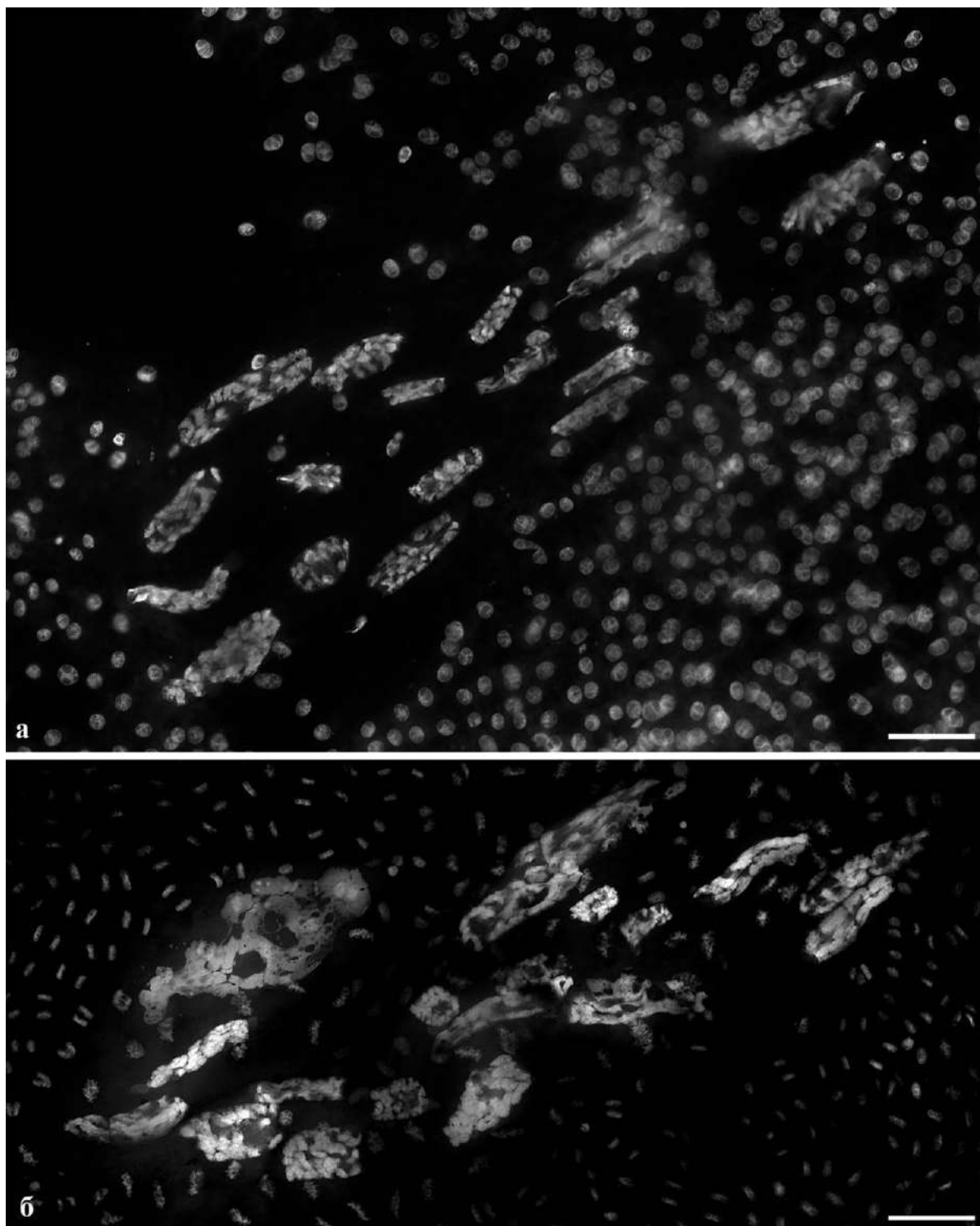


Рис. 40. Ядра клеток антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков на этапе гибели, DAPI. а –плотные хромосомы ядер комплекса; б – гибнущий комплекс антипод, ядра с объединенными хромосомами ядра. Масштаб – 100 мкм.

Яркий пример комплексов с фрагментированными ядрами (рис. 41, а) и вытянутыми веретеновидными ядрами (рис. 41, б) представлен на рис. 41. На финальных этапах гибели все ядра комплекса сближаются в узкую полосу размером 1-2 мм.

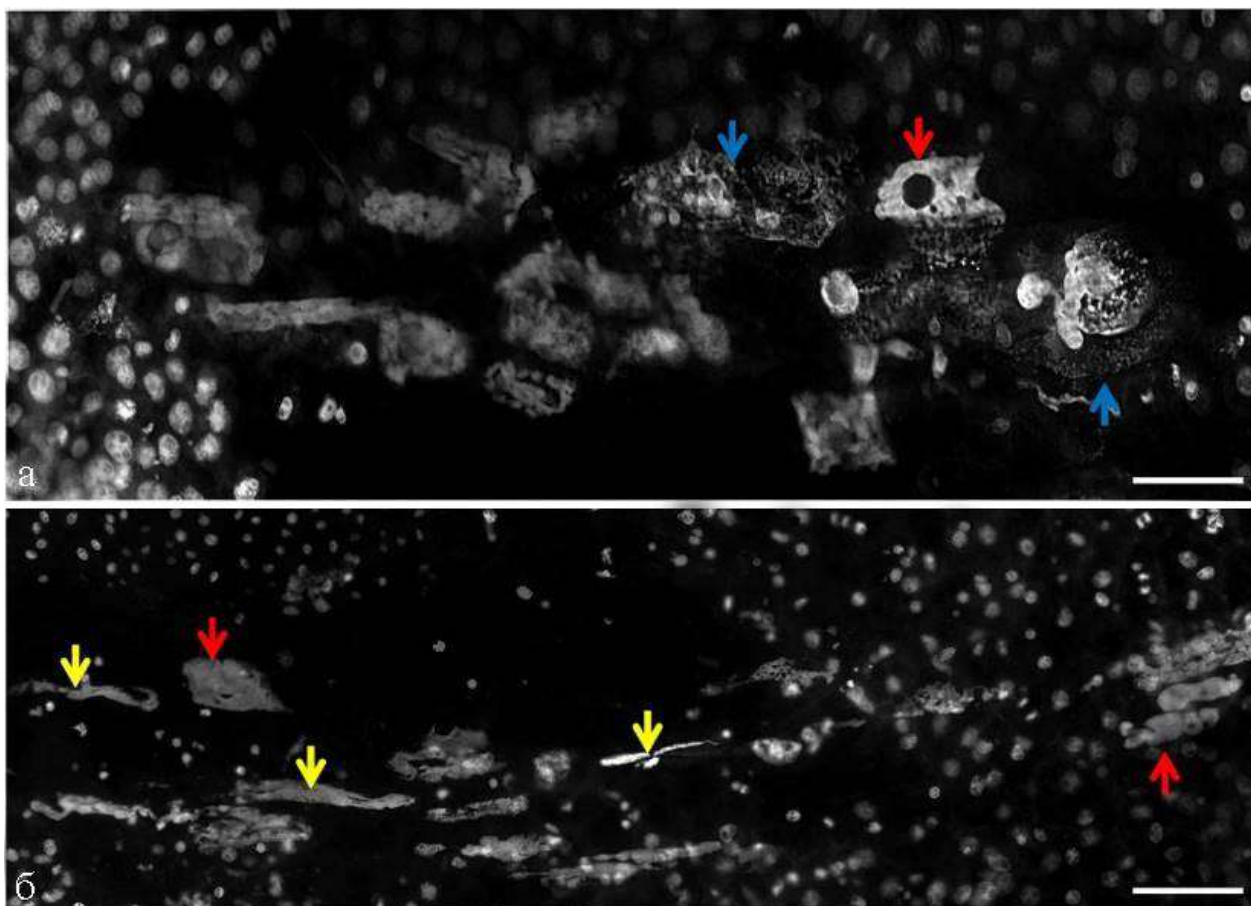


Рис. 41. Ядра клеток антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков на поздних этапах гибели, DAPI. а – ядро с объединенными хромосомами (красная стрелка), фрагментированные ядра (синие стрелки), б – объединенные хромосомы ядер (красные стрелки), уплощенные веретеновидные ядра (желтые стрелки). Масштаб – 100 мкм.

Индивидуальные антиподальные ядра на стадии гибели комплексов представлены на рис. 42, 43. На ранних этапах гибели клеток антиподального комплекса тела политенных хромосом более плотные по сравнению с хромосомами ядер на стадии поздней дифференцировки (рис. 42, а, б), хромосомные территории сближены (рис. 42, в, г). В антиподальных клетках, находящихся на более поздних стадиях гибели, выявляются ядра с разной степенью объединения хромосомных территорий (рис. 43, а, б), в телах хромосом выявляются многочисленные лакуны разного размера. Встречаются ядра, в которых объединены несколько хромосом (рис. 43, а) и ядра, в которых отдельные хромосомные территории неразличимы (рис. 43, б). На поздних этапах гибели часть клеток апикального и среднего яруса, уплощены и вытянуты (рис. 43, г).



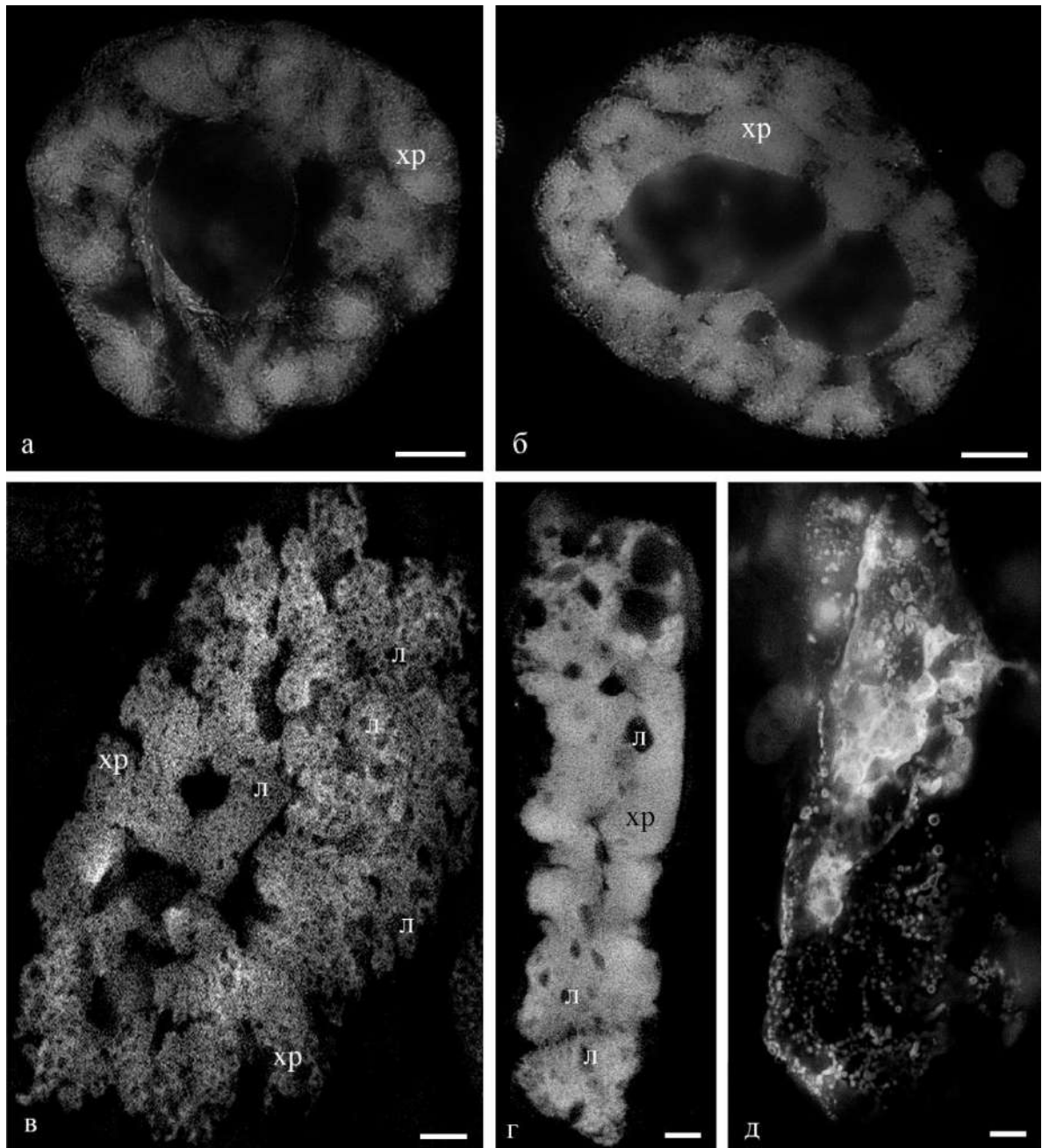


Рис. 42. Ядра антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. DAPI. а – Антиподальное ядро на стадии средней дифференцировки, видны отдельные фибриллы - хроматиды в телах политенных хромосом; б – ядро антиподальной клетки на поздней стадии дифференцировки, видны плотные тела политенных хромосом; в – ядро антиподальной клетки на средней стадии ПКГ, слившиеся объединённые ячеистые политенные хромосомы; г – ядро антиподальной клетки на стадии поздней ПКГ, плотные объединившиеся политенные хромосомы ядра; д – фрагментированное ядро антиподальной клетки на поздней стадии ПКГ; хр – политенные хромосомы; л – лакуны в области политенных хромосом. Масштабный отрезок – 10 мкм.

В некоторых ядрах клеток апикального яруса наблюдается частичная фрагментация хроматина, на более поздних этапах гибели встречаются ядра с полностью фрагментированным хроматином (рис. 42, г, рис. 43, д). Наиболее сильным изменениям

подвергаются крупные ядра клеток апикального яруса, в мелких ядрах клеток базального яруса объединение хромосомных территорий происходит позже, они уплощаются, но не фрагментируются. На финальных этапах гибели все ядра комплекса вытянутые и располагаются в узкой области на поверхности многоклеточного эндосперма.

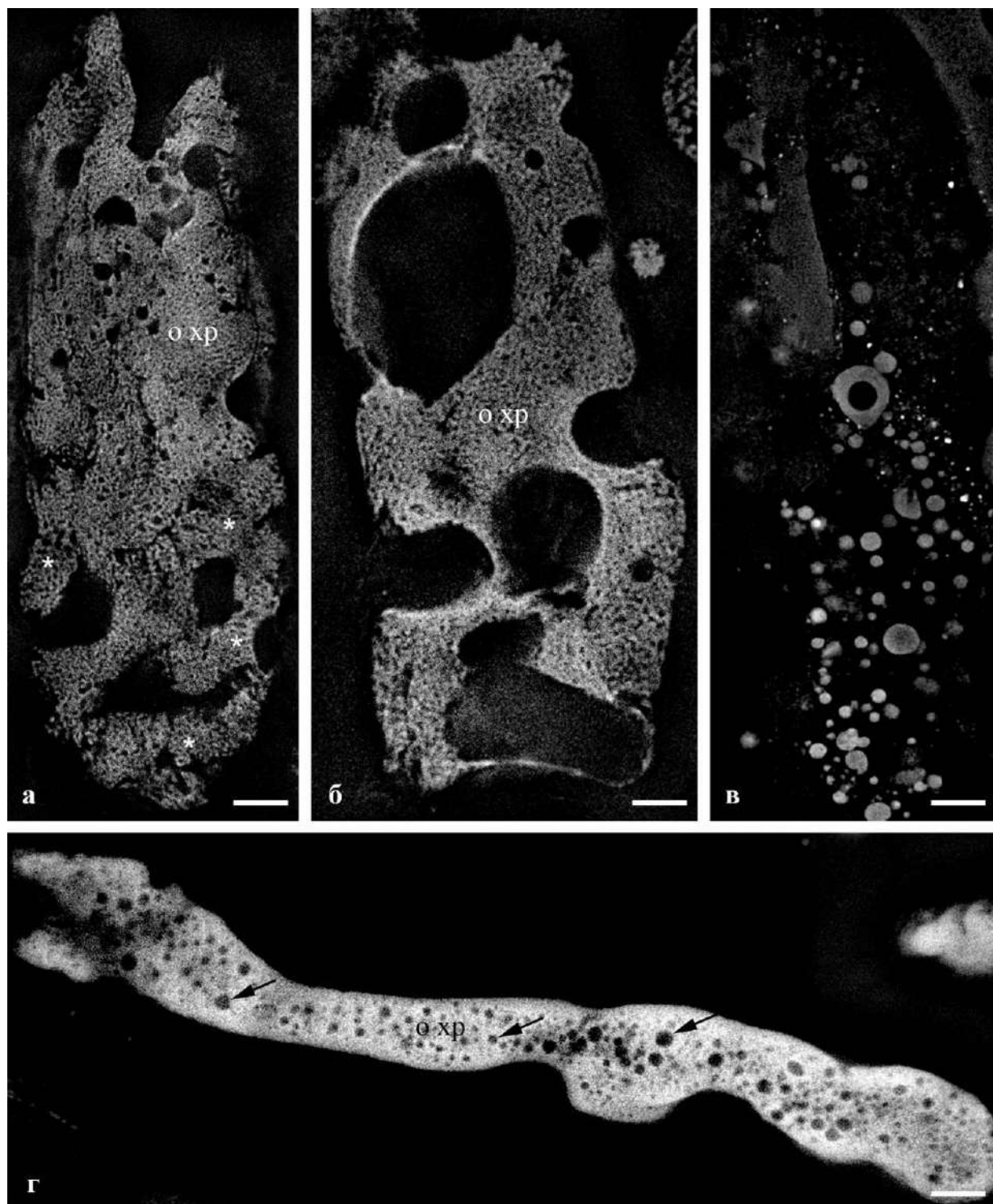


Рис. 43. Типы ядер антиподальных клеток на стадии гибели. а – сближенные хромосомы, б – ядро со слившимися хромосомами, в – фрагментация хроматина, г – уплощенное и вытянутое ядро. Лакуны в ядрах антиподальных клеток (стрелки). Масштаб – 10 мкм.

#### 4.2.2. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков

Ядра антиподальных клеток, выделенные из неоплодотворенных семяпочек, имеют свои особенности по сравнению с ядрами антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков. Размер неоплодотворенных зародышевых мешков всегда составляет  $400 \times 600$  мкм, диаметр антиподального комплекса около 300 мкм.

Внешний вид ядер комплексов антиподальных клеток неоплодотворенных семяпочек на стадии средней (рис. 44, а) и поздней (рис. 44, б) дифференцировки представлены на рис. 44.

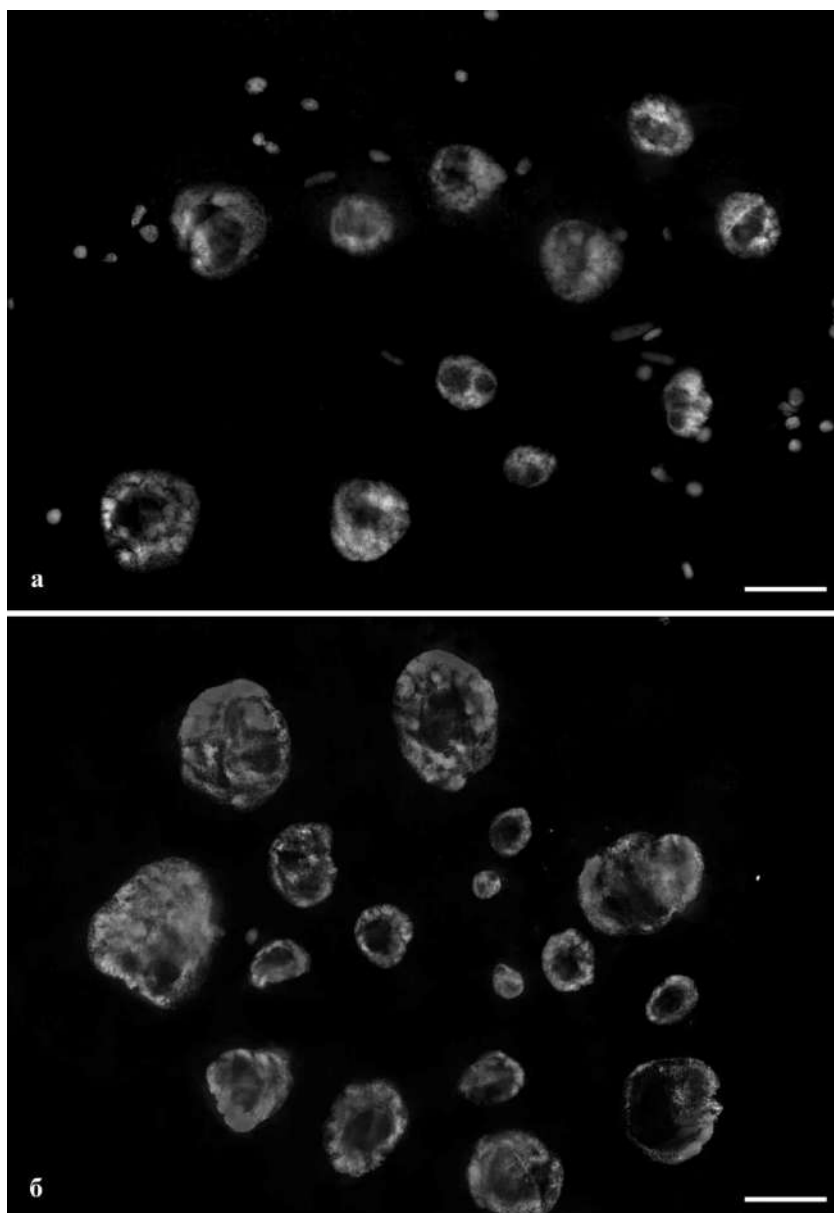


Рис.44. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки, DAPI. а – ядра клеток на стадии средней дифференцировки; б – ядра клеток на стадии поздней дифференцировки. Масштабный отрезок – 100 мкм.

На стадии ранней дифференцировки ядра имеют фибриллярную структуру (рис. 45, а, б, в, г). На стадии средней и поздней дифференцировки в ядрах выявляются индивидуальные политенные хромосомы (рис. 45, д, е).

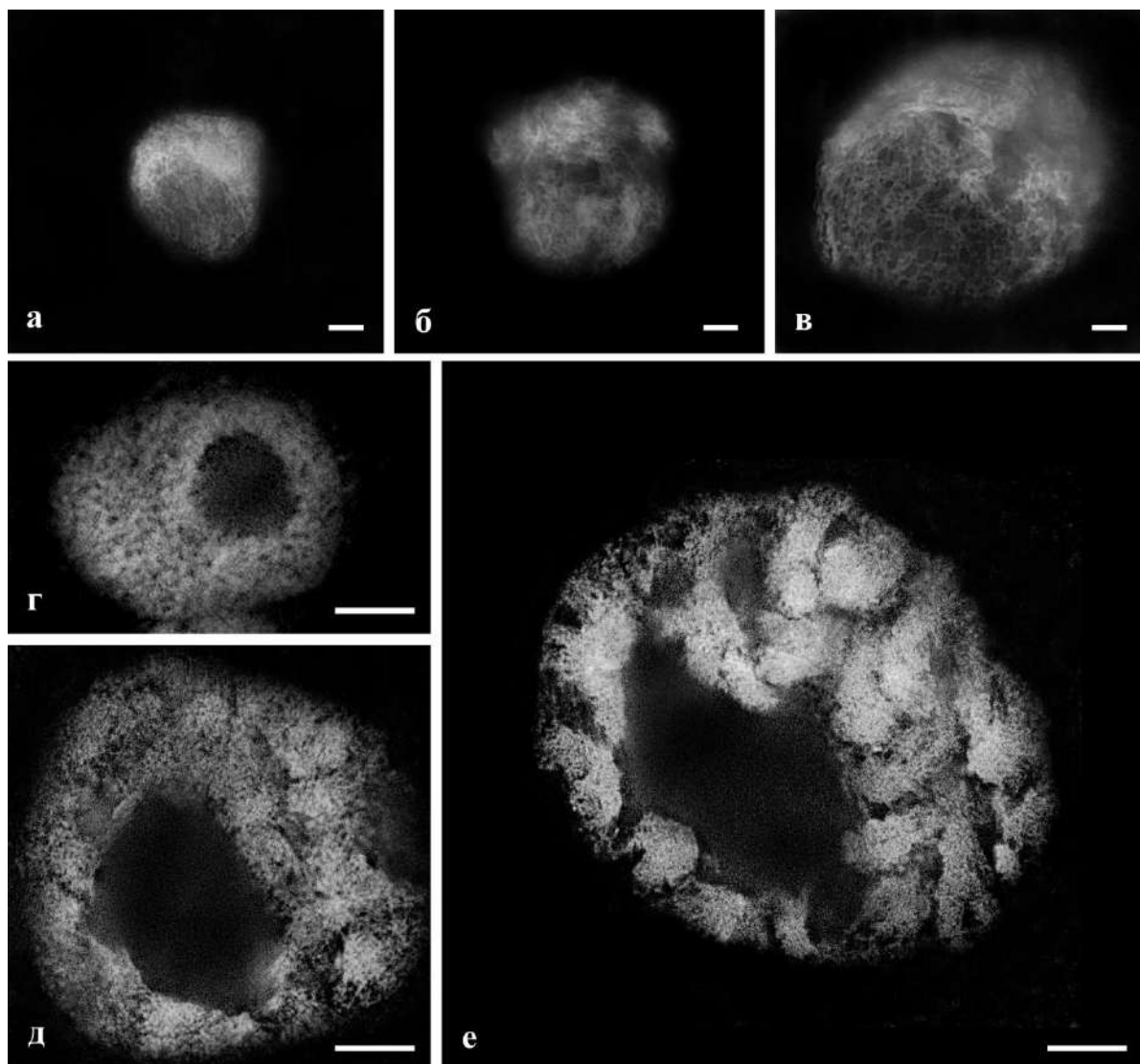


Рис.45. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки, DAPI. Ядра клеток базального (а), среднего (б), и апикального (в) ярусов комплекса на стадии ранней дифференцировки. Ядра клеток базального (г), среднего (д), и апикального (е) ярусов комплекса на стадии поздней дифференцировки. Видны хроматиды недифференцированных политенных хромосом в ядрах базального яруса. Плотные тела хромосом заметны в ядрах апикального яруса (е). Масштабный отрезок – 10 мкм.

На стадиях гибели антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков в клетках комплекса выявляются ядра с фрагментами хромосом, ядра с плотным телами хромосом и несколькими объединенными хромосомами (рис. 46, а), ядра с деградировавшим хроматином (рис. 46, б). При этом структурные изменения затрагивают все ядра комплексов на стадии гибели.

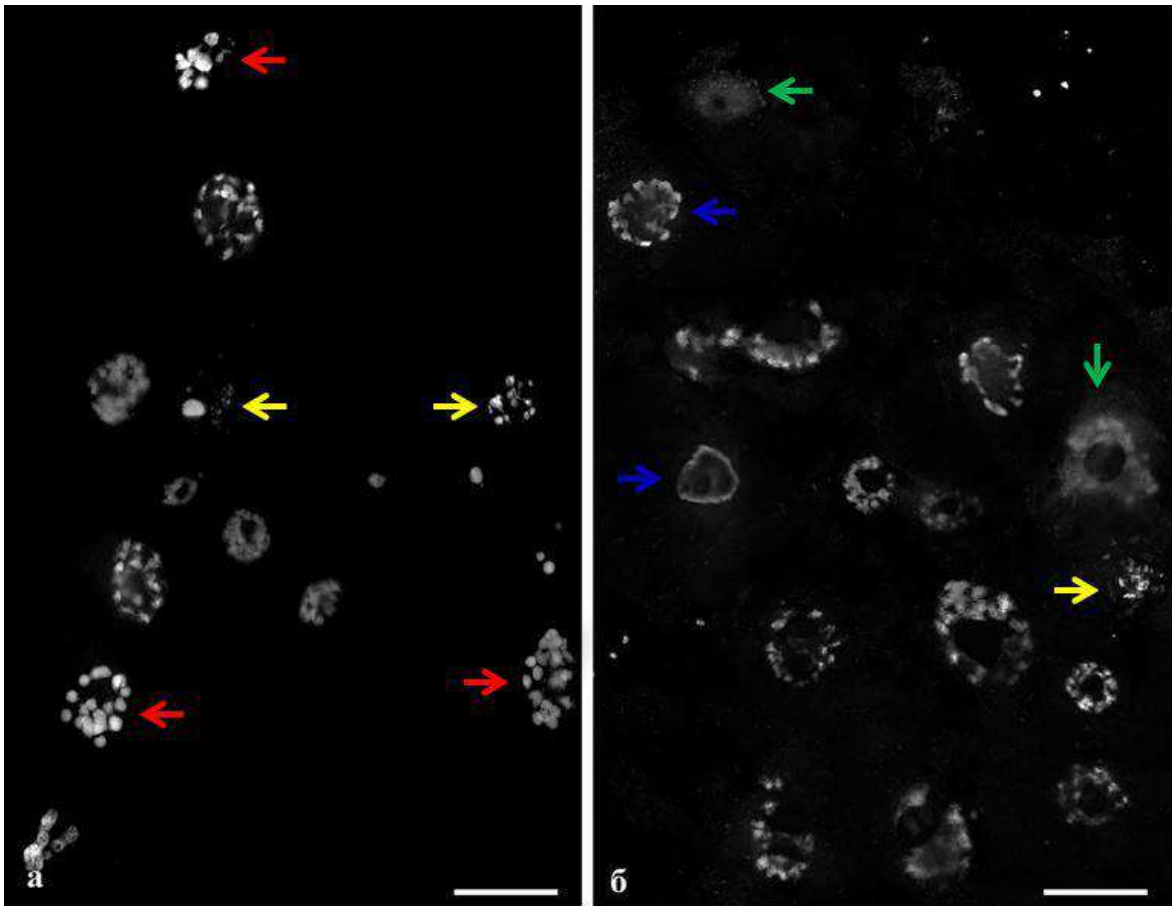


Рис. 46. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели; а – ядра с фрагментами хромосом (желтые стрелки), ядра с плотным хроматином и несколькими объединенными хромосомами (красные стрелки); б - ядра с фрагментами хромосом (желтые стрелки) и с деградировавшим хроматином в центральной части ядра (синие стрелки), финальная стадия деградации ядер (зеленые стрелки). Масштабный отрезок – 10 мкм.

Анализ структуры индивидуальных ядер антиподальных комплексов на средней стадии гибели позволяет увидеть ядра с сильно уплотненным хроматином (рис. 47, а, б) и ядра, в которых некоторые хромосомы объединены в однородные плотные массы (рис. 47, в, г), объединения всех хромосомных территорий не обнаружено.

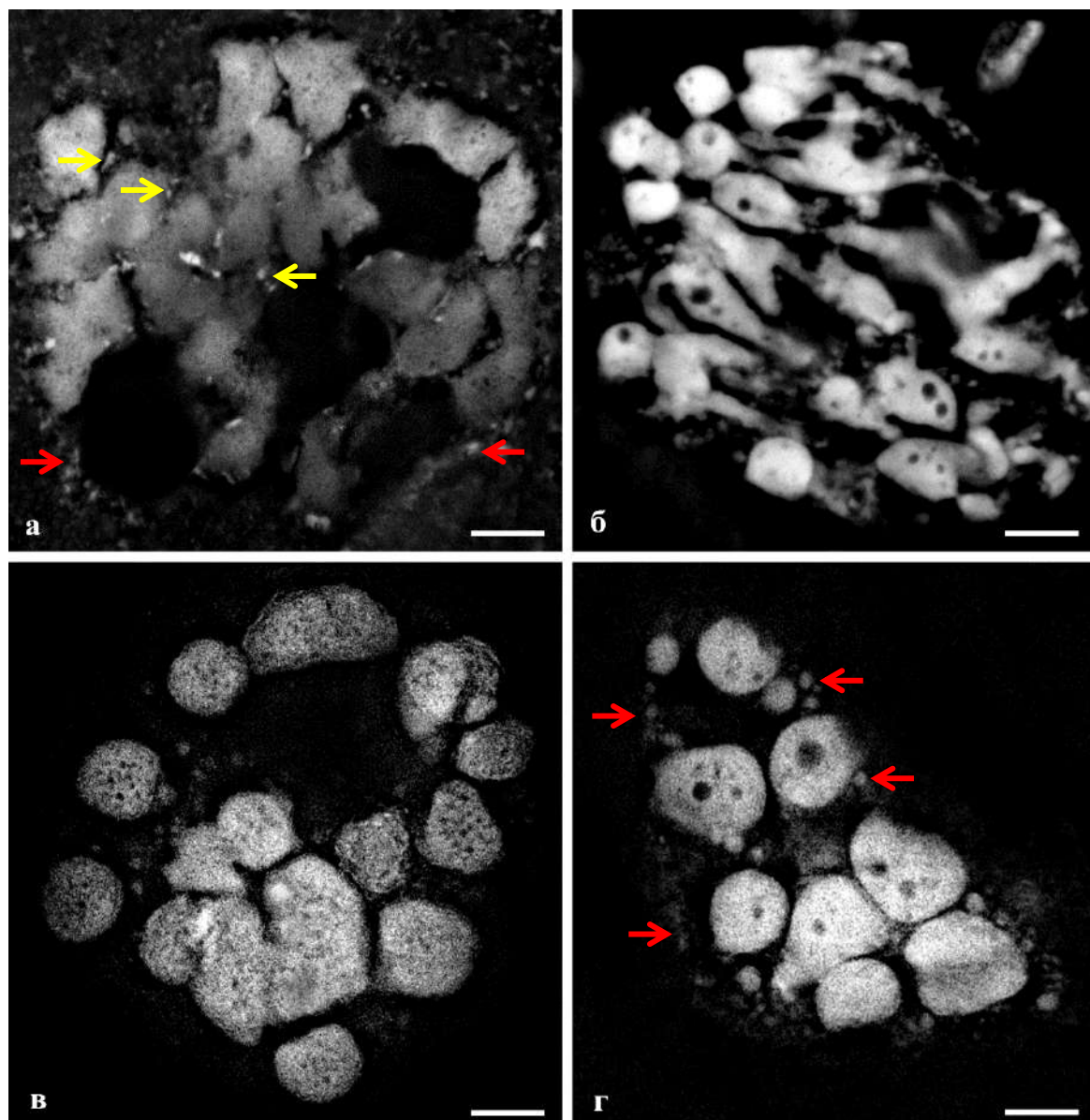


Рис.47. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели, DAPI. Ядра клеток апикального (а, б) ярусов комплекса с плотными, однородными телами хромосом; ядра клеток среднего яруса (в, г) с крупными фрагментами хромосом. Мелкие фрагменты хроматина на периферии ядра (а, г, красные стрелки) и хромосомных территорий (а, желтые стрелки). Масштабный отрезок – 10 мкм.

На более поздних этапах гибели хроматин некоторых антиподальных ядер фрагментирован (рис. 48, а, б, в), многочисленные фрагменты хромосом обнаруживаются за пределами ядра в цитоплазме клеток. У некоторых клеток заметна деградация хроматина в центре ядра, а хроматин на периферии ядра сохраняется (рис. 48, г, д, е).

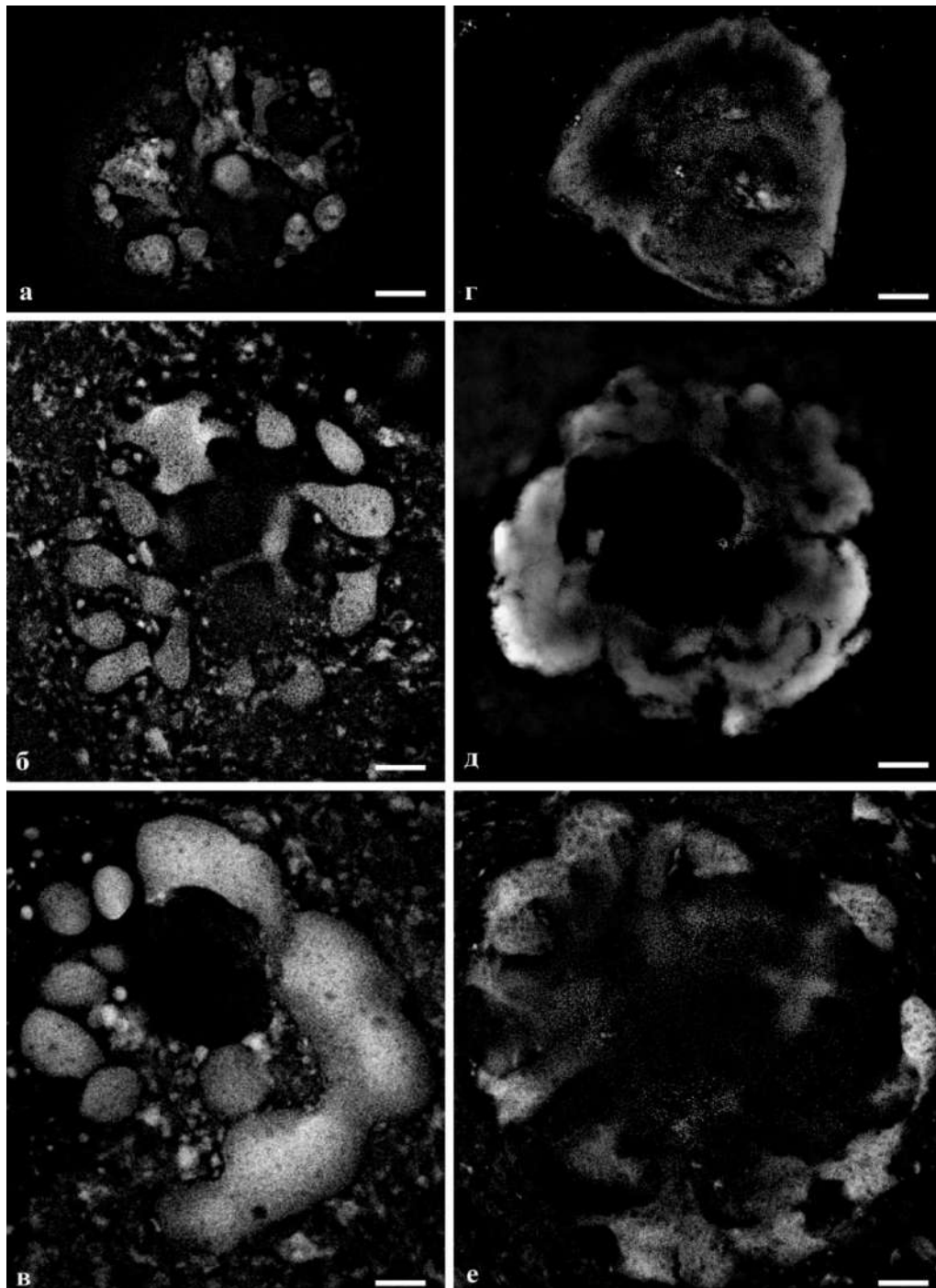


Рис.48. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели, DAPI. Ядра клеток базального (а), среднего (б, в) ярусов с фрагментацией хроматина. Фрагменты ДНК хромосом в цитоплазме антиподальных клеток. Ядра клеток базального (г), среднего (д) и апикального (е) ярусов, деградация хроматина центральной области ядер. Масштабный отрезок – 10 мкм.

На финальных этапах гибели клеток комплекса в некоторых ядрах не выявляется ДНК (рис. 49, а, в), однако, в этих ядрах на фазово-контрастном изображении отчетливо видны сохранившиеся ядрышки (рис. 49, б, г), многочисленные мелкие фрагменты ДНК выявляются в цитоплазме.

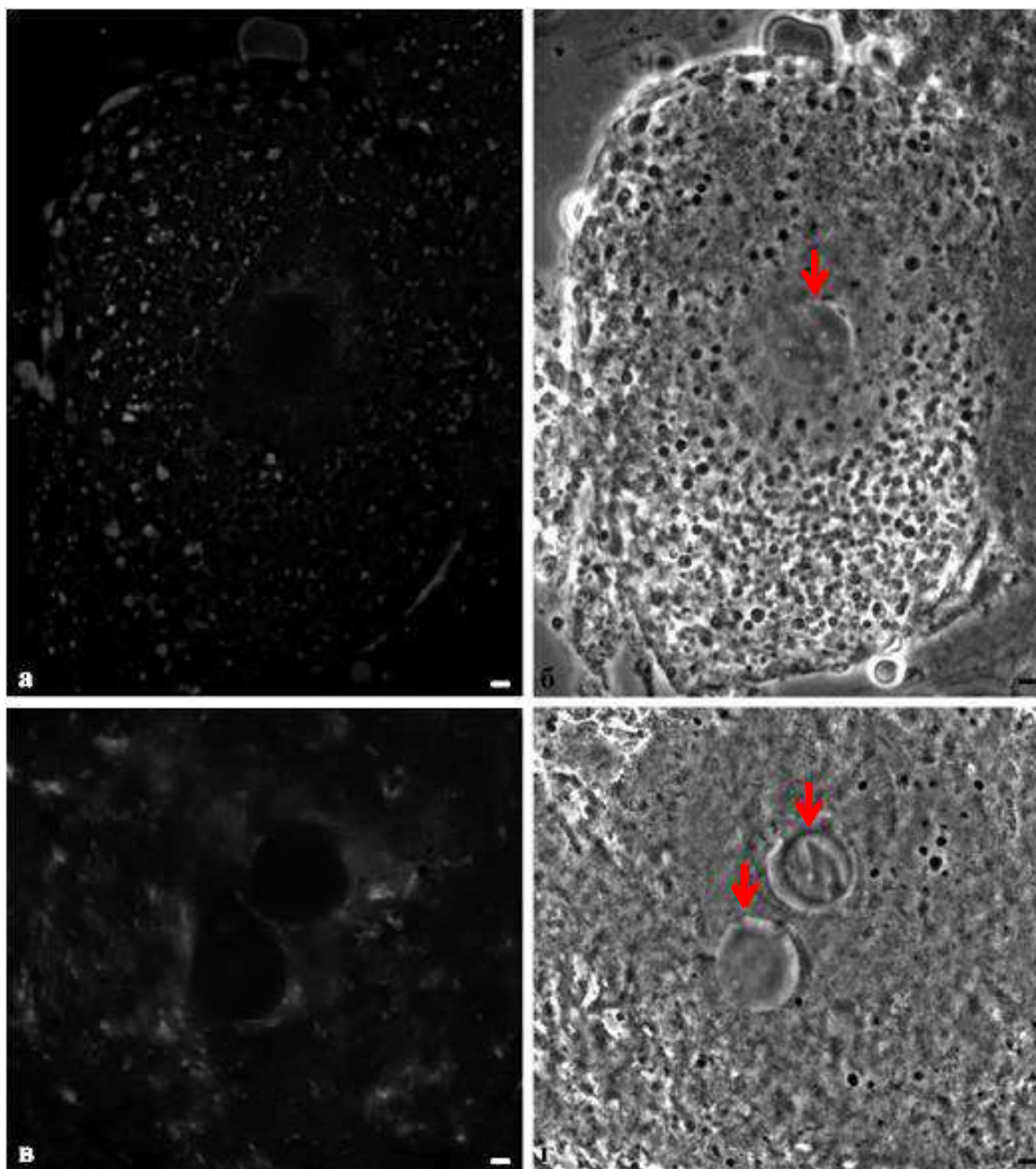


Рис.49. Ядра клеток антиподальных комплексов неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели. а, в – DAPI; многочисленные ДНК-позитивные частицы в цитоплазме и области ядра, прилегающей к ядрышку. б, г – фазовый контраст. В области ядра присутствуют сохранившиеся ядрышки (красные стрелки). Масштабный отрезок – 10 мкм.



#### 4.2.3. Структура политенных хромосом антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

Чтобы понять структуру политенной хромосомы антиподальных клеток, необходимо определить и охарактеризовать их субъединицу, т.к. политенные хромосомы формировались в результате раундов эндоредупликации хроматид исходных антиподальных клеток. Мы сравнили толщину политенной хромосомы с толщиной фибрилл хроматина эндосперма. Определить их размеры можно на изображениях ультратонких срезов ядер.

Измерена толщина фибрилл в ядрах антиподальных клеток и ядрах ценоцита эндосперма (рис. 50). Измерения проводились в программе ImageJ.

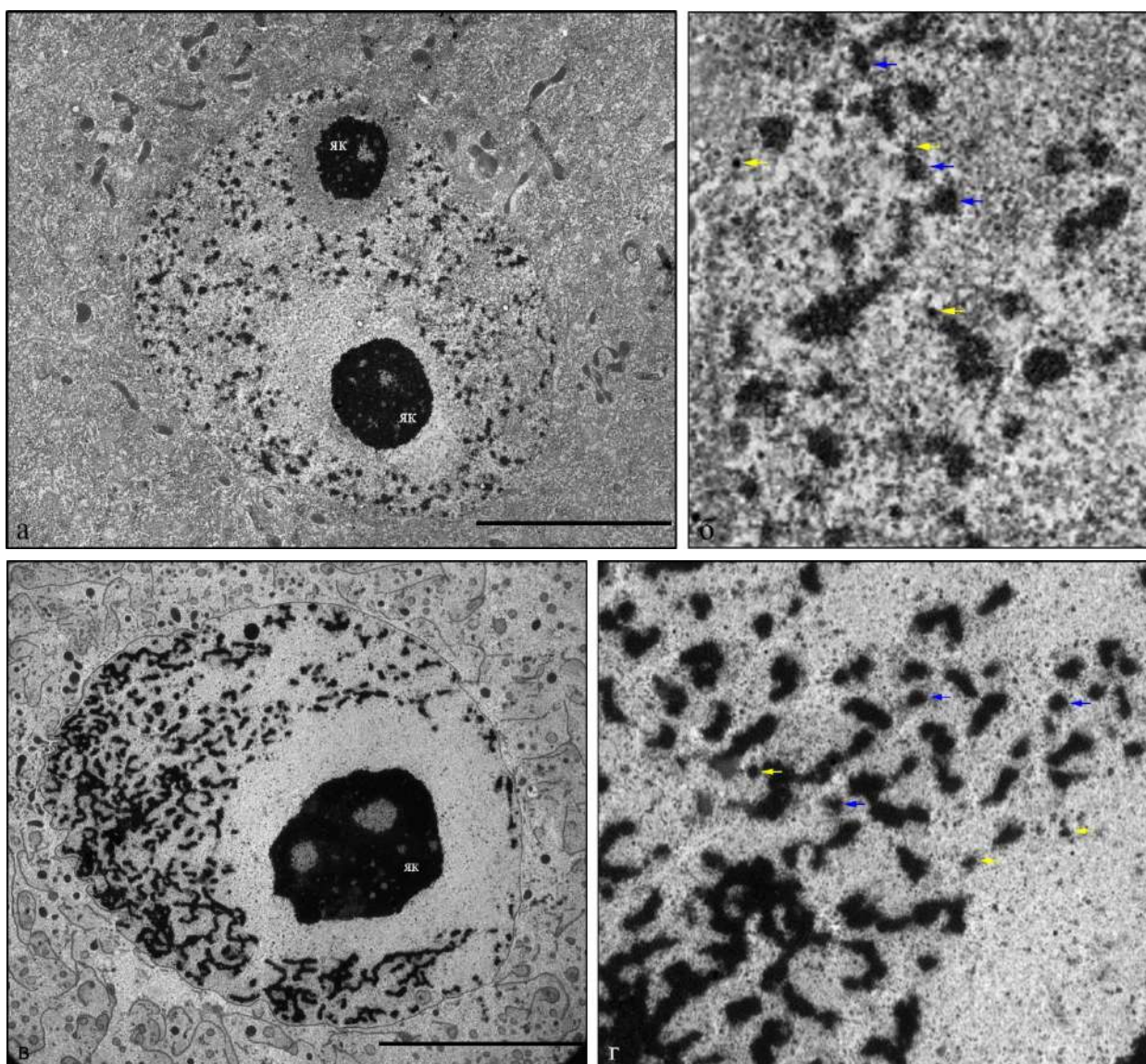


Рис.50. Фибриллы хроматина ядра эндосперма (а, б) и политенных хромосом антиподальной клетки (в, г) на стадии ранней дифференцировки. ТЭМ. Желтые стрелки – самые тонкие фибриллы, синие стрелки – более толстые фибриллы. Масштабный отрезок – 10 мкм (а), 20 мкм (в).

После калибровки изображений, инструментом «Измерение» на панели задач измерялся диаметр наиболее тонких фибрилл, имеющих округлую в сечении форму (чтобы избежать изменения тангенциальных срезов). Были измерены фибриллы у 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 (медиана 0,122). Наиболее часто данные фибриллы объединялись между собой, образуя более крупные фибриллы величиной 0,2 – 0,3 мкм (медиана 0,263). Самые тонкие фибриллы в ядрах эндосперма 0,09-0,14 мкм (медиана 0,13), более крупные фибриллы величиной 0,2 – 0,3 мкм (медиана 0,225). Данные выборки достоверно не различались по критерию Манна-Уитни ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует о том, размер фибрилл в ядрах эндосперма соответствовал толщине фибрилл в составе политенных хромосом антиподальных клеток.

Фибриллы хроматина были идентифицированы в составе интактных ядер антиподальных клеток, окрашенных реактивом Шиффа (рис. 51, а, б) и DAPI.

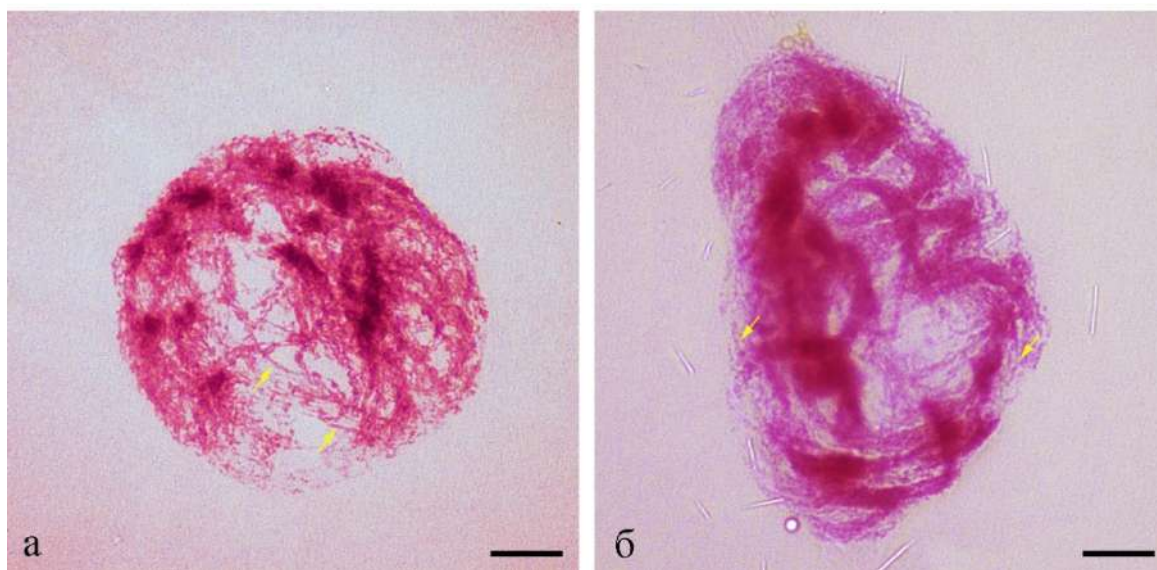


Рис. 51. Фибриллы политенных хромосом антиподальных клеток на ранней (а) и средней стадии дифференцировки (б). Окраска реактивом Шиффа по методу Фёльгена. Масштабный отрезок 10 мкм.

Субъединицы политенных хромосом были выявлены в составе выделенных политенных хромосом на препаратах, окрашенных DAPI (рис. 52, а). Специально для этого была разработана методика выделения политенных хромосом антиподальных клеток (рис. 35). На рис. 52 представлены разбросанные хромосомы нескольких антиподальных ядер, образованных из нескольких отдельных и переплетенных фибрилл (рис. 52, б, в).

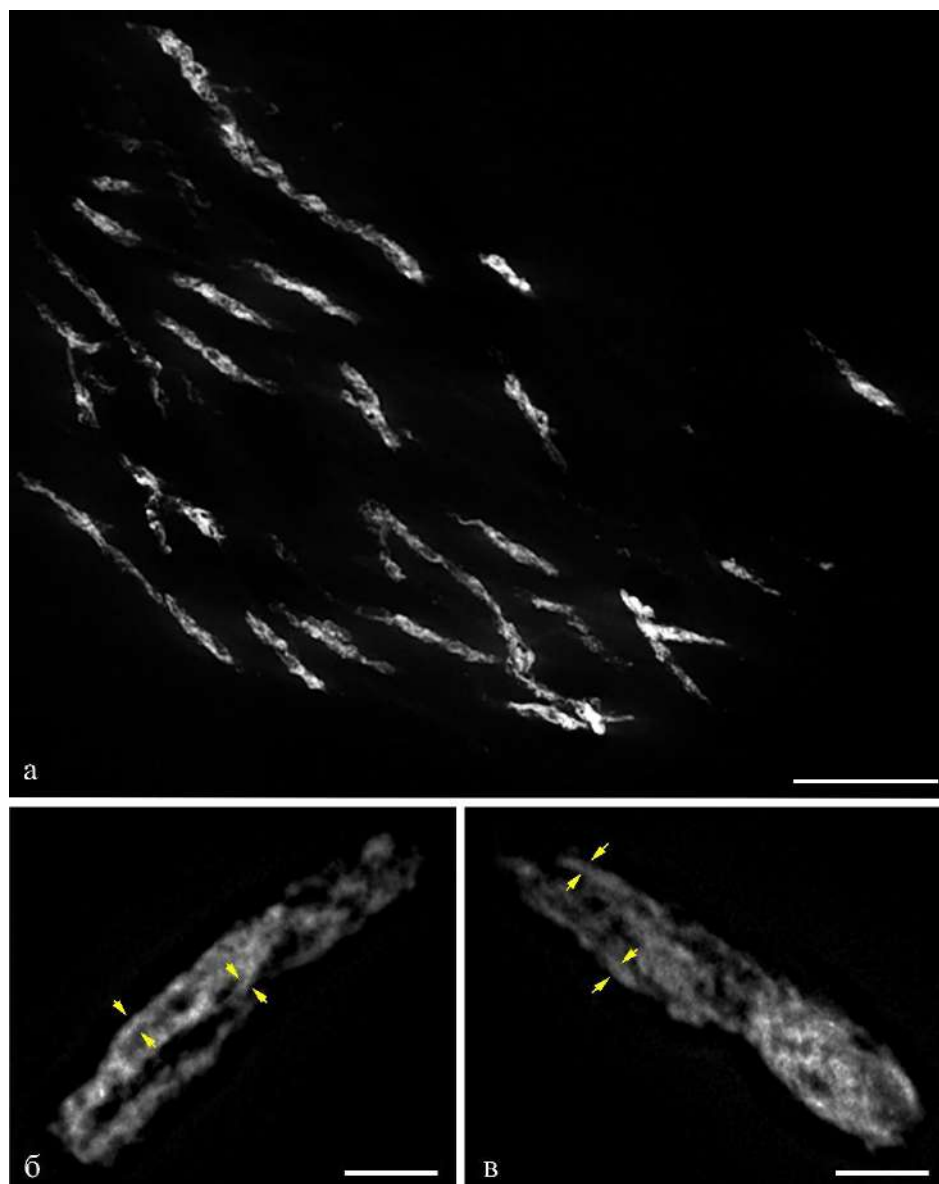


Рис.52. Выделенные политенные хромосомы антиподальных клеток. Желтые стрелки указывают на хроматиды в составе политенных хромосом. Окраска DAPI. Масштабный отрезок 10 мкм.

Анализ структуры политенной хромосомы антиподальных клеток показывает, что тело хромосомы построено из параллельно расположенных хроматид, образованных двумя тонкими переплетающимися фибриллами. Хроматиды, переплетаясь между собой, образуют крупные цепочки (рис. 53, а-к). В дальнейшем все фибриллы, образующие плечо хромосомы, подвергающиеся дополнительной спирализации (рис. 54).

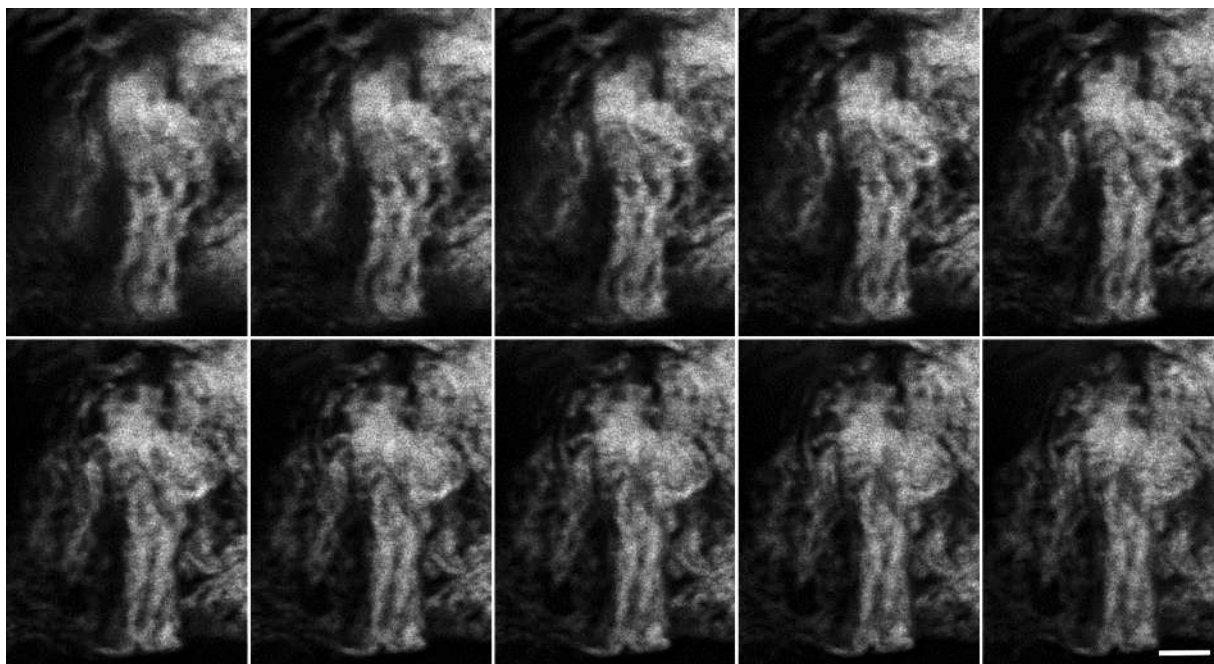


Рис.53. 10 последовательных оптических срезов хроматид в составе фрагмента длинного плеча политенной хромосомы антиподальной клетки на стадии дифференцировки. DAPI, Z-стэк, шаг сканирования 0, 2 мкм. а-в – индивидуальные фибриллы хромосомы, г-к – переплетение фибрилл хромосом. Масштабный отрезок – 1 мкм.

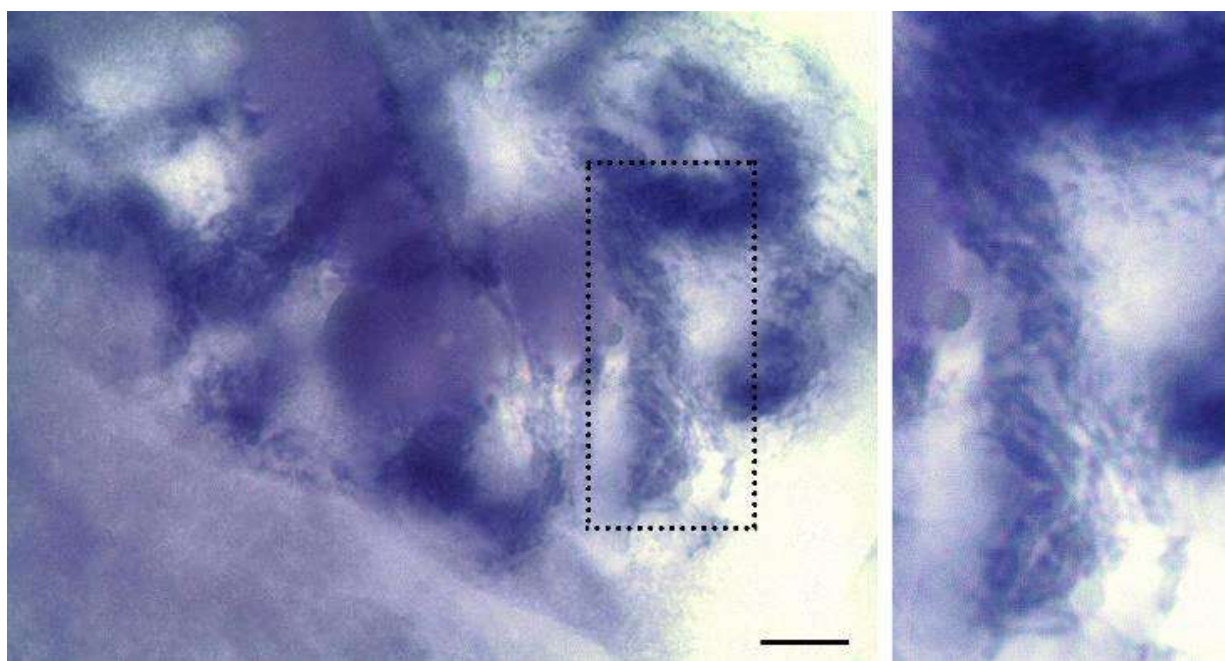


Рис.54. Политенные хромосомы антиподальных ядер на стадии дифференцировки. Окраска гематоксилином Каррачи. На врезках – спирализация плеча политенной хромосомы. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Методом FISH были выявлены теломерные участки хромосом на выделенных хромосомах и в ядрах антиподальных клеток и в составе интактных ядер эндосперма.

Меченные флуорохромом зонды позволили локализовать теломерные участки хромосом интерфазных (рис. 55, а, б) и митотических (рис.56) клеток эндосперма зародышевых мешков. В интерфазных ядрах эндосперма наблюдалось раббл-расположение хромосом, соответственно все теломеры выявлялись с одной стороны ядра.

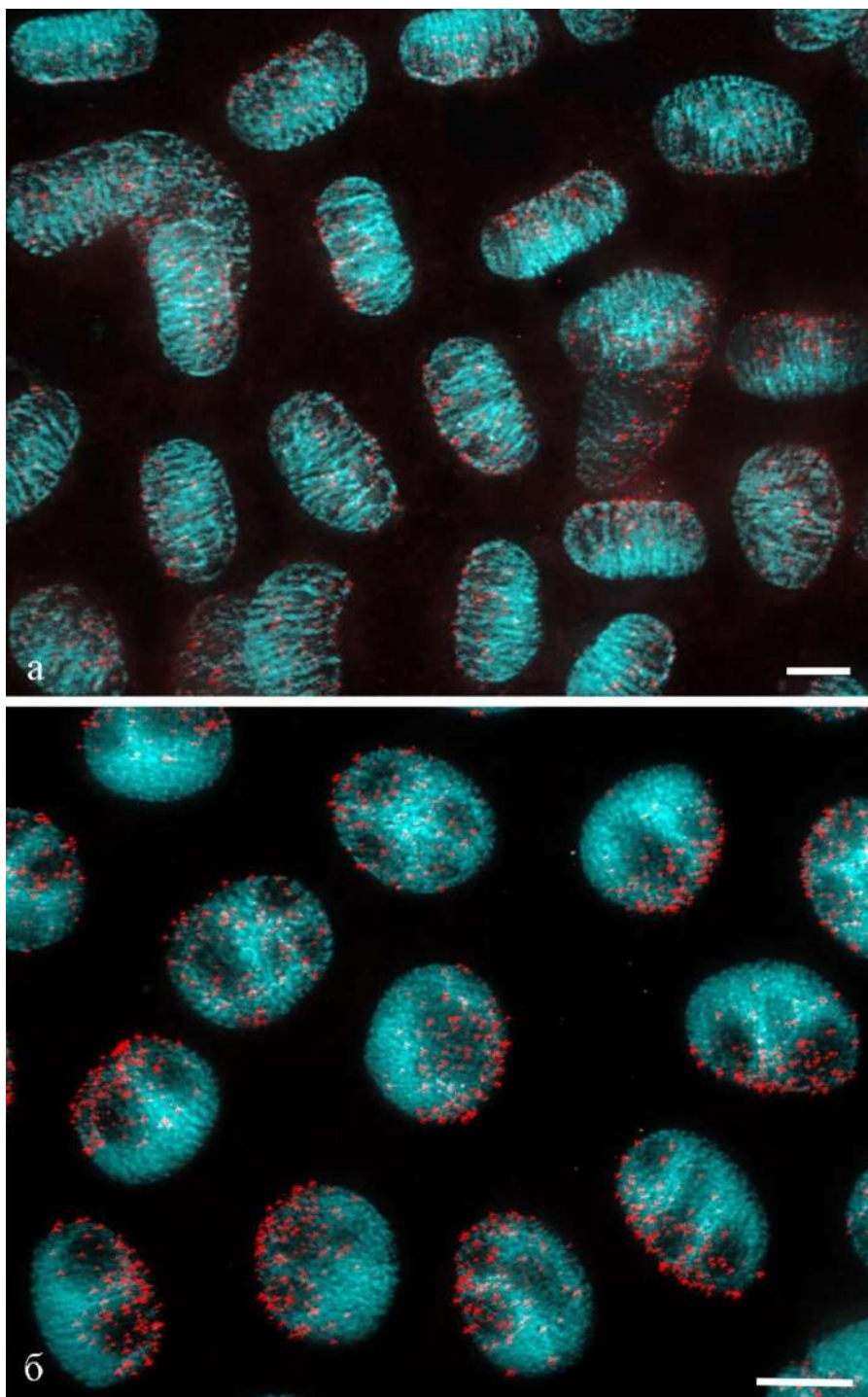


Рис. 55. Теломерные участки хромосом интерфазных ядер эндосперма на стадиях G1 (а) и G2 (б), выявленные с помощью FISH-гибридизации. Голубой – ДНК (DAPI), красный – теломерные участки хромосом. Масштабный отрезок 15 мкм.

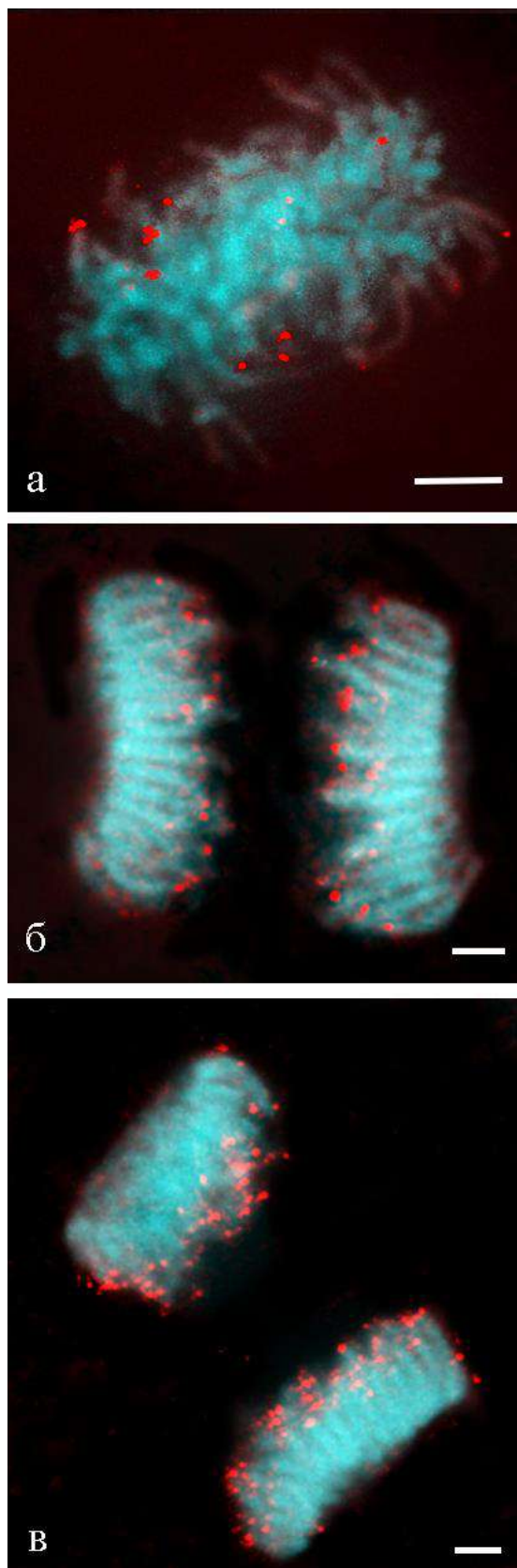


Рис. 56. FISH-гибридизация теломерных участков хромосом митотических клеток эндосперма, метафаза (а), Z-проекция, 34 оптических среза, шаг 0,25 мкм, анафаза (б, в), Z-проекция, 42 оптических среза, шаг 0,25 мкм. Голубой – ДНК (DAPI), красный – теломерные участки хромосом. Масштабный отрезок - 5 мкм.

Во всех изученных анафазных клетках (100 клеток), отснятых z-стэками и пространственно реконструированных, теломерные участки хроматид маркировались двумя сигналами после проведения FISH-гибридизации (рис.57, б), что свидетельствует о том, что каждая хроматида хромосомы растений состоит из двух субхроматид (рис. 57, а).

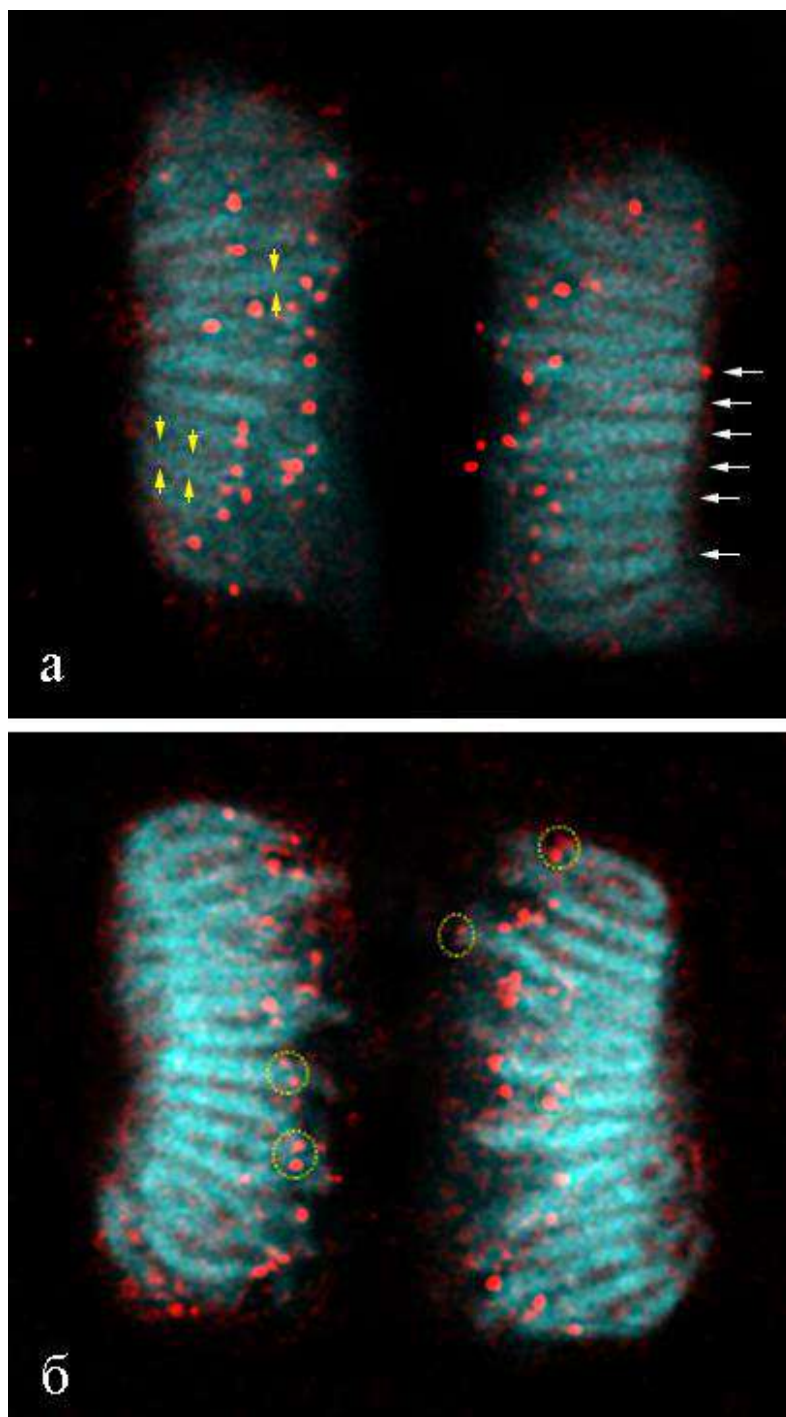


Рис. 57. FISH-гибридизация теломерных участков хромосом митотических клеток эндосперма, анафаза. Голубой – ДНК (DAPI), красный – теломерные участки хромосом. а – хроматиды (белые стрелки) и их субъединицы (желтые стрелки). б – два зонда на концах хроматиды (желтые круги).

Многочисленные метки в теломерных участках плеч политенных хромосом маркируют отдельные хроматиды в составе политенных хромосом. На стадии ранней дифференцировки в ядрах с неиндивидуализованными политенными хромосомами все меченные теломерные повторы локализируются вблизи друг друга (рис. 58, а, б).

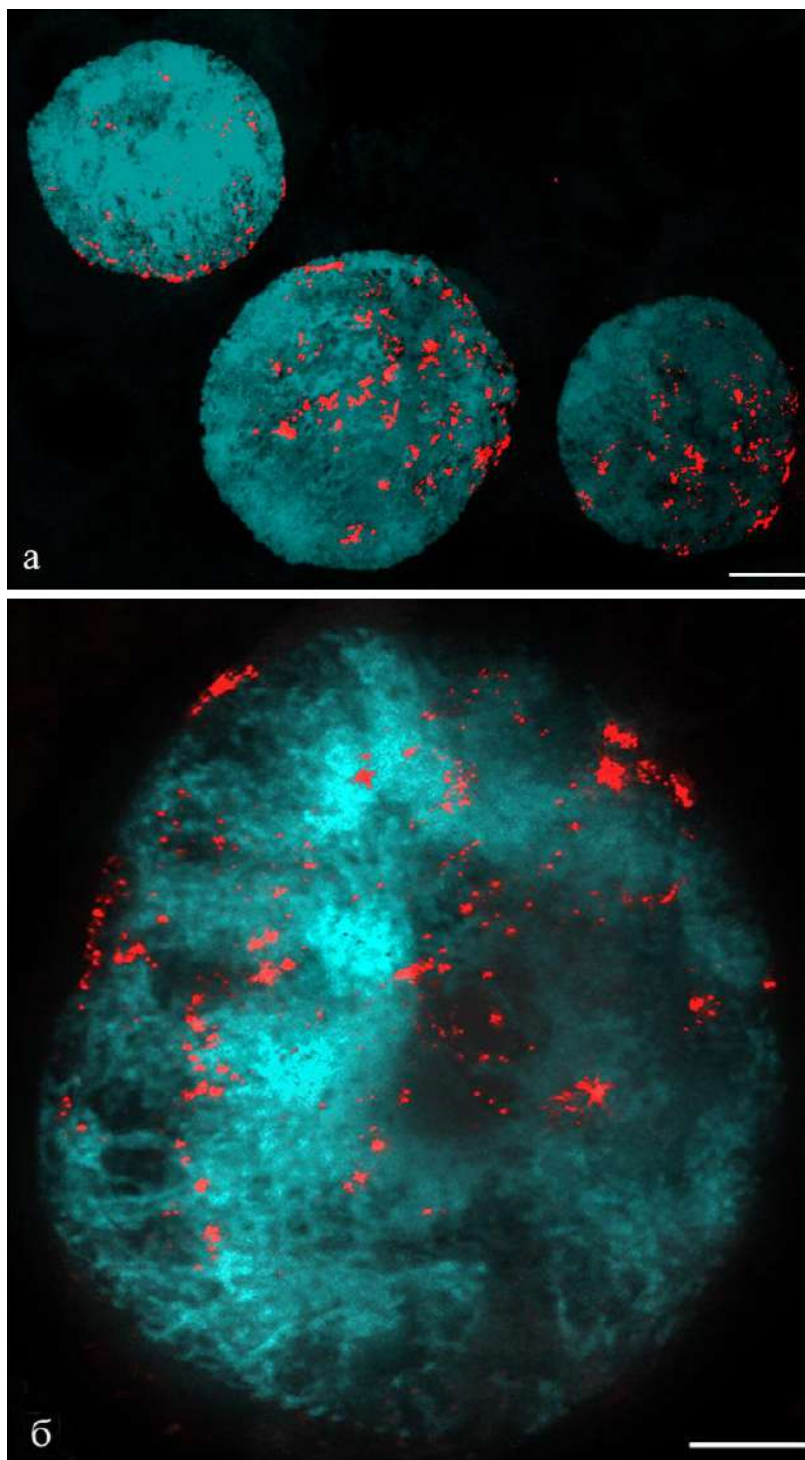


Рис. 58. Теломерные участки политенных хромосом в антиподальных ядрах на ранней стадии дифференцировки. DAPI (голубой), FISH (красный). а - 3D реконструкция, 40 оптических срезов, шаг 0,25 мкм; б - 3D реконструкция, 47 оптических срезов, шаг 0,25 мкм. Масштабный отрезок - 10 мкм.



На поздней стадии дифференцировки в ядрах наблюдали обособленные политенные хромосомы, у которых теломерные повторы выявлялись в областях концов плеч хромосом (рис. 59).

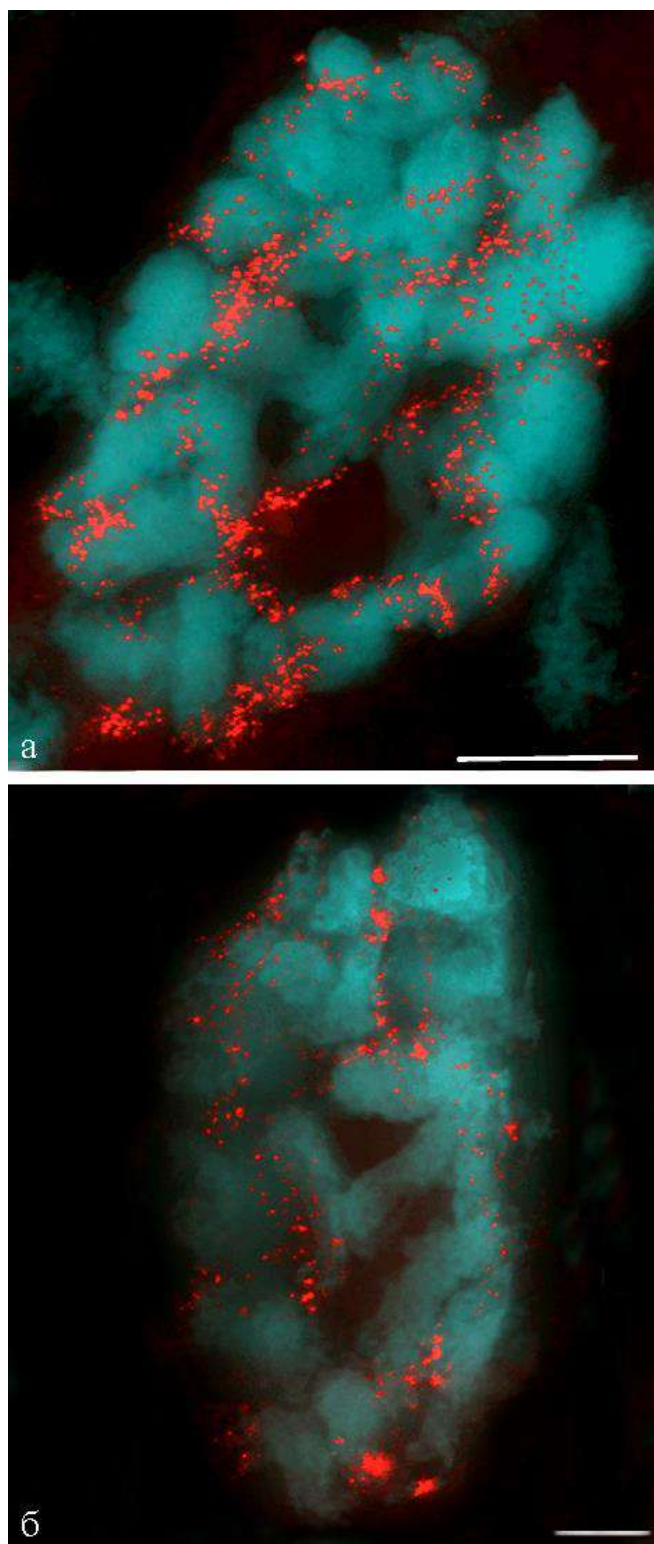


Рис. 59. Теломерные участки политенных хромосом в антиподальных ядрах на поздней стадии дифференцировки. DAPI (синий), FISH (красный). а, б – отдельные оптические срезы, в - 3D реконструкция, 41 оптический срез, шаг 0,25 мкм, г - 3D реконструкция, 47 оптических срезов, шаг 0,25 мкм. Масштабный отрезок - 10 мкм.

В теломерных областях политенных хромосом хроматиды не были объединены, формировали веерообразную структуру и по отдельности контактировали с ядерной оболочкой (рис.60). Такая картина была особенно выражена на стадии средней дифференцировки. На стадии гибели теломерные повторы занимали локальные области в составе объединенных хромосомных территорий.

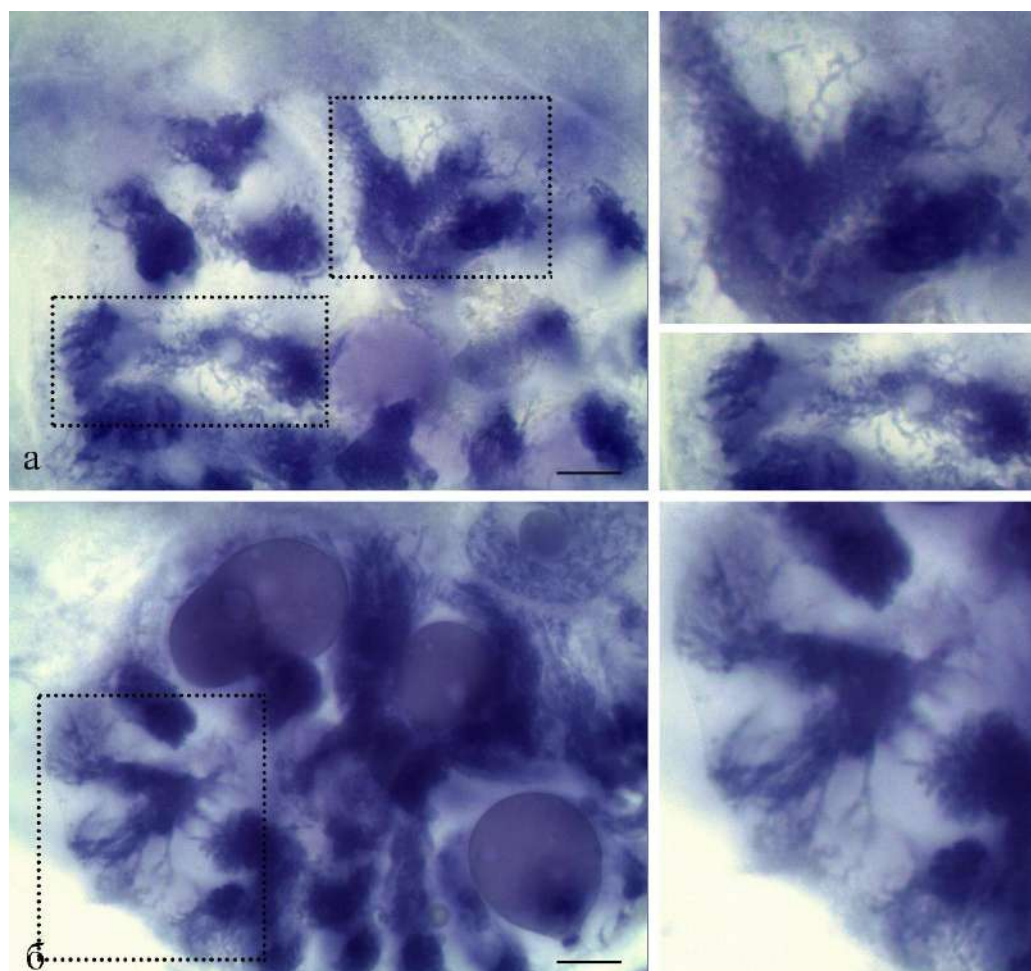


Рис.60. Теломерные участки политенных хромосом антиподальных клеток на стадии дифференцировки. Окраска гематоксилином Каррачи. Масштабный отрезок – 10 мкм.

#### 4.2.4. Ядрышки антиподальных клеток оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешков

С помощью окрашивания ядер антиподальных клеток гематоксилином Каррачи, Ag-Nor окрашивания аргентофильных белков ядрышка (рис. 61, а, б, в) и иммуноцитохимического выявления мажорного белка ядрышка фибрилларина (рис. 62, а – д), показано, что ядра на всех стадиях дифференцировки содержат от одного до четырех гигантских ядрышек и несколько зон локализации мини-ядрышек (латентные ядрышковые организаторы).

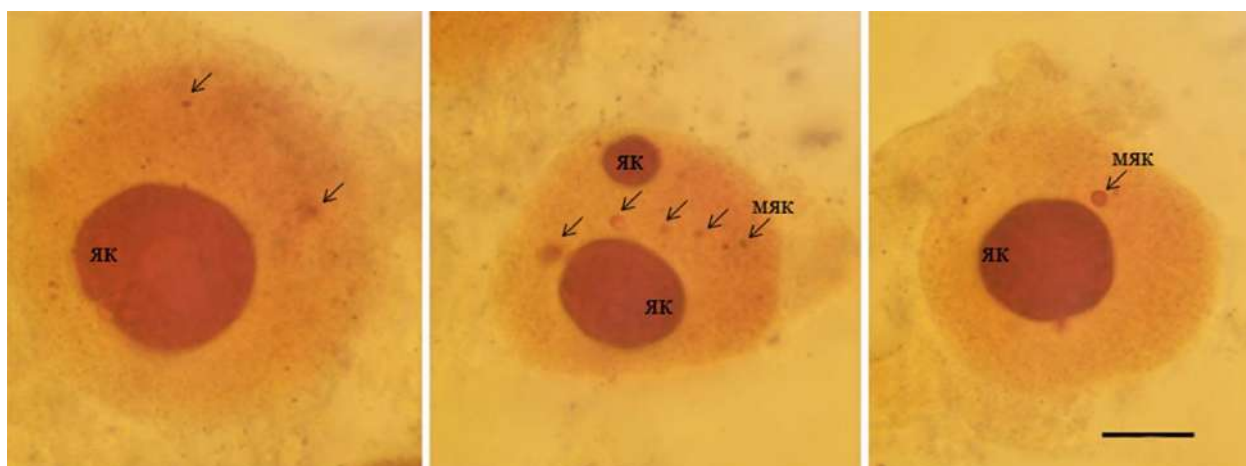


Рис. 61. Локализация ядрышек в антиподальных клетках на стадии дифференцировки. Ag-Nor окрашивание. ЯК – ядрышки, мяк – мини-ядрышки. Масштабный отрезок – 20 мкм.

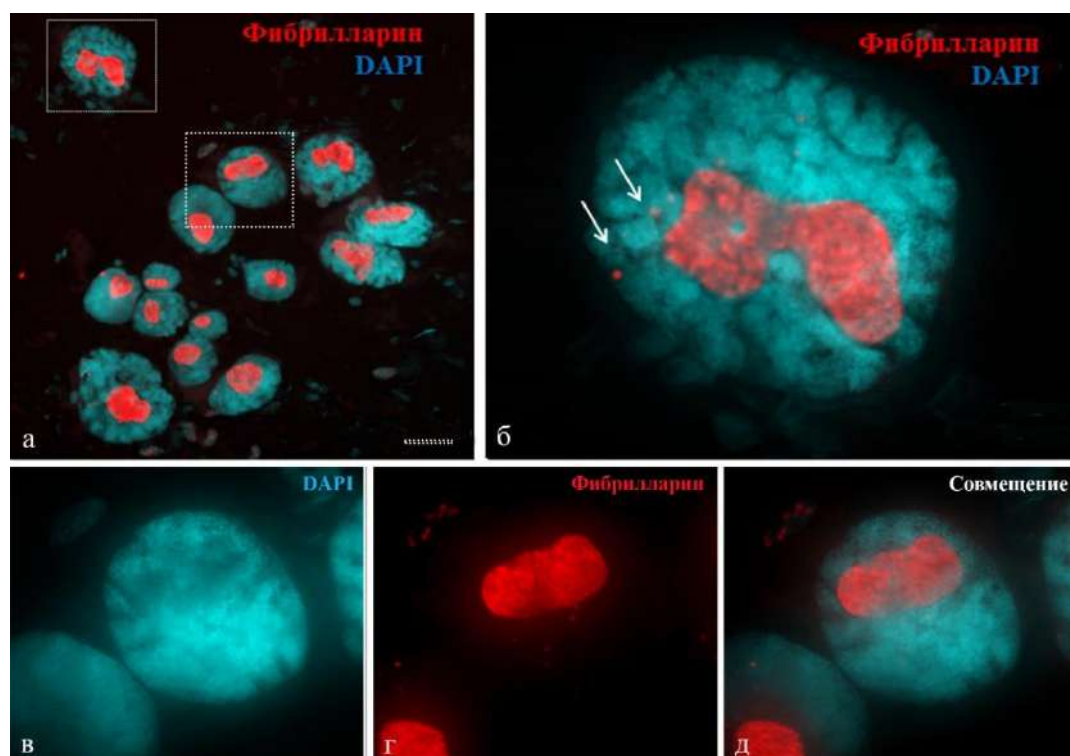


Рис. 62. Локализация ядрышек в антиподальных клетках на стадии дифференцировки. Иммуноцитохимическое выявление фибрилларина. ДНК окрашена DAPI. Стрелки указывают на зоны локализации мини-ядрышек. Масштабный отрезок – 30 мкм.

Для стадии гибели антиподального комплекса характерно наличие многочисленных лакун разного размера между хроматидами политенных хромосом (рис. 63).

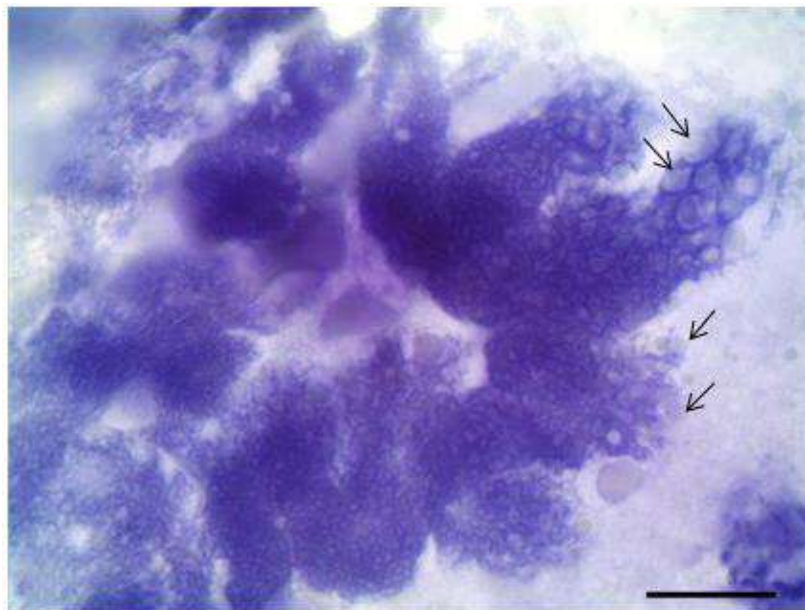


Рис. 63. Ядро антиподальной клетки на стадии гибели. Лакуны (стрелки) в телах политенных хромосом. Окраска гематоксилином. Масштабный отрезок – 30 мкм.

На стадии гибели выявлена сегрегация отдельных компонентов ядрышка и перераспределение их в тела политенных хромосом. Сегрегированные компоненты ядрышка выявляются в лакунах политенных хромосом ядер антиподального комплекса в виде агрегатов различного размера и формы (рис. 64, а, б).

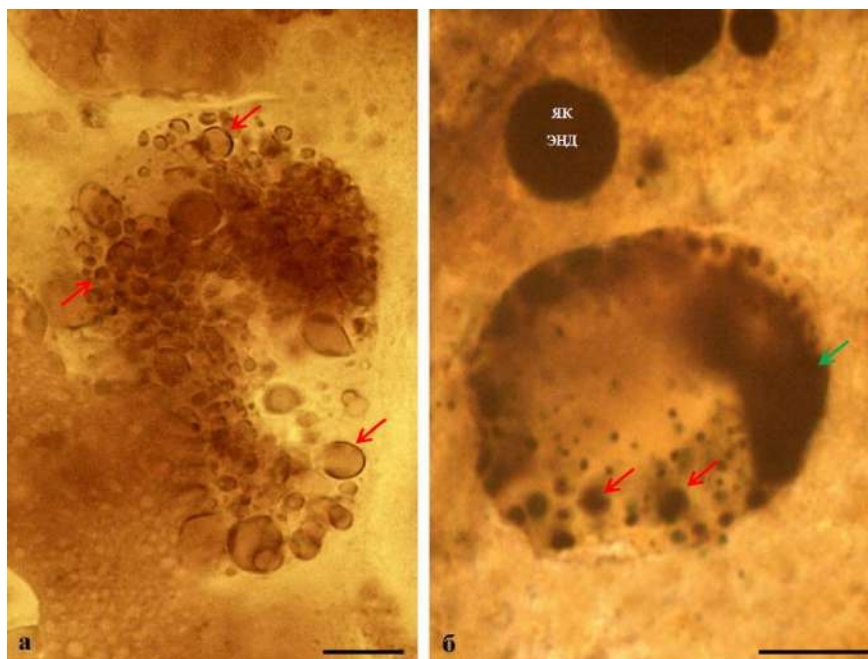


Рис. 64. Аргентофильные белки в составе дефинитивного ядрышка (зеленая стрелка) и сегрегированных компонентов ядрышка (красные стрелки) ядер антиподальных клеток базального яруса (а, б). Ag-Nor окрашивание белков. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Это могут быть как крупные, так и мелкие круглые, овальные или неправильной формы глобулы. В этих структурах нам удалось выявить некоторые формирующие их компоненты. Аргентофильные белки ядрышка, после Ag-NOR окрашивания, выявляются на поверхности глобул, локализованных в телах политенных хромосом, в виде ровного слоя или формируя одну – две «шапочки» (рис. 65, б, в). Покрытые аргентофильными белками глобулы упорядочено располагаются в телах политенных хромосом (рис. 65, а). Теломерные участки политенных хромосом, граничащие с ядерной оболочкой, расплетены на хроматиды, между ними выявляются сегрегированные глобулы (рис. 65, г). В цитоплазме антиподальных клеток также выявляются подобные глобулы, покрытые аргентофильными белками (рис. 65, а).

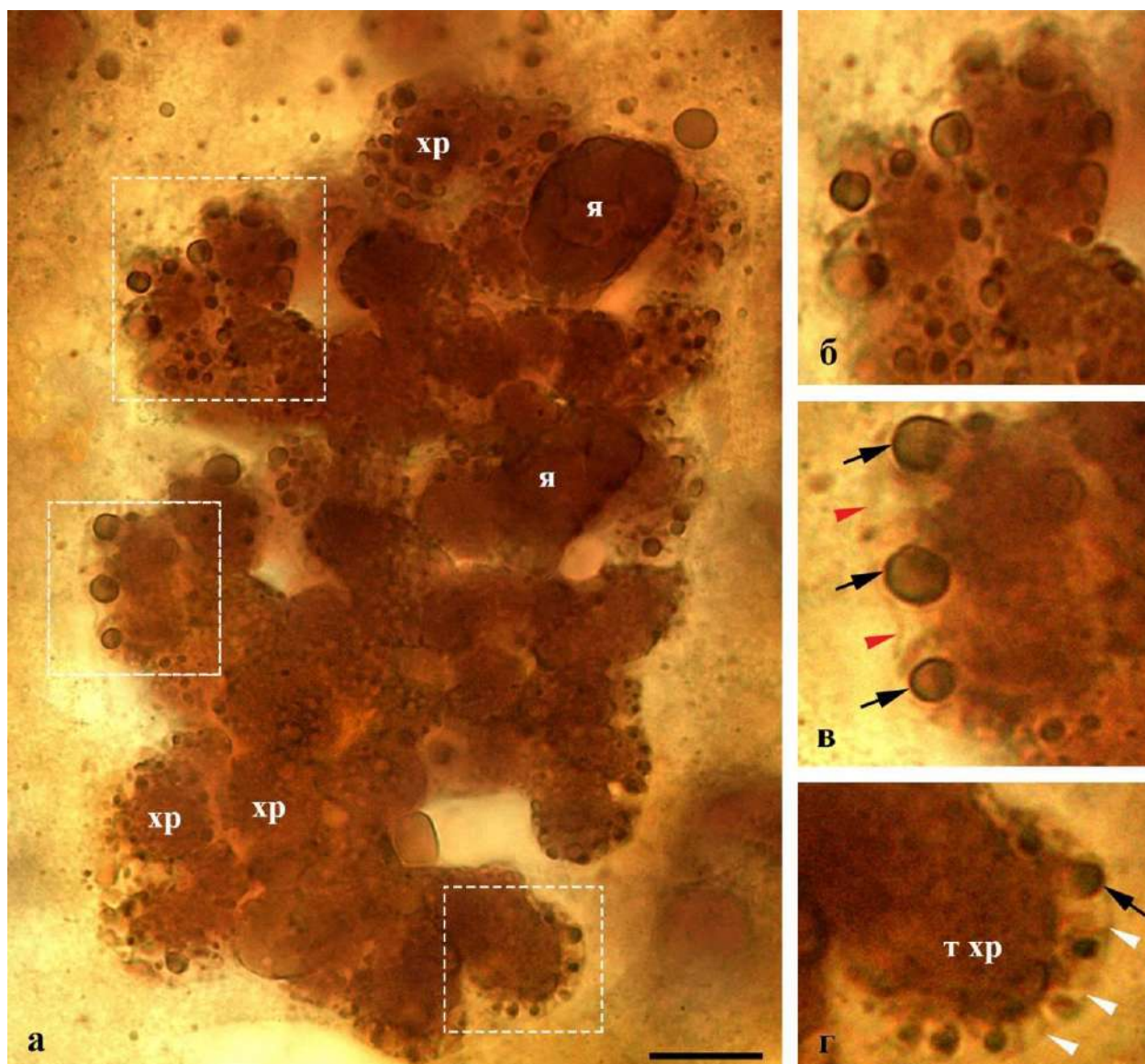


Рис. 65. Аргентофильные белки и РНК в составе сегрегированных компонентов ядрышка в области политенных хромосом ядра. а – политенные хромосомы с сегрегированными компонентами ядрышка (n) (Ag-Nor окрашивание), б, в, г – аргентофильные белки на поверхности сегрегированных компонентов (стрелки). Масштабный отрезок – 10 мкм.

После дифференциального окрашивания ДНК (зеленый) и РНК (красный) акридиновым оранжеем РНК выявляется в ядрышках и в большинстве лакун политенных хромосом (рис. 6б).

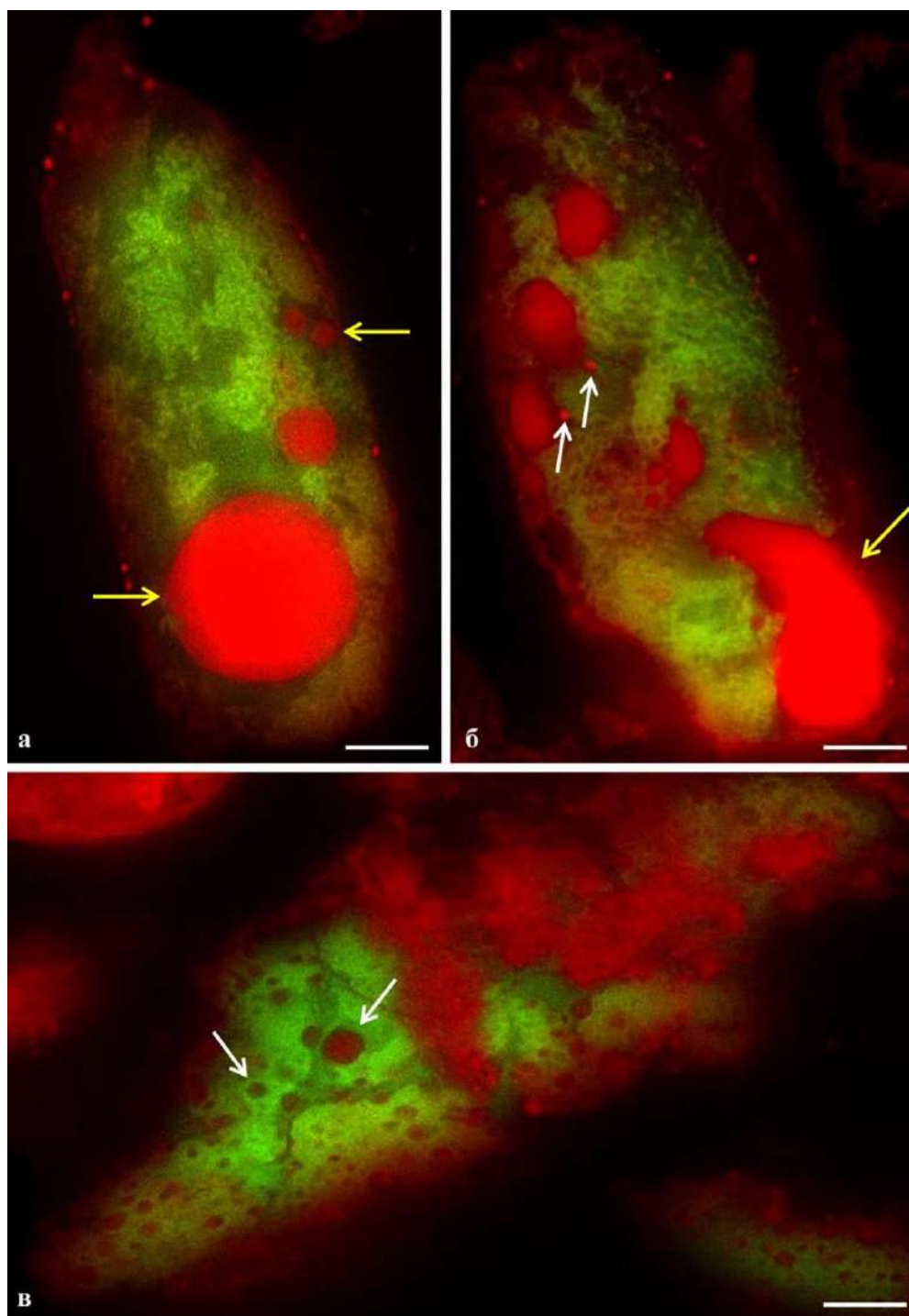


Рис. 6б. РНК в цитоплазме (красные области), области ядрышка и политенных хромосом антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели, окрашивание 0,01% акридиновым оранжеем. ДНК хроматид политенных хромосом зеленая. РНК ядрышка (а, б, желтые стрелки) и РНК-содержащие компоненты в лакунах политенных хромосом (б, в, белые стрелки). Масштабный отрезок - 10 мкм.

С помощью иммуноцитохимического окрашивания в ядрах антиподальных клеток выявлен белок плотного фибриллярного компонента ядрышка – фибрилларин (рис. 67).

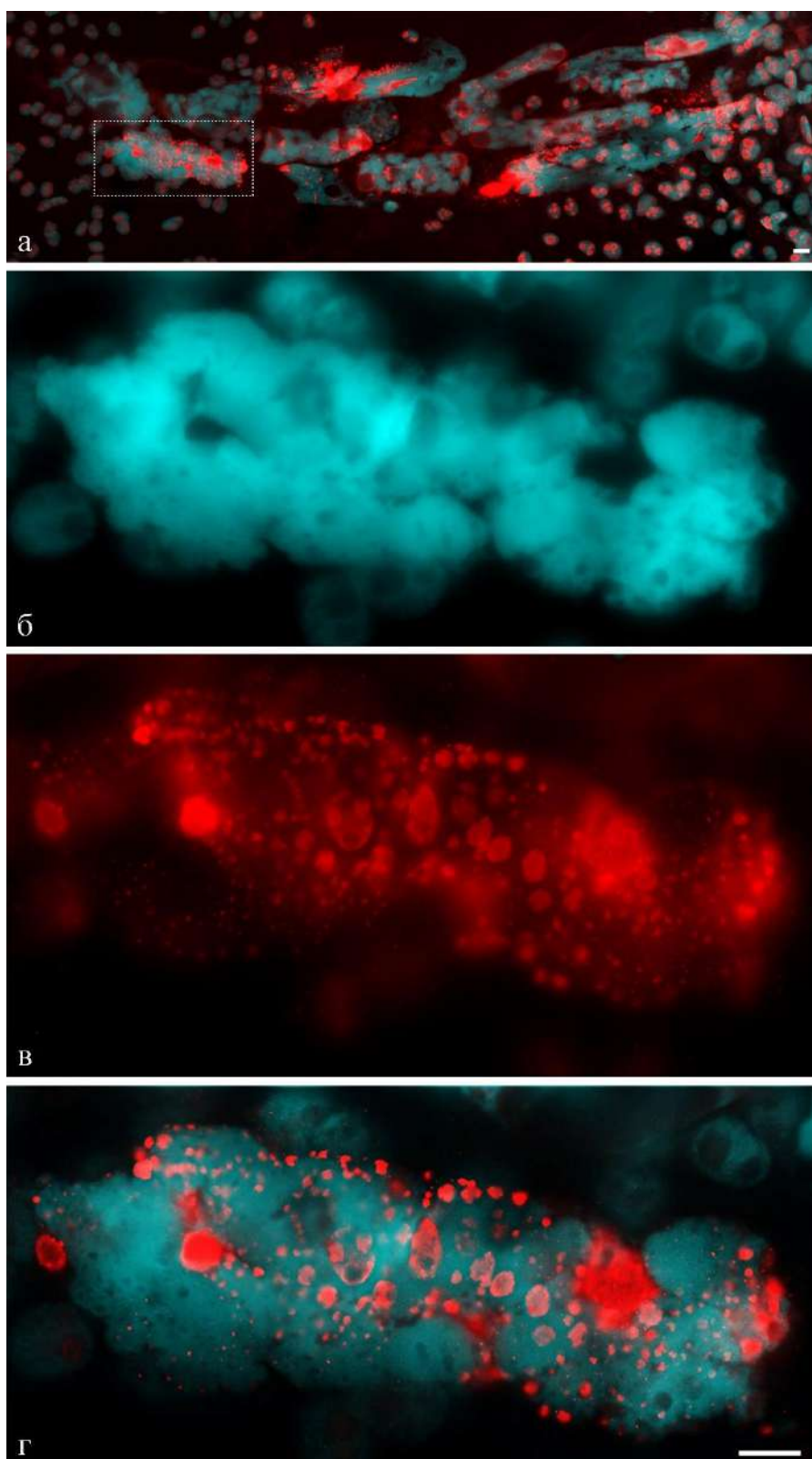


Рис. 67. Фибрилларин в ядрах антиподальных клеток на стадии гибели. ДНК, (DAPI, голубой), фибрилларин (красный). а – общий вид комплекса, б – плотный хроматин с лакунами, DAPI; в – фибрилларин в ядрышках и сегрегированных тельцах; г – совмещение, локализация фибрилларина в ядрышках и лакунах хроматина. Масштабный отрезок – 10 мкм.

В некоторых ядрах комплекса фибрилларин локализован в области ядрышка (рис. 68, а), в других, как в ядрышке, так и в лакунах политенных хромосом (рис. 68, а, б). В части ядер фибрилларин не выявляется в дефинитивном ядрышке, а лишь в сегрегатах на поверхности и в лакунах политенных хромосом (рис. 68, в, г). При этом фибрилларин формирует большие и мелкие агрегаты неправильной формы. Часть лакун хромосом не содержит РНК и фибрилларина. Перераспределение материала ядрышка в ходе ПКГ выявлено во всех ядрах клеток антиподального комплекса.

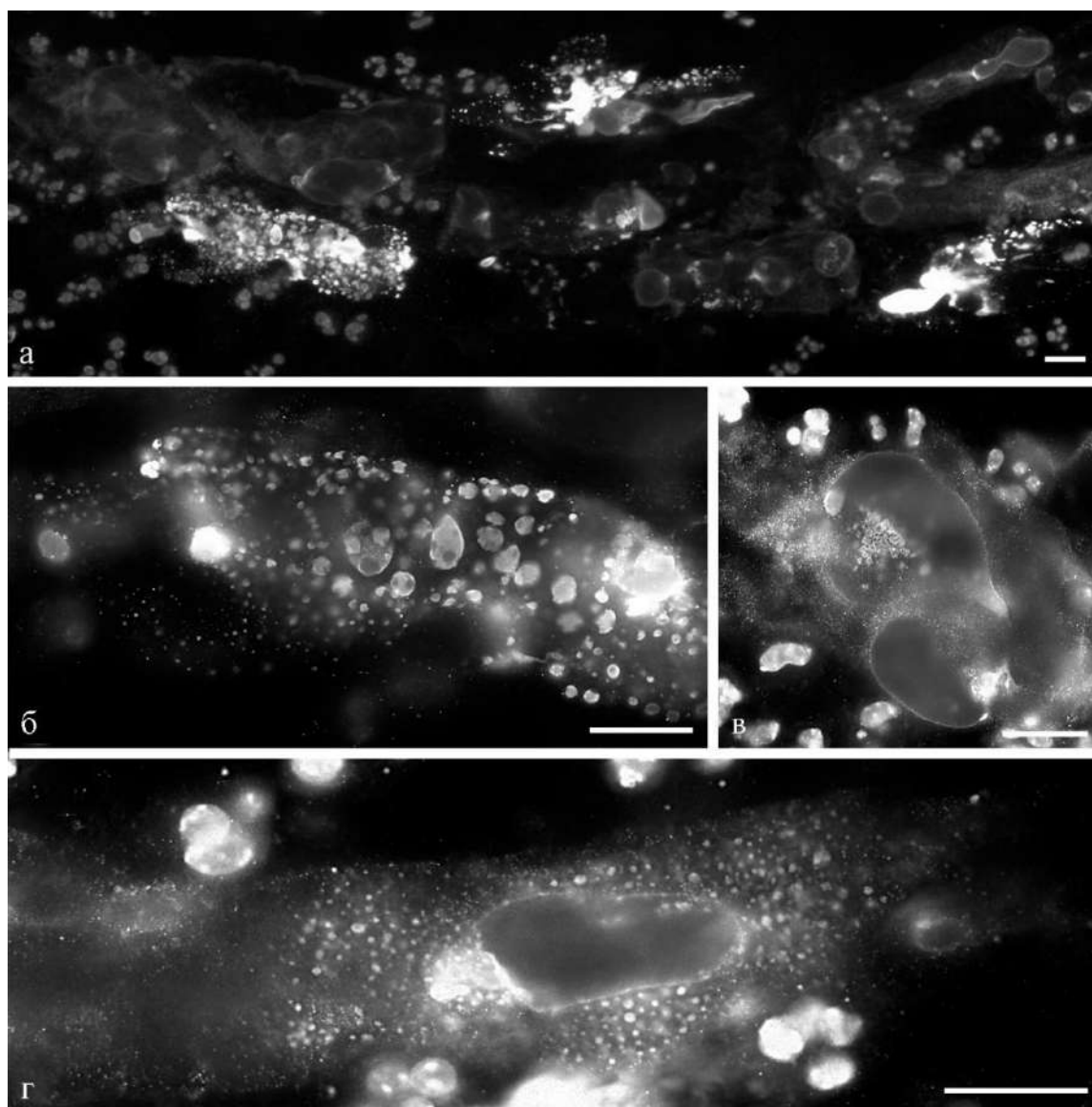


Рис. 68. Фибрилларин в ядрышке ядер на стадии гибели некоторых клеток комплекса – а, б, на периферии ядрышка - в, г, и сегрегированных глобулах разного размера в лакунах хромосом - а, б, в, г. ДНК, (DAPI, голубой), фибрилларин (красный). Масштабный отрезок – 10 мкм.

В ядрах клеток неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки также выявлялись 1-4 ядрышка, сохранявшиеся вплоть до поздних стадий гибели. Сегрегации компонентов ядрышка в антиподальных клетках неоплодотворенных зародышевых мешков не происходило.



#### 4.2.5. Разрывы ДНК, выявляемые методом TUNEL в ядрах антиподальных клеток оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешков

На стадии гибели антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков методом TUNEL выявляются 3'-концевые разрывы ДНК (рис. 69). На начальных стадиях гибели некоторые ядра антиподальных комплексов не содержат разрывов. В одних ядрах антиподального комплекса разрывы затрагивают только часть хромосом ядра, их определенную область (рис. 69, а-в). В других ядрах разрывы затрагивают все хромосомы ядра (рис. 69, г-е). В клетках с объединенными хромосомными территориями разрывы выявляются во всем объеме хроматина (рис. 69, ж-и).

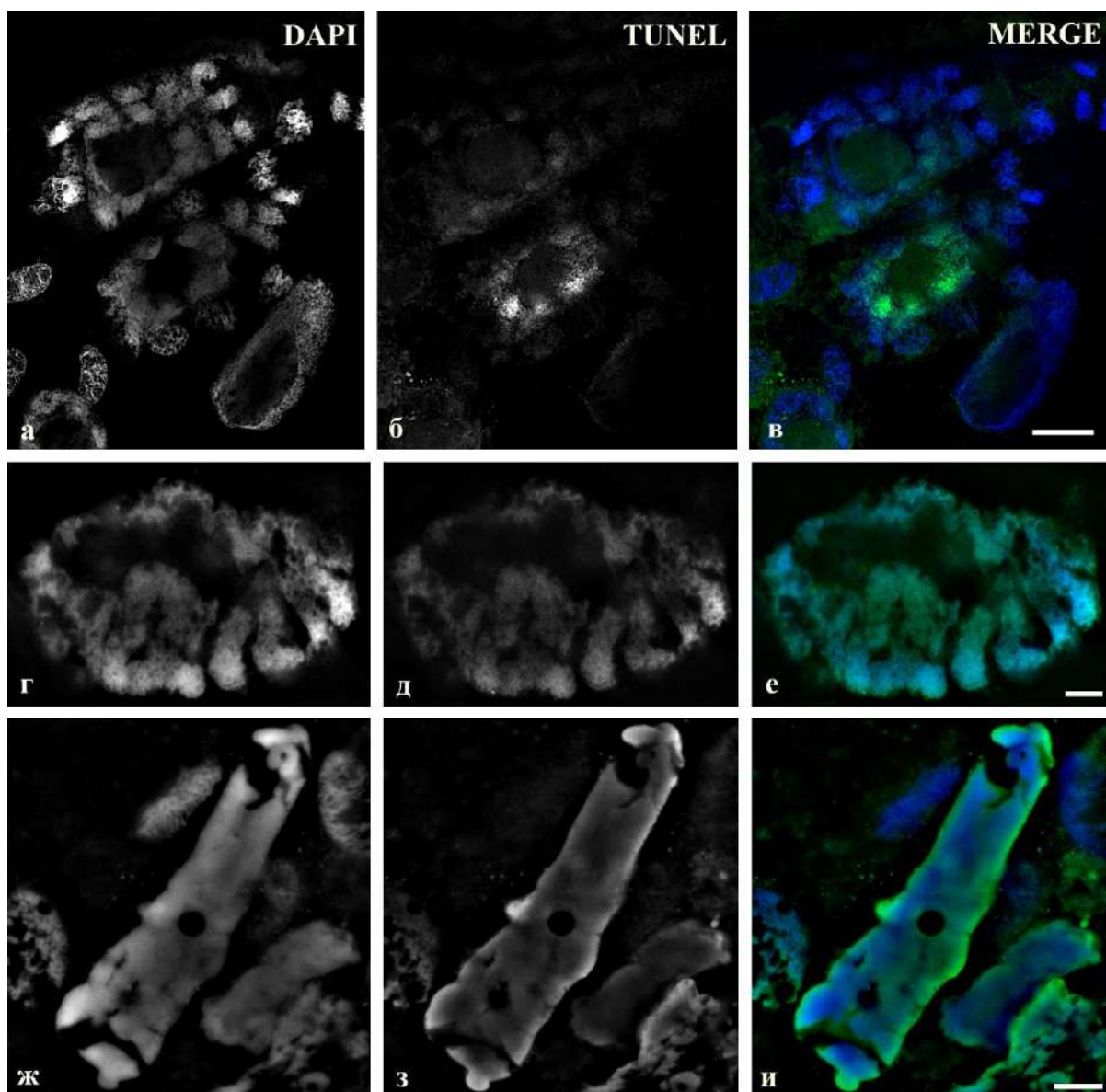


Рис. 69. Разрывы в ДНК политенных хромосом ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии гибели, метод TUNEL. а, б, в – локализация разрывов в некоторых хромосомах ядер, г, д, е – локализация разрывов во всех хромосомах ядра, ж, з, и – локализация разрывов в ядре с объединенными хромосомами. Масштабный отрезок – 10 мкм.

На начальном и среднем этапах гибели антиподальных клеток локализация и размеры областей разрывов в ядрах комплекса различаются (рис. 69, а-и). На финальной стадии гибели разрывы выявляются во всем объеме хроматина ядер рис. 70, а-г).

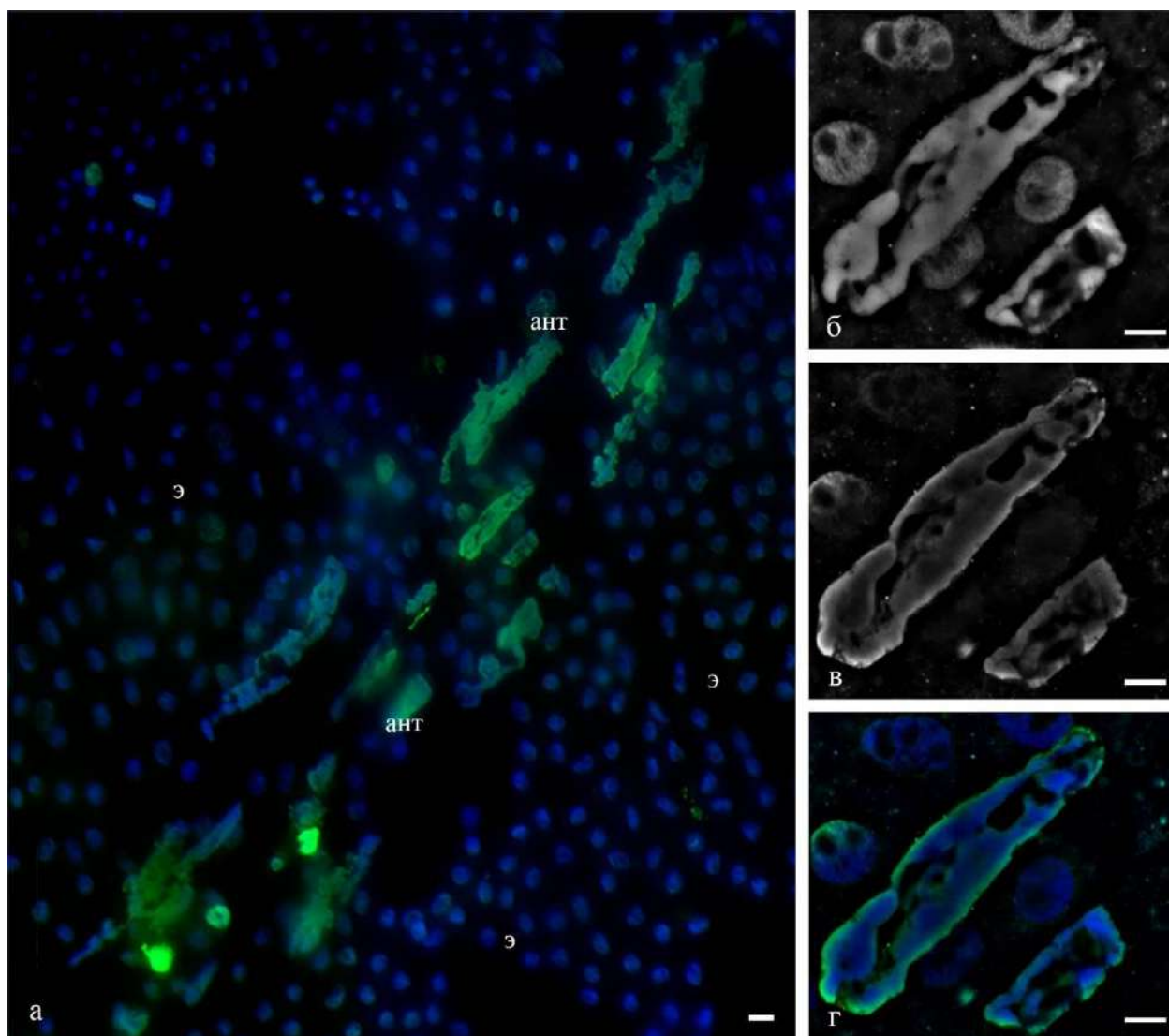


Рис. 70. Разрывы в ДНК поличенных хромосом в ядрах антиподального комплекса пшеницы, выявленные методом TUNEL на стадиях их ПКГ. Ядра антиподального комплекса с различной степенью повреждения ДНК (а), большинство разрывов выявлены в ДНК на периферии ядра (б, в, г), или выявляются во всем объеме ядра (а). Масштабный отрезок - 10 мкм.

На стадии гибели антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков методом TUNEL также выявляются 3'-концевые разрывы ДНК. В разных ядрах антиподального комплекса разрывы ДНК локализуются неодинаково. Некоторые ядра не содержат разрывов (рис. 71, а, б).

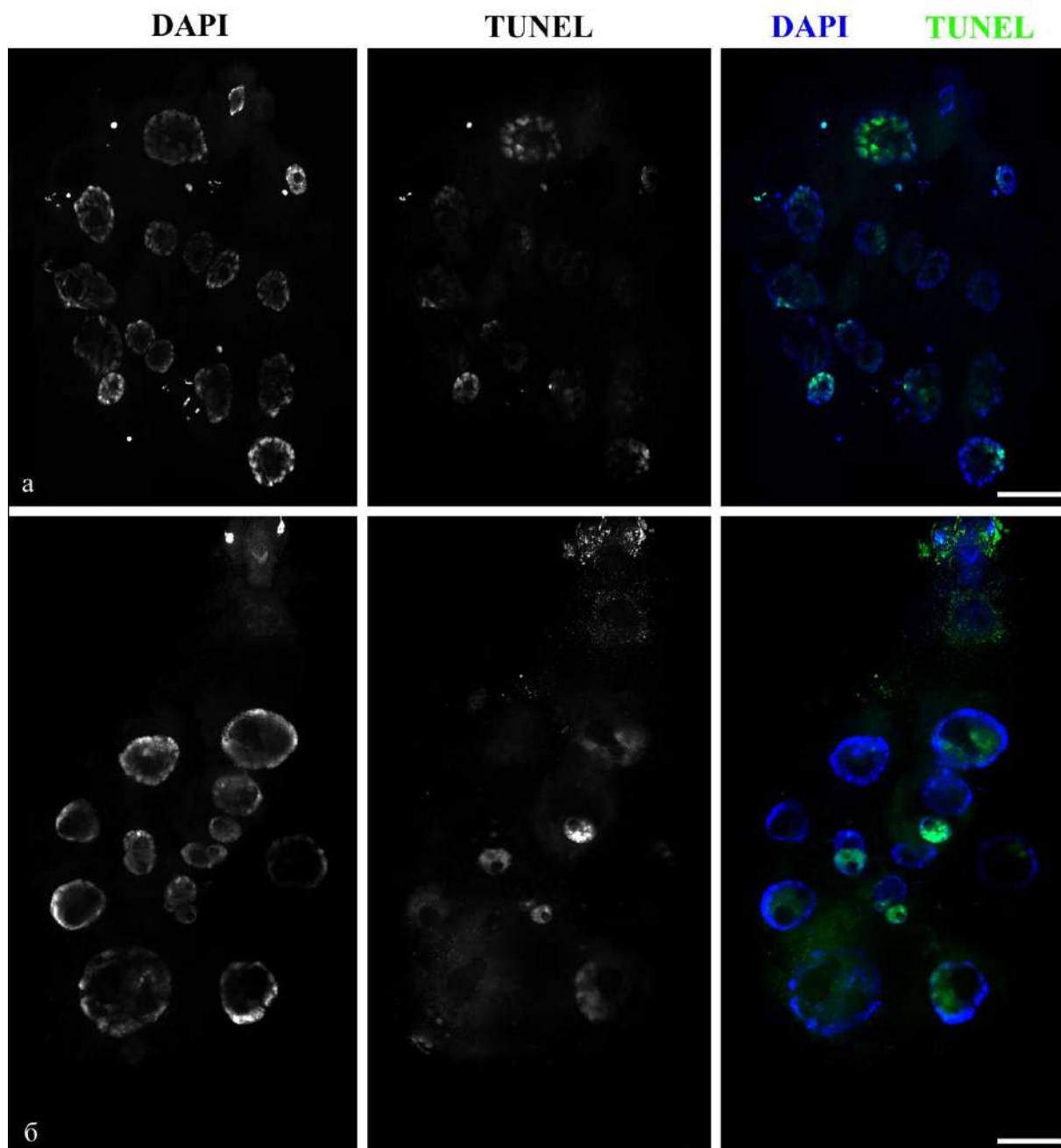


Рис.71. Разрывы ДНК в ядрах клеток антиподальных комплексов (а, б) неоплодотворенных зародышевых мешков на ранней стадии гибели, метод TUNEL. Масштабный отрезок – 100 мкм.

Часто разрывы затрагивают часть хромосом ядра (рис. 72, а, б, в). В ядрах, где разрывы ДНК локализируются в центральной области ядра, вблизи ядрышка, наблюдается деградация хроматина (рис. 72, г). Такая картина наблюдается в ядрах клеток всех ярусов комплекса.

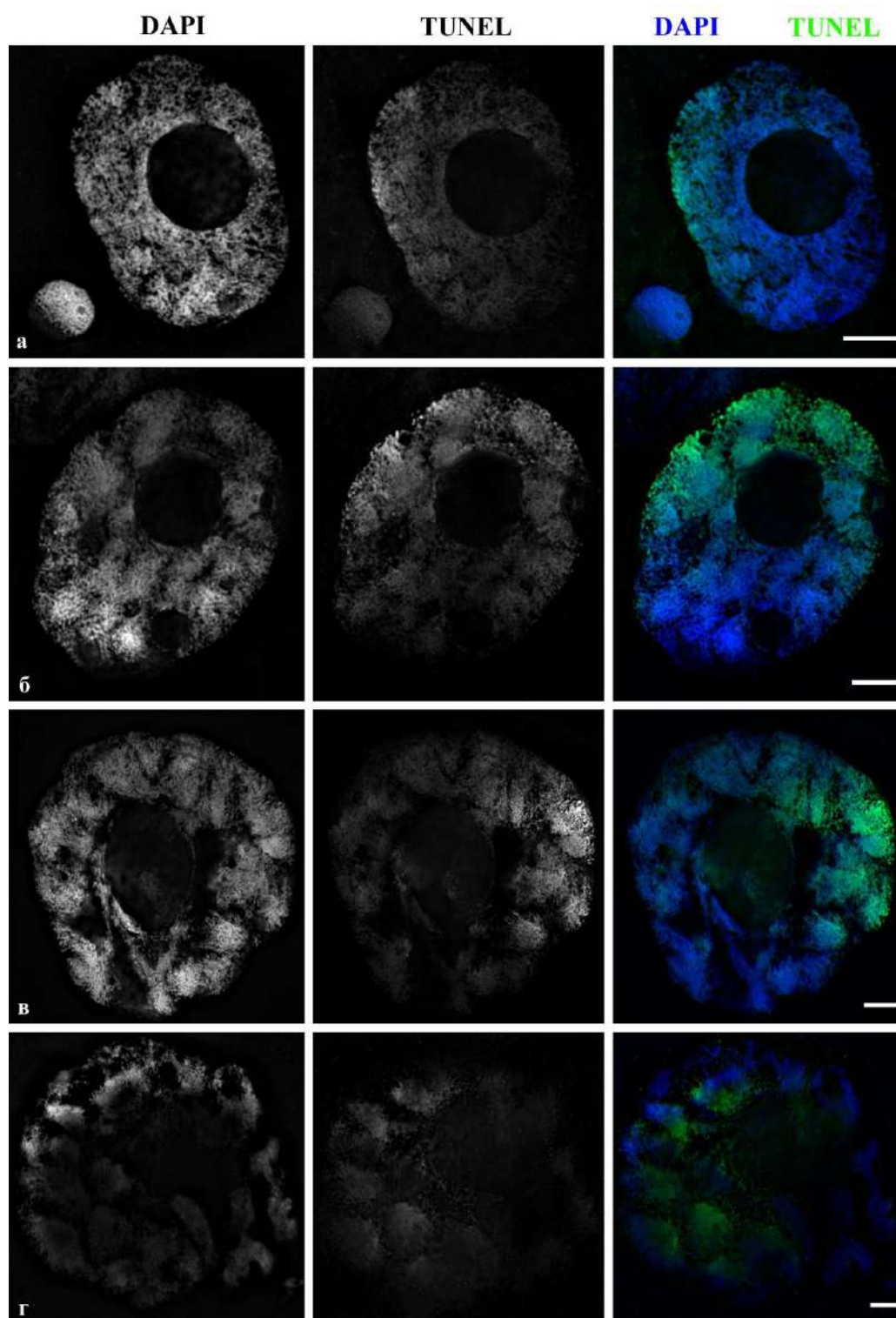


Рис.72. Разрывы ДНК в ядрах антипод неоплодотворенных зародышевых мешков, метод TUNEL. а – ядро клетки базального яруса; б – ядро клетки среднего яруса; в – ядро клетки апикального яруса; г – деградацией хромосом центральной области ядра клетки апикального яруса. Масштабный отрезок – 10 мкм.

#### 4.2.6. Ультраструктура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

Анализ ультраструктуры клеток антиподальных комплексов на стадии дифференцировки и гибели, показал, что в течение всех стадий дифференцировки и гибели ультраструктура основных компонентов антиподальных ядер меняется (рис. 73 а, б, в, г).

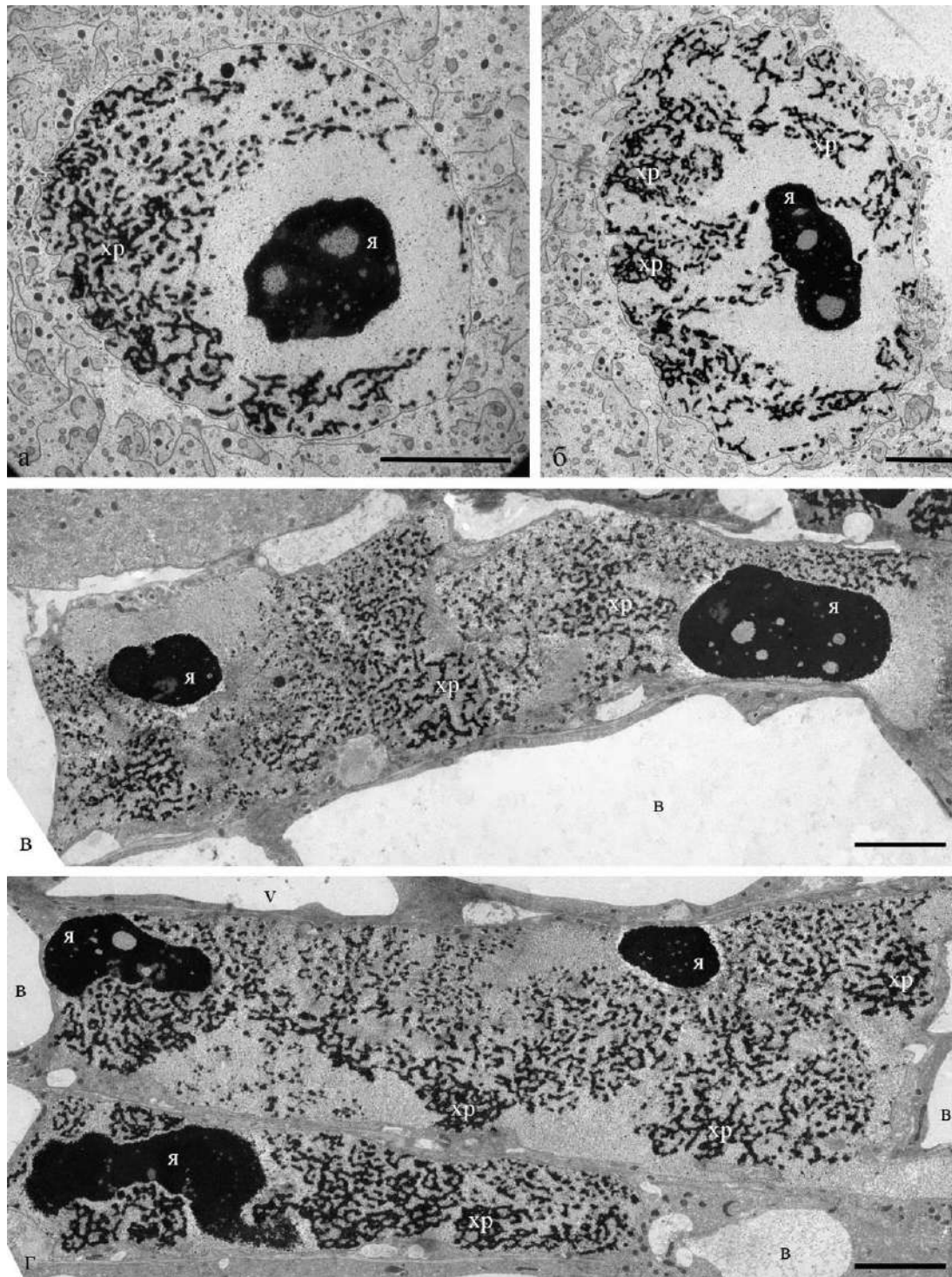


Рис. 73. Ультраструктура ядер антиподальных клеток зародышевых мешков пшеницы на стадиях дифференцировки. Круглые ядра антиподальных клеток на стадии ранней дифференцировки - а; вытянутые ядра антиподальных клеток на средней – б, и поздней стадиях дифференцировки – в, г. хр – политенные хромосомы, я – ядрышко; в - вакуоли. Масштабный отрезок - 10 мкм.

На ранней стадии развития фибриллы хроматина локализованы вблизи ядерной оболочки, вокруг ядрышка выделяется светлый «дворик», ядерная оболочка имеет извилистую форму (рис. 73, а). На средней стадии выявляются глубокие инвагинации, в ядрах заметны области локализации отдельных политенных хромосом (рис. 73, б). На поздней стадии дифференцировки наблюдаются вытянутые ядра с гигантскими ядрышками неправильной формы, хроматиды тел политенных хромосом формируют ячеистую сеть, вблизи ядерной оболочки наблюдаются участки политенных хромосом с разобщенными хроматидами (рис. 73 в, г). На всех этапах дифференцировки в ядрах выявляются гигантские ядрышки с многочисленными гетерогенными фибриллярными центрами, погруженными в обширный плотный фибриллярный компонент, окруженный многочисленными гранулами (рис. 73 а, б, в, г).

Ядерная оболочка пронизана многочисленными поровыми комплексами и образует глубокие инвагинации (рис. 74 а, б).

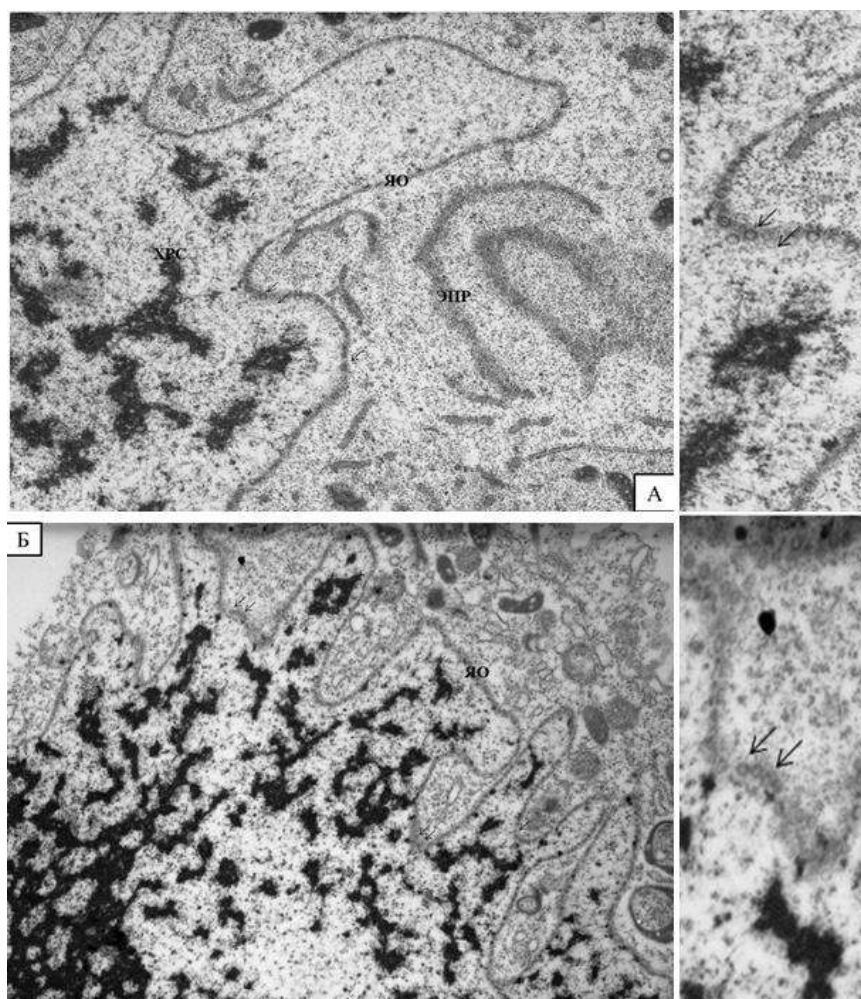


Рис. 74. Инвагинации ядерной оболочки ядер антиподальных клеток. А-антиподальная клетка на стадии средней дифференцировки,  $\times 8000$ , Б-антиподальная клетка на стадии поздней дифференцировки,  $\times 2000$ . ХРС – хромосома, ЯО – ядерная оболочка. Стрелки указывают на поровые комплексы

На ранней стадии дифференцировки в области политенных хромосом выявляются полиморфные структуры, содержащие РНП, ассоциированные с поверхностью политенных хромосом (рис. 75, а, б, в), идентифицированные по методу Бернарда (рис 75, г).

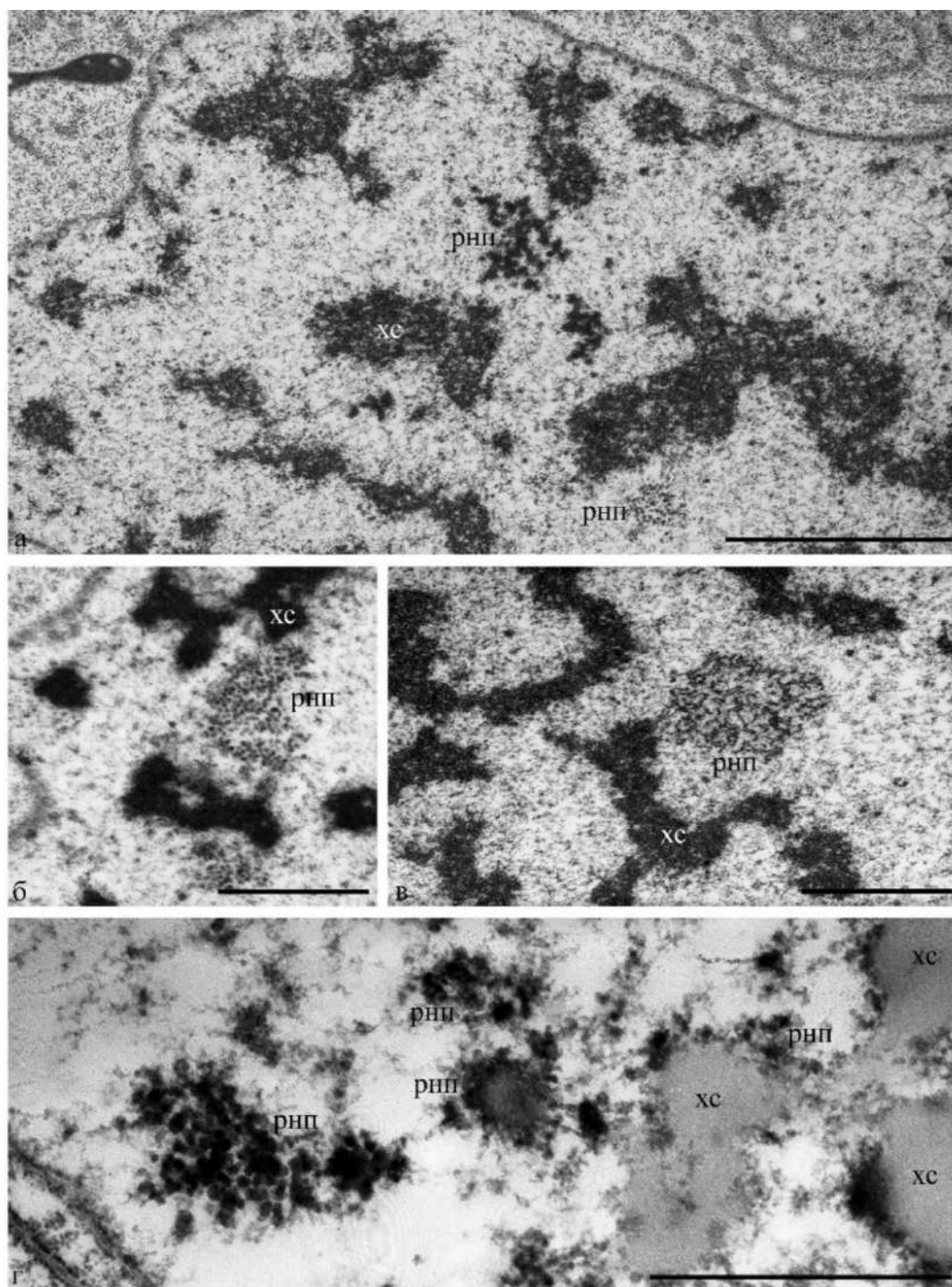


Рис. 75. Полиморфизм структур, содержащих РНП в ядрах клеток антиподальных комплексов на стадии дифференцировки. а–в – структуры, ассоциированные с поверхностью хромосом (стрелки) в ядрах антиподальных клеток. г – РНП ядра антиподальной клетки (метод Бернарда). хс – хромосомы, рнп – рибонуклеопротеиды. Масштабная линейка: а, – 3 мкм; б–г – 1 мкм.

На поздней стадии дифференцировки и начальных этапах гибели многочисленные РНП-содержащие структуры локализуются между петлями хроматид поличенных хромосом (рис. 76).

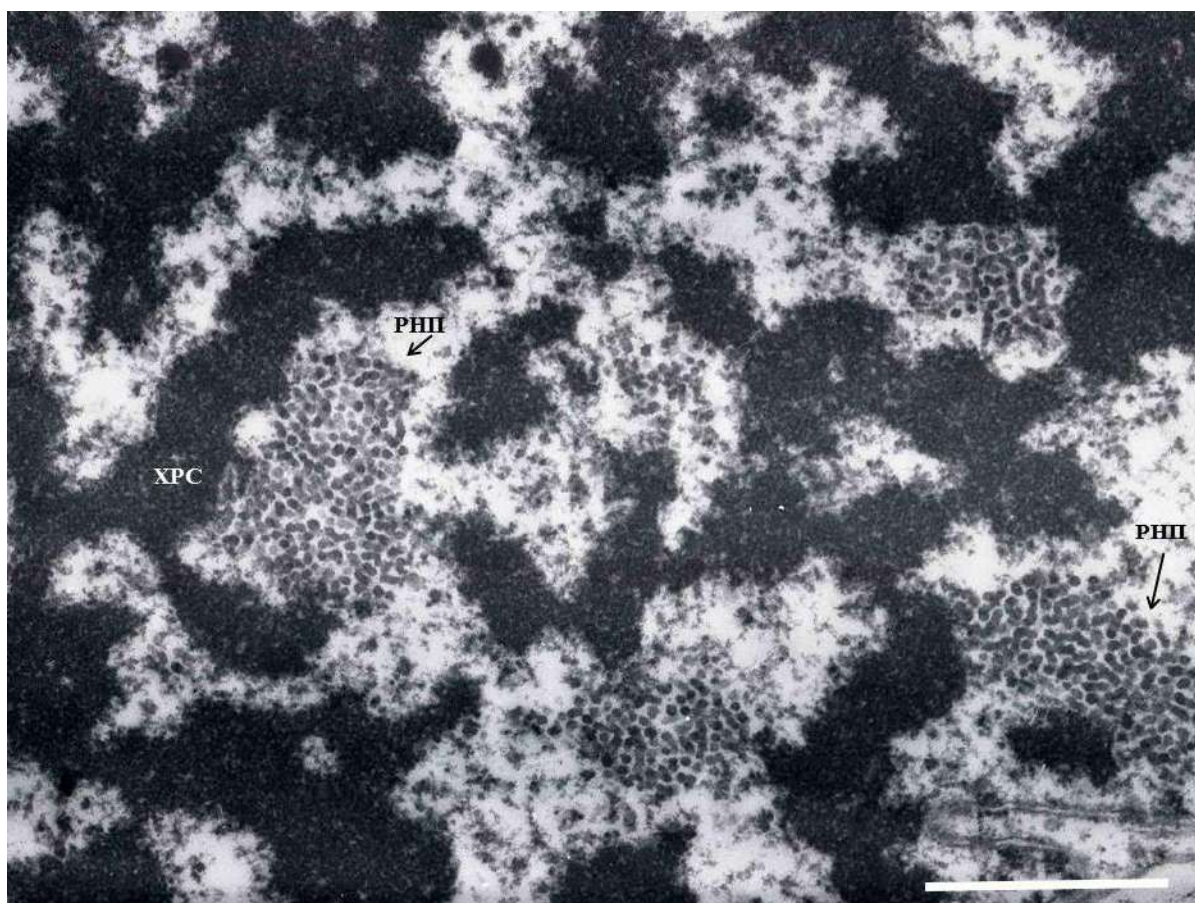


Рис. 76. Структуры, содержащие РНП между петлями поличенных хромосом (хрс) в ядрах клеток антиподальных комплексов на поздней стадии дифференцировки. Масштабный отрезок – 1 мкм.

Протяжённые инвагинации ядерной оболочки и многочисленные РНП, локализованные в лакунах ячеистых поличенных хромосом, выявляются вплоть до конца средней стадий гибели.



Политенные хромосомы четко визуализируются в ядрах вплоть до начальных стадий гибели (рис. 77).

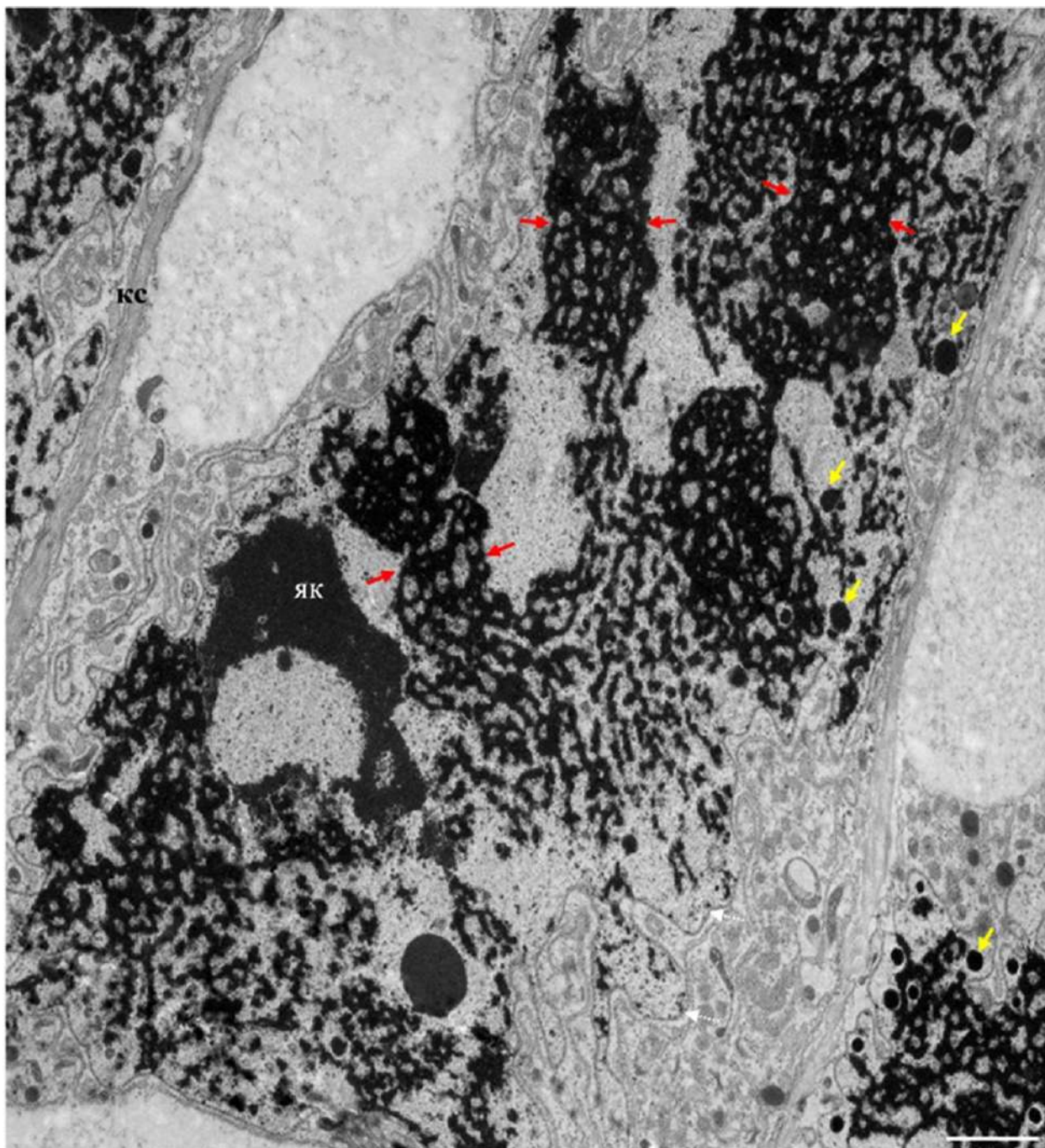


Рис. 77. Фрагмент антиподальной клетки комплекса оплодотворенного зародышевого мешка на стадии гибели. Отдельные политенные хромосомы (красные стрелки), ядрышки (як), сегрегаты ядрышка (желтые стрелки), ядерная оболочка (белые стрелки), клеточная стенка (кс), вакуоли цитоплазмы. Масштабный отрезок - 5 мкм.

На средней стадии гибели выявляются вытянутые ядра со сближенными политенными хромосомами. На стадиях гибели антиподальных клеток, ультраструктура ядер меняется (рис. 78, а, б). Ядрышки приобретают необычную форму, часть их компонентов выявляется между хроматид (рис. 78, а, б), экструзии гранулярного компонента ядрышка (рис. 78, а, б) и хроматина (рис. 78, б) присутствуют в цитоплазме.

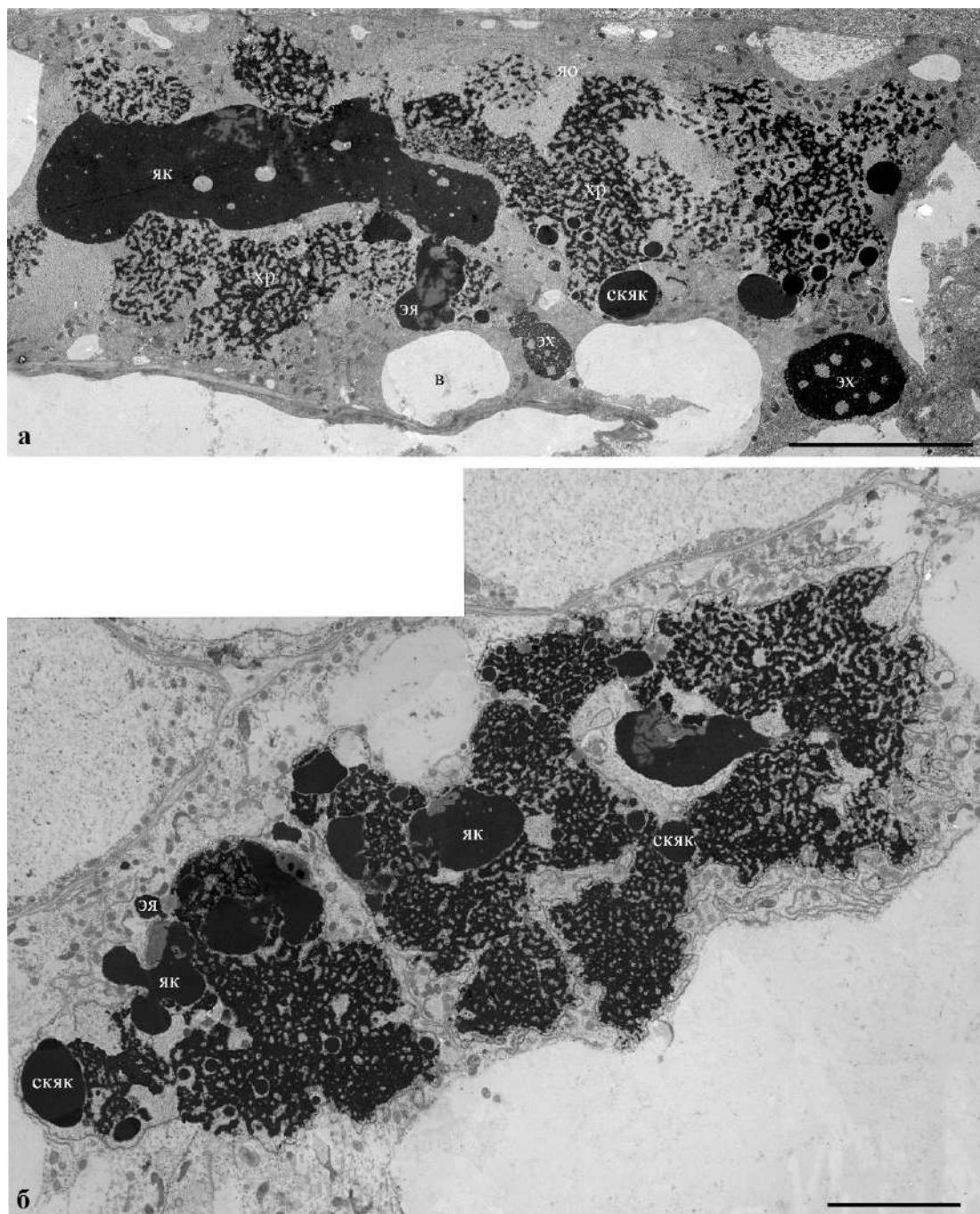


Рис. 78. Ядра антиподальных клеток пшеницы на стадиях средней программируемой клеточной гибели. Сегрегированные компоненты ядрышка в лакунах политенных хромосом антиподальных ядер – (а, б, в) и экструзия ядрышка - (экс) через разрывы ядерной оболочки. Ядрышко – я; Сегрегированные компоненты ядрышка – скяк. Масштабный отрезок - 10 мкм.

Сегрегированные компоненты ядрышка располагаются между хроматид и различаются по размеру и форме. В разных ядрах их структура может различаться. Часть из них выглядит как округлые однородные тельца (рис. 79, в, г), другие имеют неправильную форму, а некоторые имеют сложную структуру, когда к центральной менее плотной области примыкают один или два более плотных сегмента сегрегированного материала (рис. 79, а, б).

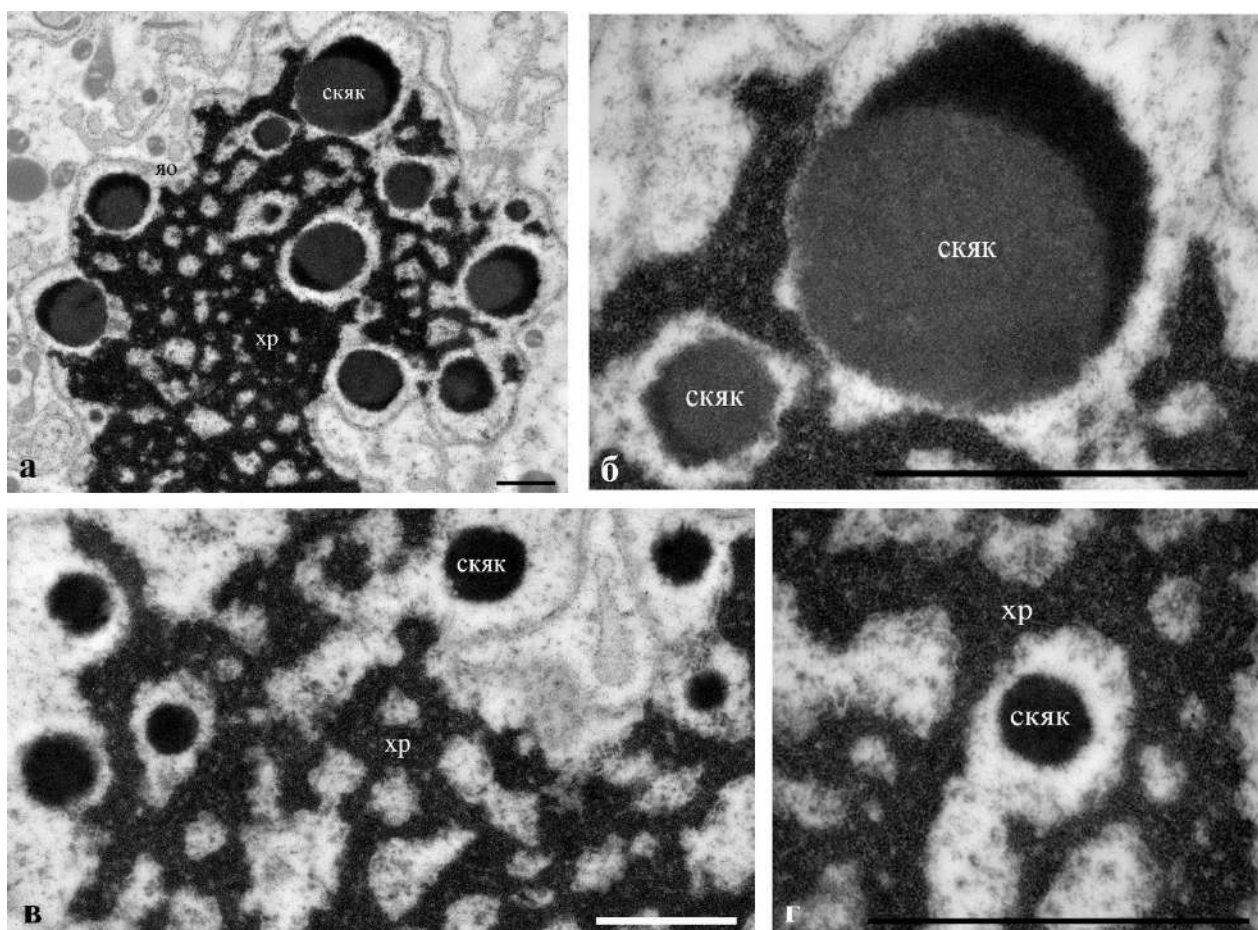


Рис. 79. Ультраструктура сегрегированных компонентов ядрышка антиподальных клеток на разных стадиях клеточной гибели. а, - участок лопатного ядра антиподальной клетки с сегрегированными компонентами (скяк) ядрышка. Ядерная мембрана (яо), б – неоднородные сегрегированные компоненты с «шапочками», в - участок политенной хромосомы (хр) ядра антиподальной клетки с однородными сегрегированными компонентами ядрышка, г – однородный сегрегированный компонент в теле политенной хромосомы. Масштабный отрезок - 5 мкм.

На средней стадии гибели в большинстве комплексов наблюдается экстррузия гранулярного компонента ядрышка (рис.80 а, б, в, г) и хроматина (рис.80, д, е). Целостность ядерной оболочки в местах экстррузий материала ядра и ядрышка нарушена (рис. 80, в, г).

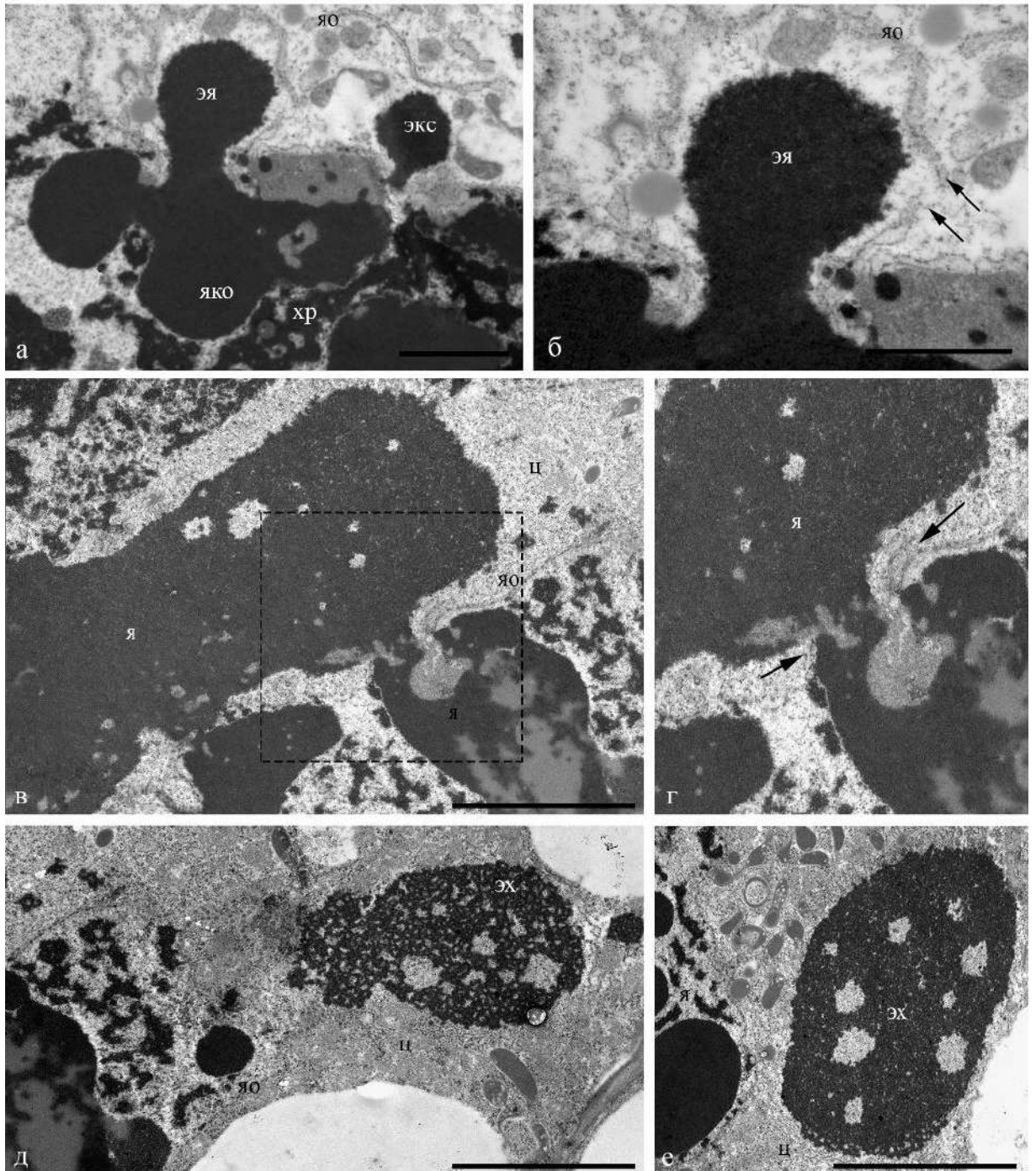


Рис. 80. Варианты экстррузии части ядрышка и участков политенных хромосом в цитоплазму антиподальной клетки. а, б – экстррузия гранулярного компонента ядрышка (эя), в, г - экстррузия гранулярного компонента ядрышка через разрыв ядерной оболочки (стрелки); д – экстррузия хроматина через разрыв ядерной оболочки; е – экстружированный участок политенной хромосомы (эх) в цитоплазме антиподальной клетки. Масштабный отрезок - 5 мкм.

В процессе гибели большинства клеток гигантские ядрышки антиподальных клеток сильно уплощаются и расслаиваются, в них выявляются многочисленные гетерогенные фибриллярные центры. В ядрах антиподальных клеток на поздних стадиях гибели происходит расслоение и перераспределение материала ядрышка в область хромосом (рис. 81, а). Хроматин на поздних стадиях гибели значительно уплотнен, отдельные хромосомы не выявляются (рис. 81, б, в).

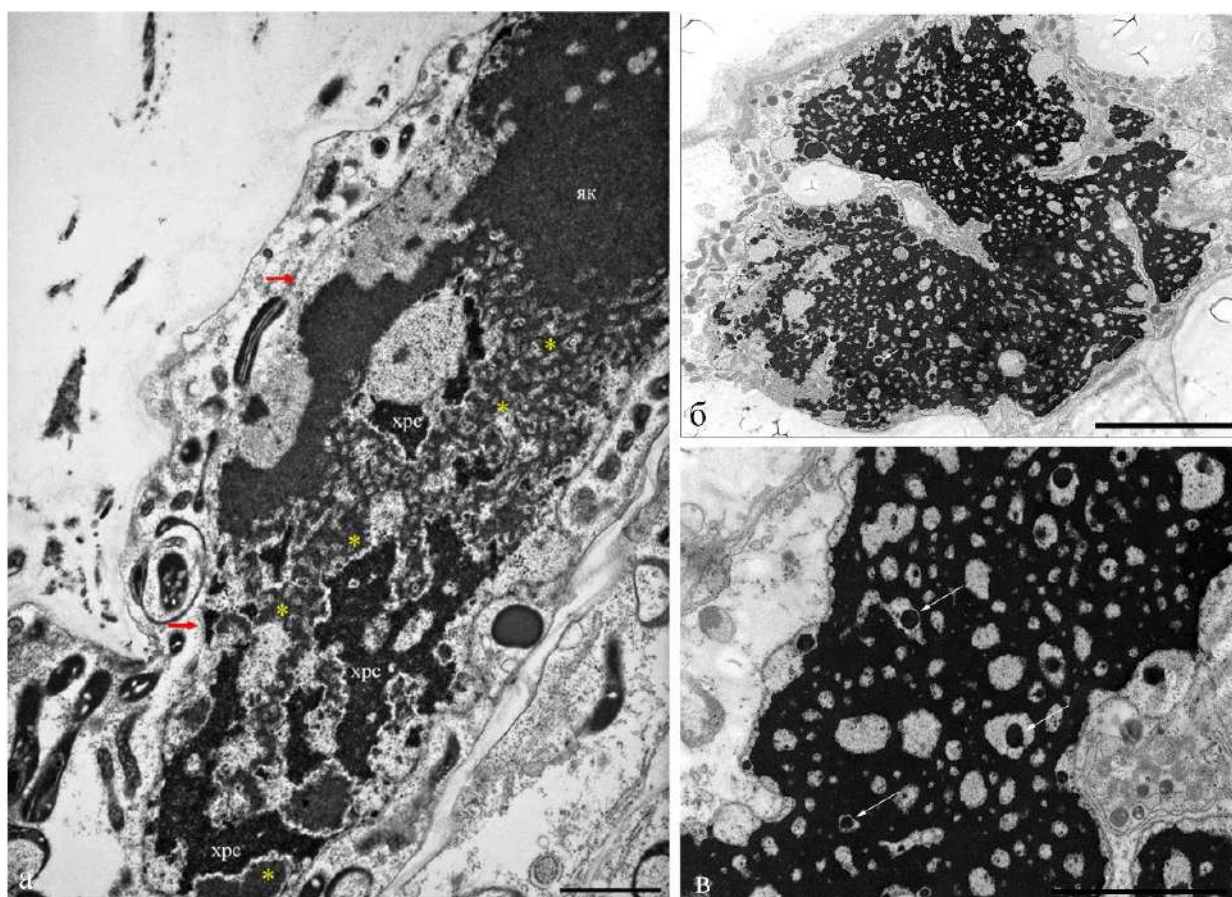


Рис. 81. а - фрагмент ядра антиподальной клетки оплодотворенного зародышевого мешка на стадии гибели. Уплотненные сближенные территории хромосом (хрс). Измененная структура ядрышка, материал ядрышка (\*) распределен между плотными хромосомными территориями. Видны разрывы ядерной оболочки (стрелки). Масштабный отрезок - 5 мкм. б - ядро антиподальной клетки на поздней стадии ПКГ со сближенными политенными хромосомами. Масштабный отрезок - 10 мкм. в – участок политенной хромосомы ядра антиподальной клетки на поздней стадии ПКГ с сегрегированными компонентами ядрышка (стрелки) в лакунах политенных хромосом. Масштабный отрезок - 5 мкм.

### **4.3. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки и гибели**

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

#### **4.3.1. Содержание ДНК ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков**

Содержание ДНК в ядрах клеток ярусов антиподального комплекса на разных стадиях дифференцировки и гибели приведено на гистограммах (рис. 82; рис. 83).

Анализ данных показал, что в пределах одного антиподального комплекса на всех стадиях дифференцировки и гибели ядра клеток отличаются по содержанию ДНК. На ранней стадии дифференцировки (рис. 82) ядра клеток апикального яруса содержали ДНК от 22 до 64С, большинство ядер имело 32-42С. Ядра клеток среднего яруса содержали от 9 до 31С, большинство ядер имело 21С. Ядра клеток базального яруса содержали от 9 до 20С, большинство ядер имело 9С. На средней стадии дифференцировки ядра клеток апикального яруса содержали ДНК от 32 до 92С, большинство ядер имело 32-52С. Ядра клеток среднего яруса содержали от 21 до 51С, большинство ядер имело 21-31С. Ядра клеток базального яруса содержали от 9 до 20С, большинство ядер имело 20С. На поздней стадии дифференцировки ядра клеток апикального яруса содержали ДНК от 54 до 212С, большинство ядер имело 72-84 С. Ядра клеток среднего яруса содержали от 21 до 63С, большинство ядер имело 21-32С. Ядра клеток базального яруса содержали от 9 до 30С, большинство ядер имело 10-20С. На ранней стадии гибели (рис. 83) в ядрах клеток апикального яруса содержание ДНК варьировало от 63 до 221С, большинство ядер имело 94-115 С. В ядрах клеток среднего от 30 до 93С, большинство ядер имело 42-52С. Ядра клеток базального яруса содержали от 9 до 30С, большинство ядер имело 10-21С. На средней стадии гибели ядра клеток апикального яруса содержали ДНК от 64 до 254С, большинство ядер имело 91-115С. Ядра клеток среднего яруса содержали от 31 до 95С, большинство ядер имело 42-52С. Ядра клеток базального яруса содержали от 9 до 30С, большинство ядер имело 10-20С. На поздней стадии гибели ядра клеток апикального яруса содержали ДНК от 63 до 136С, большинство ядер имело 85- 105С. Ядра клеток среднего яруса содержали от 31 до 83С, большинство ядер имело 42-52С. Ядра клеток базального яруса содержали от 21 до 30С, большинство ядер имело 10-21С.

Было проведено сравнение содержания ДНК в клетках разных ярусов комплексов на разных стадиях развития и значений содержания ДНК в клетках одного яруса на разных стадиях дифференцировки и гибели (рис.84). Поскольку распределения не были нормальными, для сравнения использовался U-критерий Манна-Уитни. Различия результатов считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Ядра клеток разных ярусов содержат различное количество ДНК, ядра базального яруса имели наименьшее содержание ДНК, ядра клеток апикального яруса – наибольшее. В каждом комплексе клетки с ядрами, содержащими от 5 до 24 С располагались в базальном ярусе и почти не меняли морфологию ядер. Антиподальные клетки со средним (от 30 до 63 С) и высоким (от 63 до 215 С) содержанием ДНК располагались в среднем и апикальном ярусах комплекса, и структура их ядер значительно изменялась в ходе дифференцировки, ядра клеток увеличивались в размере, в них выявлялись отдельные политенные хромосомы. Клетки апикального яруса комплекса всегда были плотно ассоциированы с клетками эндосперма, и их ядра проходили наибольшее число раундов эндоредупликации генома (до 255 С).

За период дифференцировки содержание ДНК ядер клеток базального яруса комплекса возрастало в 0,5 раза от 20 до 30С, в ядрах среднего яруса в 2 раза от 31 до 63С и ядрах апикального яруса в 3 раза от 64 до 212С.

На начальных этапах гибели комплекса некоторые ядра клеток антиподального комплекса продолжали активно функционировать, в них продолжалась эндоредупликация, т.е. процесс программируемой клеточной гибели наступал не одновременно в разных клетках комплекса, некоторые клетки запаздывали. На финальных этапах гибели клеток ядра с максимальным содержанием ДНК не выявлялись, возможно, они фрагментировались и первыми абсорбировались эндоспермом.

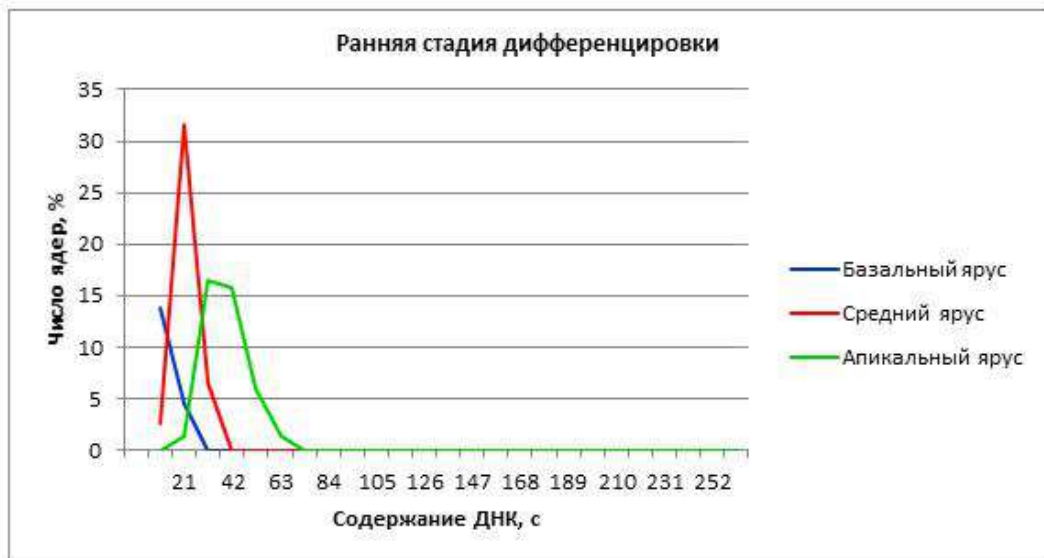


Рис.82. Содержание ДНК в ядрах антиподальных клеток разных ярусов на стадиях дифференцировки



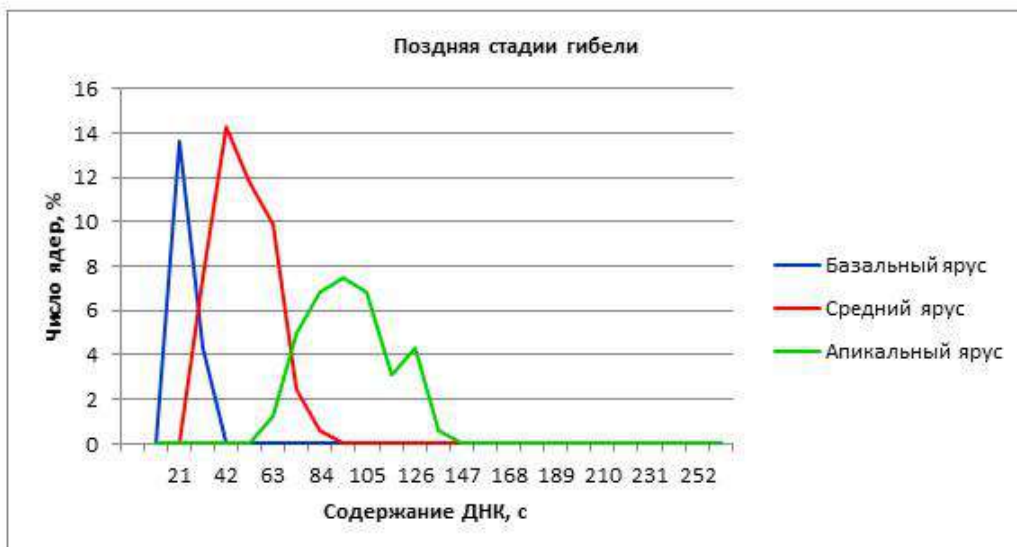
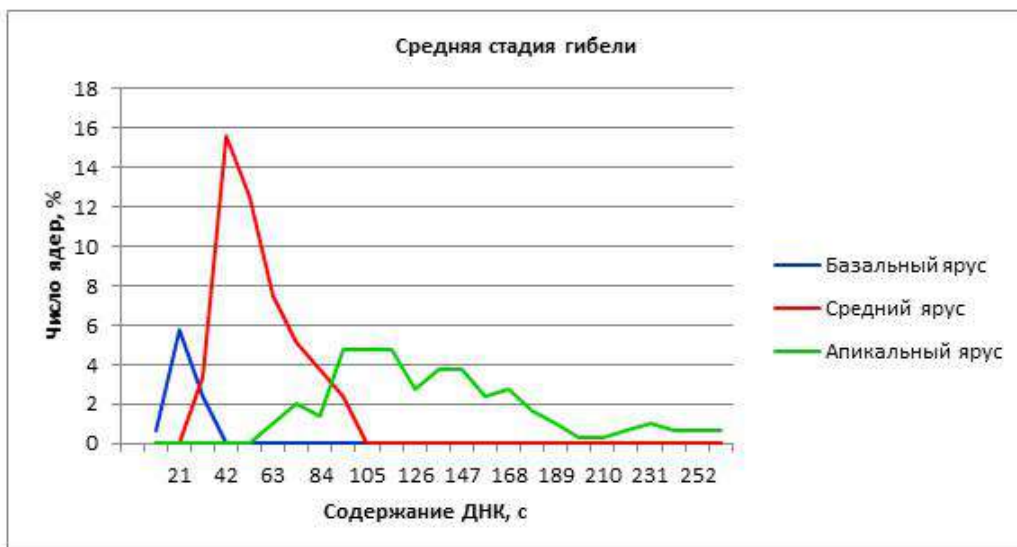


Рис.83. Содержание ДНК в ядрах антиподальных клеток разных ярусов на стадиях гибели.

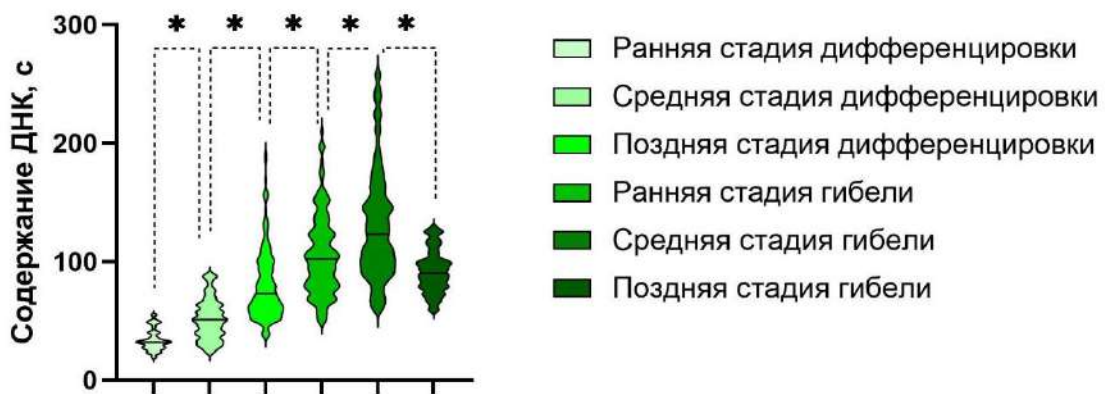
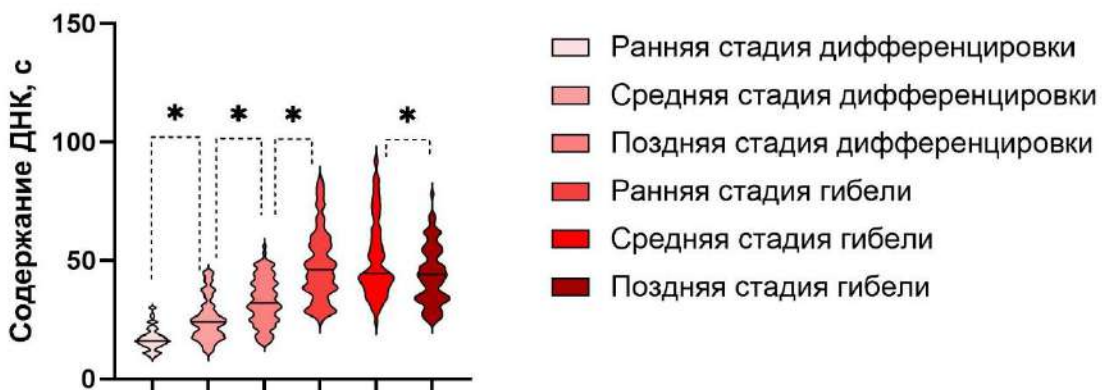
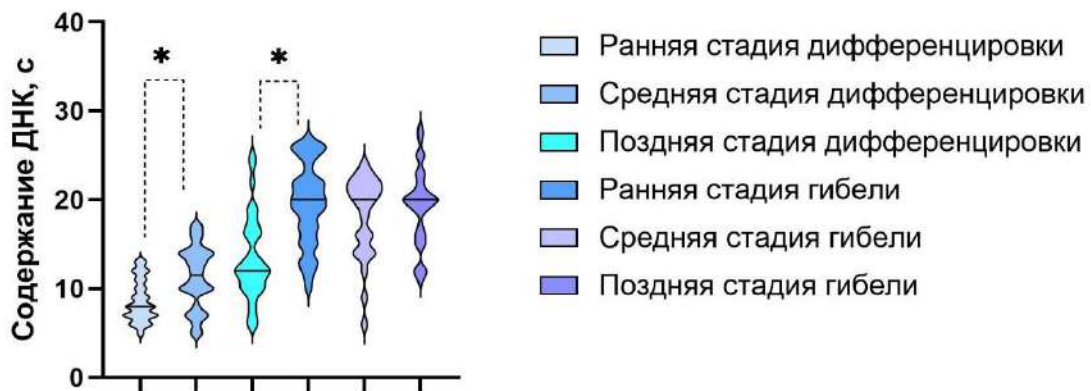
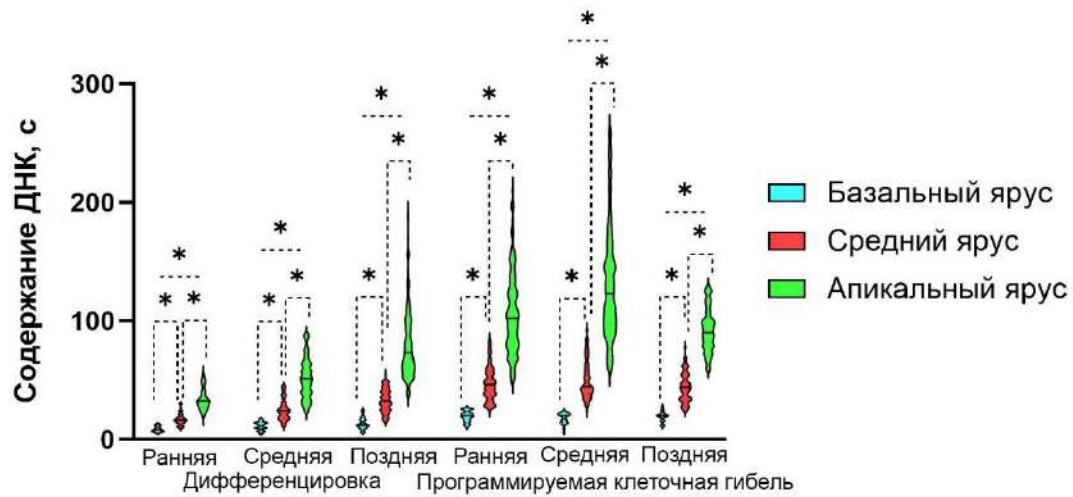


Рис.84. Содержание ДНК в ядрах антиподальных клеток разных ярусов на стадиях дифференцировки и гибели. Линия – медиана, \*  $p < 0.05$  по критерию Манна-Уитни

#### 4.3.2. Площадь ДНК ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

Площадь ядер клеток ярусов антиподального комплекса на разных стадиях дифференцировки и гибели приведено на гистограммах (рис. 85; рис. 86).

Анализ данных показал, что в пределах одного антиподального комплекса на всех стадиях дифференцировки и гибели ядра клеток отличаются по площади. Наименьшую площадь имели ядра базального яруса, наибольшую – ядра апикального яруса. На ранней стадии дифференцировки (рис. 84) площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 1360 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 680 до 1020 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 1020 до 3740 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 1700 до 2380 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 2380 до 6120 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 3060 до 3400 мкм<sup>2</sup>. На средней стадии дифференцировки площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 2040 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 1020 до 1360 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 1700 до 5440 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 2040 до 2380 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 1700 до 11560 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 4080 до 4420 мкм<sup>2</sup>. На поздней стадии дифференцировки площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 2720 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 1020 до 1360 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 680 до 7140 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 2040 до 2380 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 1700 до 14960 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 5100 до 5440 мкм<sup>2</sup>.

На ранней стадии гибели (рис. 85) площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 2720 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 340 до 680 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 400 до 6800 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 2380 до 2720 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 1360 до 13600 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 3740 до 4080 мкм<sup>2</sup>. На средней стадии гибели площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 2380 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 340 до 680 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 400 до 8160 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 1700 до 2040 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 1700 до 13600 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 4080 до 4420 мкм<sup>2</sup>. На поздней стадии гибели площадь ядер базального яруса составляла от 300 до 2040 мкм<sup>2</sup>, большинство ядер имело площадь от 340 до 680 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер среднего яруса составляла от 680 до 2040 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 1020 до 1360 мкм<sup>2</sup>, площадь ядер апикального яруса составляла от 1020 до 10880 мкм<sup>2</sup>, большинство – от 3400 до 3740 мкм<sup>2</sup>.

Было проведено сравнение площади ядер клеток разных ярусов комплексов на разных стадиях развития и площади клеток одного яруса на разных стадиях дифференцировки и гибели (рис.87). Поскольку распределения не были нормальными, для

сравнения использовался U-критерий Манна-Уитни. Различия результатов считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

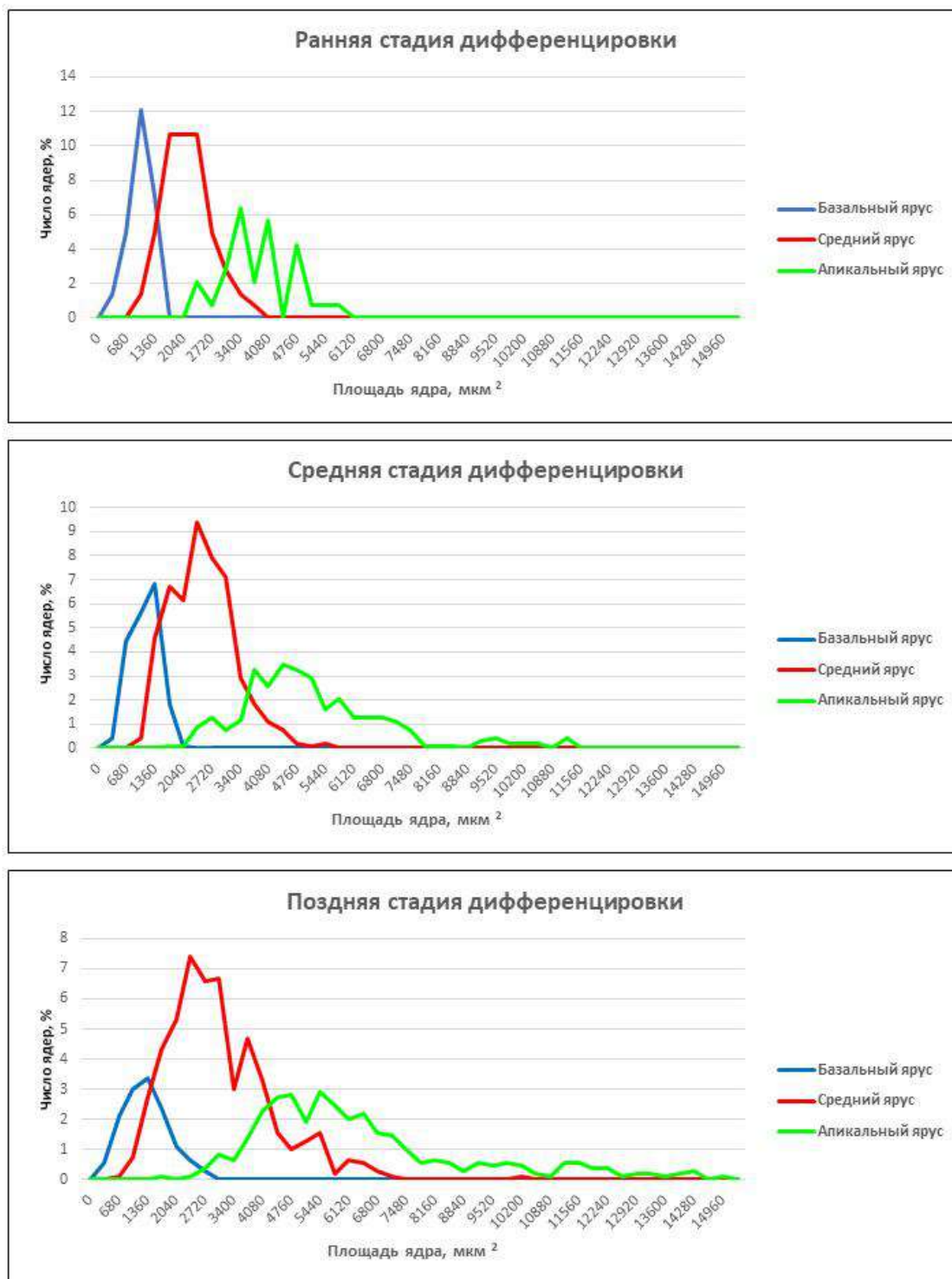


Рис.85. Площадь ядер антиподальных клеток разных ярусов на стадиях дифференцировки.

В ходе дифференцировки максимальных размеров достигали отдельные ядра апикального яруса на поздней стадии дифференцировки - 14960 мкм<sup>2</sup>, при этом максимальные площади ядер среднего и базального яруса достигают 6800 мкм<sup>2</sup> и 2720 мкм<sup>2</sup>, увеличиваясь в размерах в течении дифференцировки в 2,5, и 2 раза, что коррелирует с уровнем содержания ДНК.

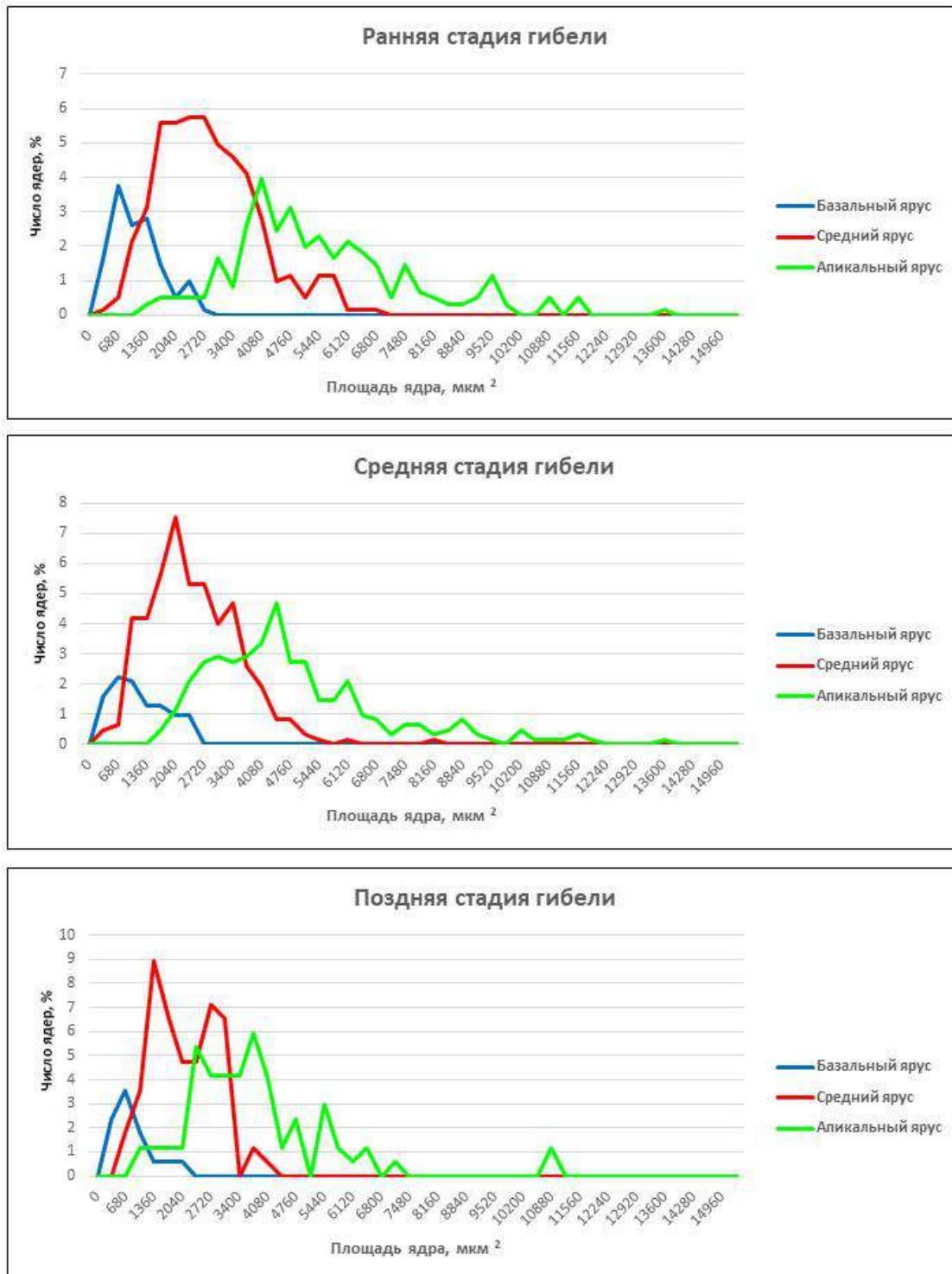


Рис. 86. Площадь ядер антиподальных клеток разных ярусов на стадиях гибели.

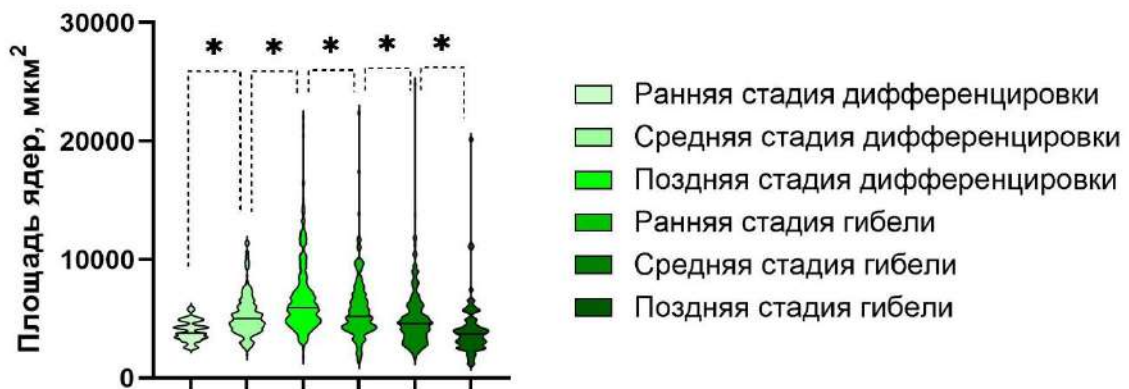
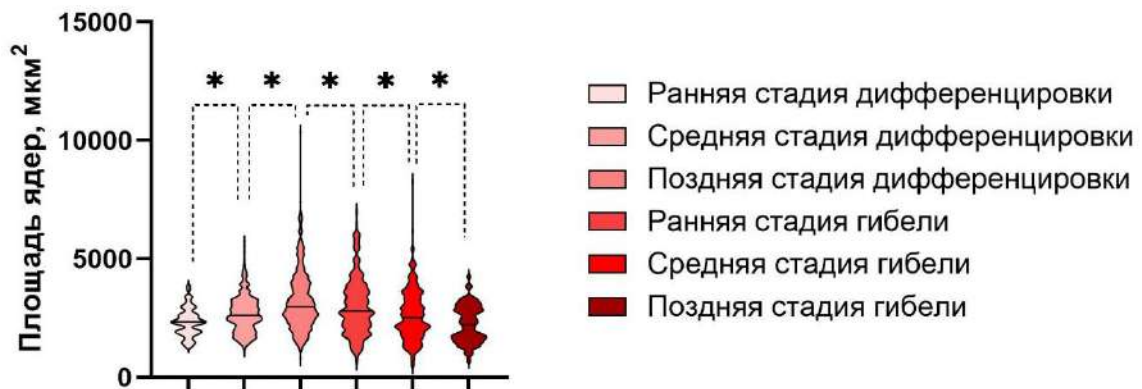
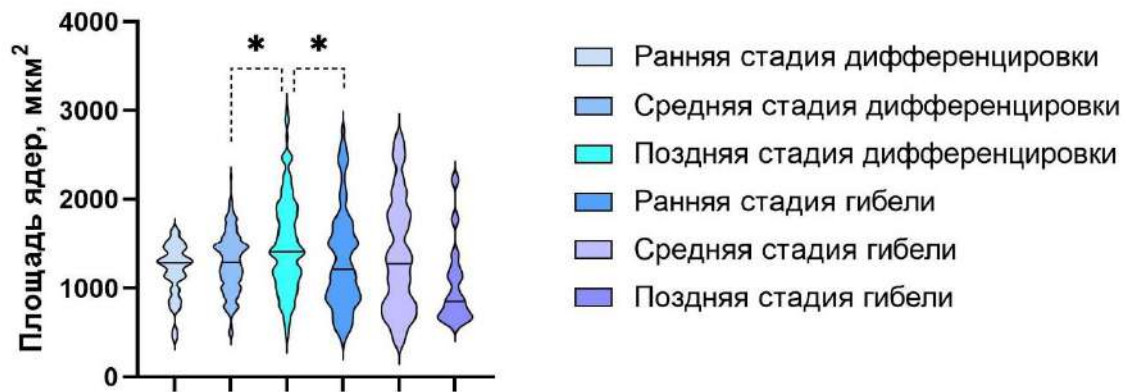
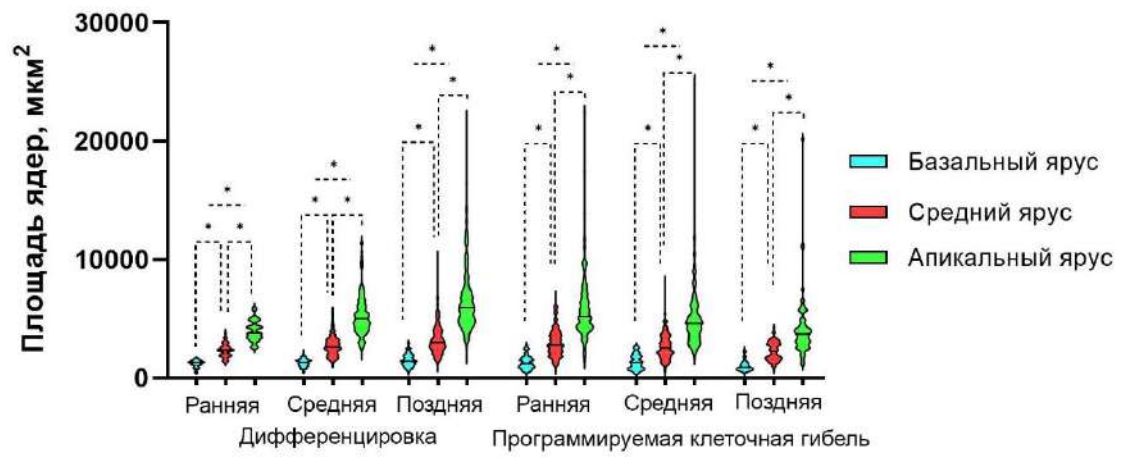


Рис.87. Площадь ядер антиподальных клеток разных ярусов на стадиях дифференцировки и гибели. Линия – медиана, \*  $p < 0.05$  по критерию Манна-Уитни

### **4.3.3. Индивидуализация хромосом ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков**

График, показывающий изменение структуры ядер антиподальных клеток в ходе дифференцировки и программируемой клеточной гибели, представлен на рис. 88. На ранней стадии дифференцировки в ядрах клеток всех ярусов не идентифицируются индивидуальные хромосомы. На средней стадии дифференцировки у 91% ядер клеток базального яруса, 64% ядер клеток среднего яруса, 18% ядер апикального яруса хромосомы не выявляются, в то время как индивидуальные хромосомы наблюдаются у 9% ядер клеток базального яруса, 36% ядер клеток среднего яруса и 82% ядер клеток апикального яруса. На поздней стадии дифференцировки только 14% ядер клеток базального яруса и 2% ядер среднего яруса не выявляются индивидуальные политенные хромосомы, которые наблюдаются у 86% ядер базального яруса, 98% ядер среднего яруса, 100% ядер апикального яруса. На ранней стадии гибели только у 9% ядер клеток базального яруса хромосомы не обособлены, индивидуальные политенные хромосомы присутствуют в 81% ядер клеток базального яруса, 76% клеток среднего яруса, 75% клеток апикального яруса, объединение хромосомных территорий наблюдается в 9% клеток базального яруса, 24% клеток среднего яруса, 25% клеток апикального яруса. На средней стадии гибели индивидуальные хромосомы присутствуют в 55% ядер клеток базального яруса, 45% клеток среднего яруса, 34% клеток апикального яруса, объединение хромосомных территорий наблюдается в 45% клеток базального яруса, 55% клеток среднего яруса, 66% клеток апикального яруса. На поздней стадии гибели объединение хромосомных территорий происходит во всех клетках базального и среднего ярусов и в 95% клеток апикального яруса, 5% ядер клеток апикального яруса подвергаются фрагментации.

Анализ клеток с ядрами, в которых выявляются индивидуальные политенные хромосомы показал, что максимальное число таких антиподальных клеток выявляются на стадиях поздней дифференцировки и ранней гибели всех клеток комплексов. Обособляться политенные хромосомы начинают в большинстве ядер апикального яруса на стадии средней дифференцировки, а объединяться хромосомные территории начинают на средней стадии ПКГ комплекса.

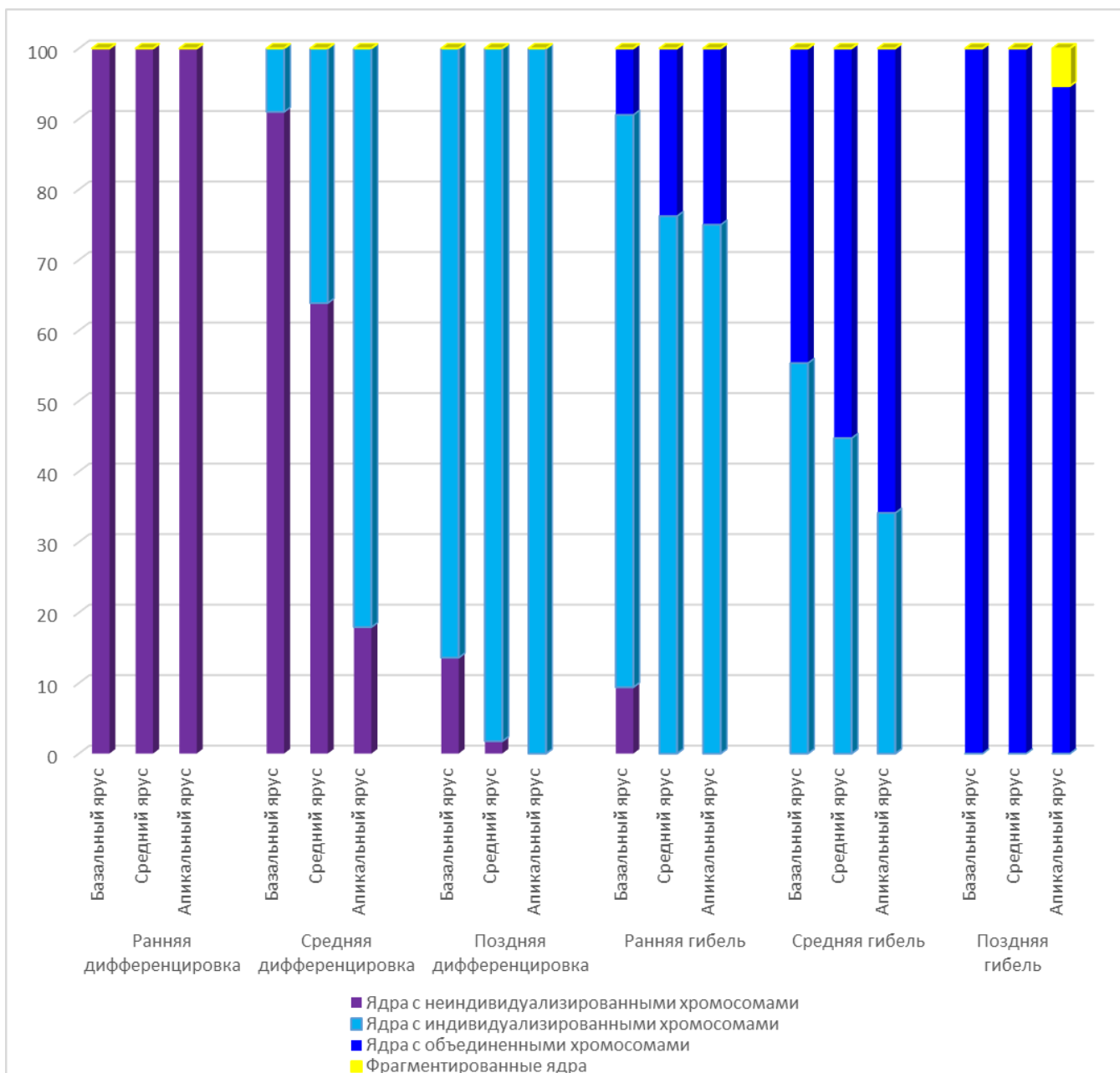


Рис. 88. Индивидуализация политенных хромосом в ядрах клеток антиподальных комплексов на стадиях дифференцировки и гибели.



#### 4.3.4. Округлость ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

На графиках представлены характеристики формы ядер клеток антиподальных комплексов (показатель «Circularity, рис. 89). На ранней стадии дифференцировки ядра всех ярусов имеют округлую форму: базальный ярус – округлость от 0,82 до 0,98, в среднем 0,95; средний ярус – от 0,81 до 0,98, в среднем 0,94; апикальный ярус – от 0,83 до 0,98, в среднем 0,92. На средней стадии дифференцировки ядра всех ярусов также имеют округлую форму: базальный ярус – округлость от 0,74 до 0,98, в среднем 0,93; средний ярус – от 0,7 до 0,99, в среднем 0,93; апикальный ярус – от 0,67 до 0,99, в среднем 0,92. На поздней стадии дифференцировки ядра клеток, особенно клеток апикального яруса становятся овальными: базальный ярус – округлость от 0,61 до 0,98, в среднем 0,86; средний ярус – от 0,3 до 0,98, в среднем 0,8; апикальный ярус – от 0,26 до 0,98, в среднем 0,78. На ранней и средней стадии гибели ядра вытягиваются, особенно в клетках среднего и апикального ярусов. На стадии ранней гибели степень округлости клеток базального яруса варьирует от 0,56 до 0,98, в среднем 0,82, среднего яруса – от 0,27 до 0,98, в среднем 0,69, апикального яруса – от 0,22 до 0,96, в среднем 0,63. На стадии средней гибели округлость клеток базального яруса от 0,53 до 0,97, в среднем 0,81, среднего яруса – от 0,52 до 0,97, в среднем 0,61, апикального яруса – от 0,15 до 0,88, в среднем 0,51. Во время поздней стадии гибели ядра клеток всех ярусов, в том числе и базального теряют округлость и становятся вытянутыми, округлость клеток базального яруса от 0,53 до 0,97, в среднем 0,81, среднего яруса – от 0,16 до 0,82, в среднем 0,52, апикального яруса – от 0,12 до 0,79, в среднем 0,46.

Поскольку распределения не были нормальными, для сравнения использовался U-критерий Манна-Уитни. Различия результатов считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Морфометрические данные оценки округлости ядер показали, что на ранней и средней стадии дифференцировки ядра всех ярусов имели округлую форму, на поздней стадии дифференцировки некоторые ядра клеток становились овальными, особенно ядра клеток апикального яруса, в течение клеточной гибели ядра клеток сильно вытягивались, особенно на поздних стадиях гибели.

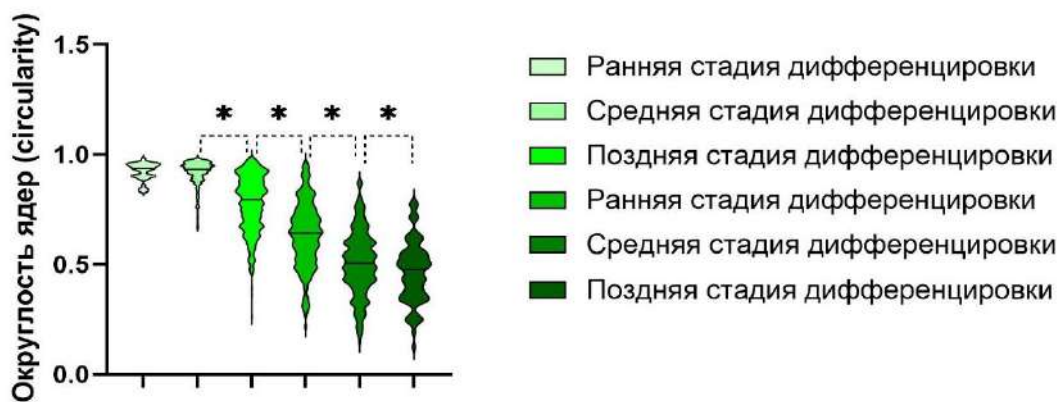
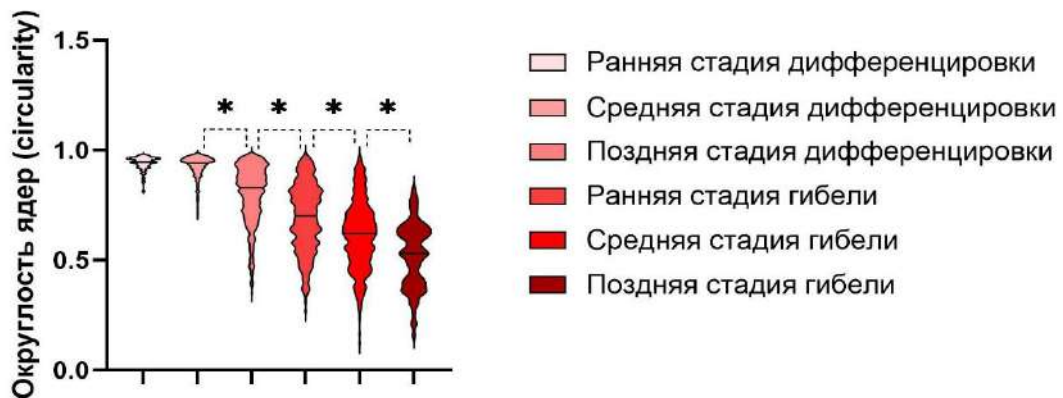
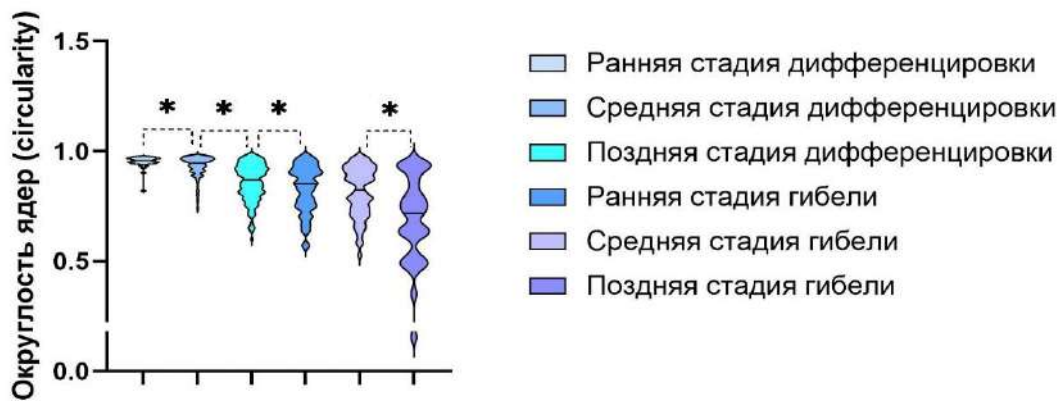
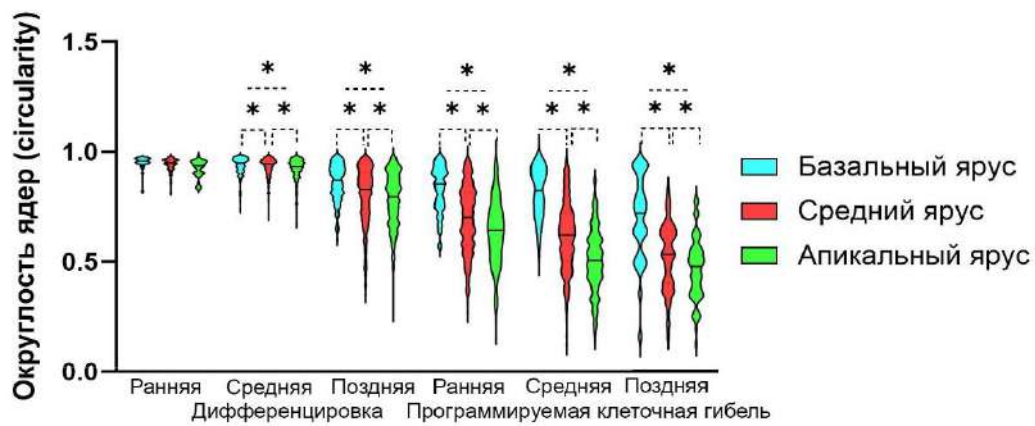


Рис.89. Округлость ядер антиподальных клеток разных ярусов на стадиях дифференцировки и гибели. Линия – медиана, \*  $p < 0.05$  по критерию Манна-Уитни

#### 4.3.5. Характеристики ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков

На рис. 90 приведен типичный комплекс на стадии ранней дифференцировки. Все ядра округлые (от 0,832 до 0,97), с неиндивидуализированными хромосомами. Клетки разных ярусов различаются по содержанию ДНК (в клетках базального яруса – 7-11С, среднего – 19-24С, апикального – 28-43 С) и площади (базальный - 861,7 – 1652,3 мкм<sup>2</sup>, средний – 2044,2 – 3036,1 мкм<sup>2</sup>, апикальный – 3250,4-4312,8 мкм<sup>2</sup>).

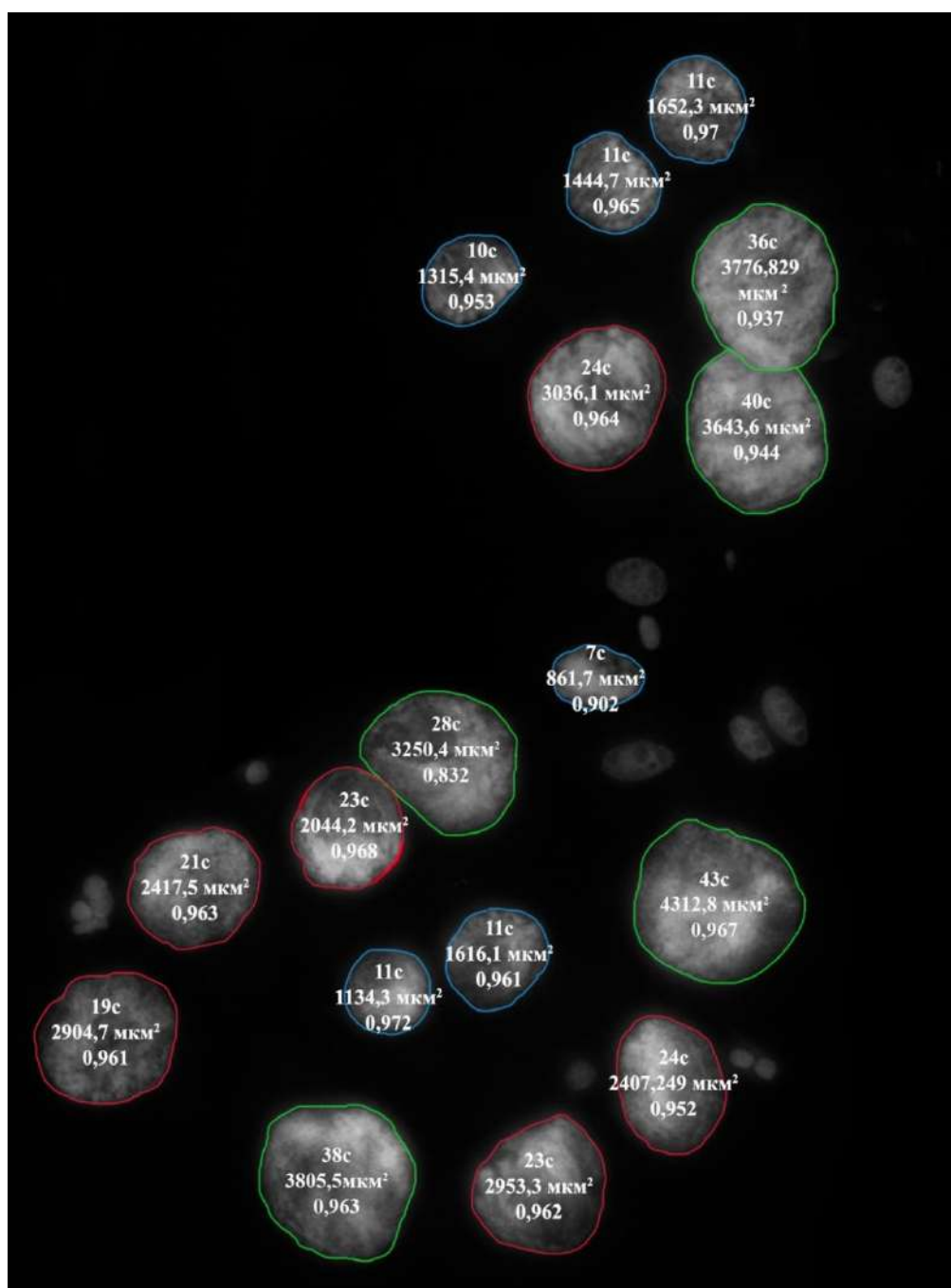


Рис. 90. Характеристики ядер антиподальных клеток на стадии ранней дифференцировки, синим цветом обведены ядра клеток базального яруса, красным цветом обведены ядра клеток среднего яруса, зеленым цветом обведены ядра клеток апикального яруса. Цифрами обозначена плоидность ядер, площадь ядер, округлость ядер.

На рис. 91 приведен типичный комплекс на стадии средней дифференцировки. Все ядра округлые (от 0,839 до 0,97), в ядрах среднего и апикального яруса заметны индивидуальные политенные хромосомы, в части ядер среднего и в ядрах базального яруса хромосомы не индивидуализированы. Клетки разных ярусов различаются по содержанию ДНК, по сравнению с ранней стадией содержание ДНК и площади в ядрах апикального яруса выше (в клетках базального яруса – 7-16С, среднего – 14-25С, апикального – 30-70 С, базальный ярус – 1337,9 – 2015,8 мкм<sup>2</sup>, средний – 2589,5 – 3976,2 мкм<sup>2</sup>, апикальный – 3250,4-9715,3 мкм<sup>2</sup>).

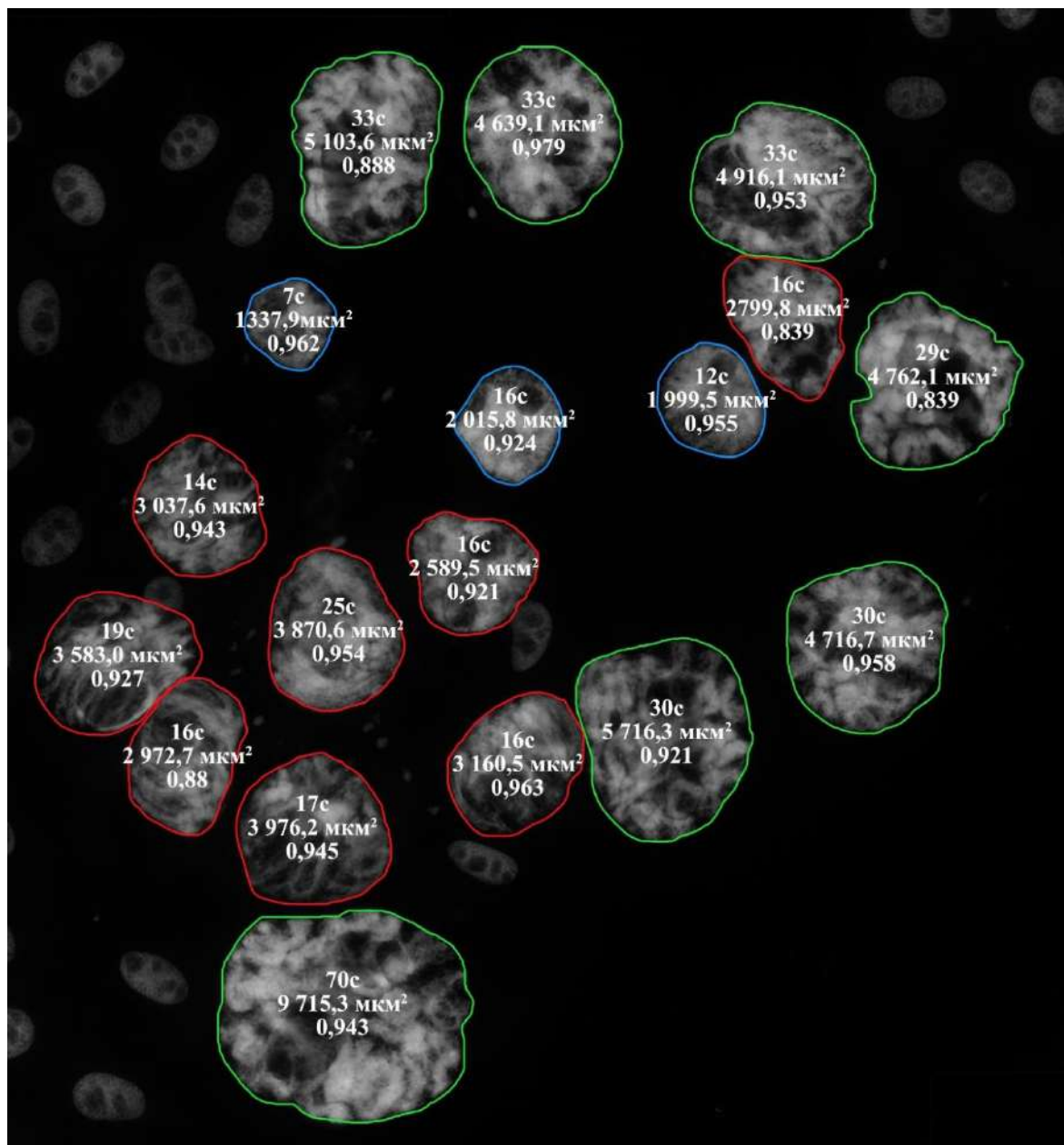


Рис. 91. Характеристики ядер антиподальных клеток на стадии средней дифференцировки, синим цветом обведены ядра клеток базального яруса, красным цветом обведены ядра клеток среднего яруса, зеленым цветом обведены ядра клеток апикального яруса. Цифрами обозначена плоидность ядер, площадь ядер, округлость ядер.

На рис. 92 приведен типичный комплекс на стадии поздней дифференцировки. Клетки становятся более вытянутыми (0, 725 – 0, 968), в ядрах всех ярусов заметны индивидуальные политенные хромосомы. Клетки разных ярусов различаются по содержанию ДНК и площади (в клетках базального яруса – 20-28С, среднего – 74-117С, апикального – 41-72С, базальный ярус – 886,3 – 2013,6 мкм<sup>2</sup>, средний – 2269,2 – 3961,4 мкм<sup>2</sup>, апикальный – 3486,5-5676,1 мкм<sup>2</sup>).

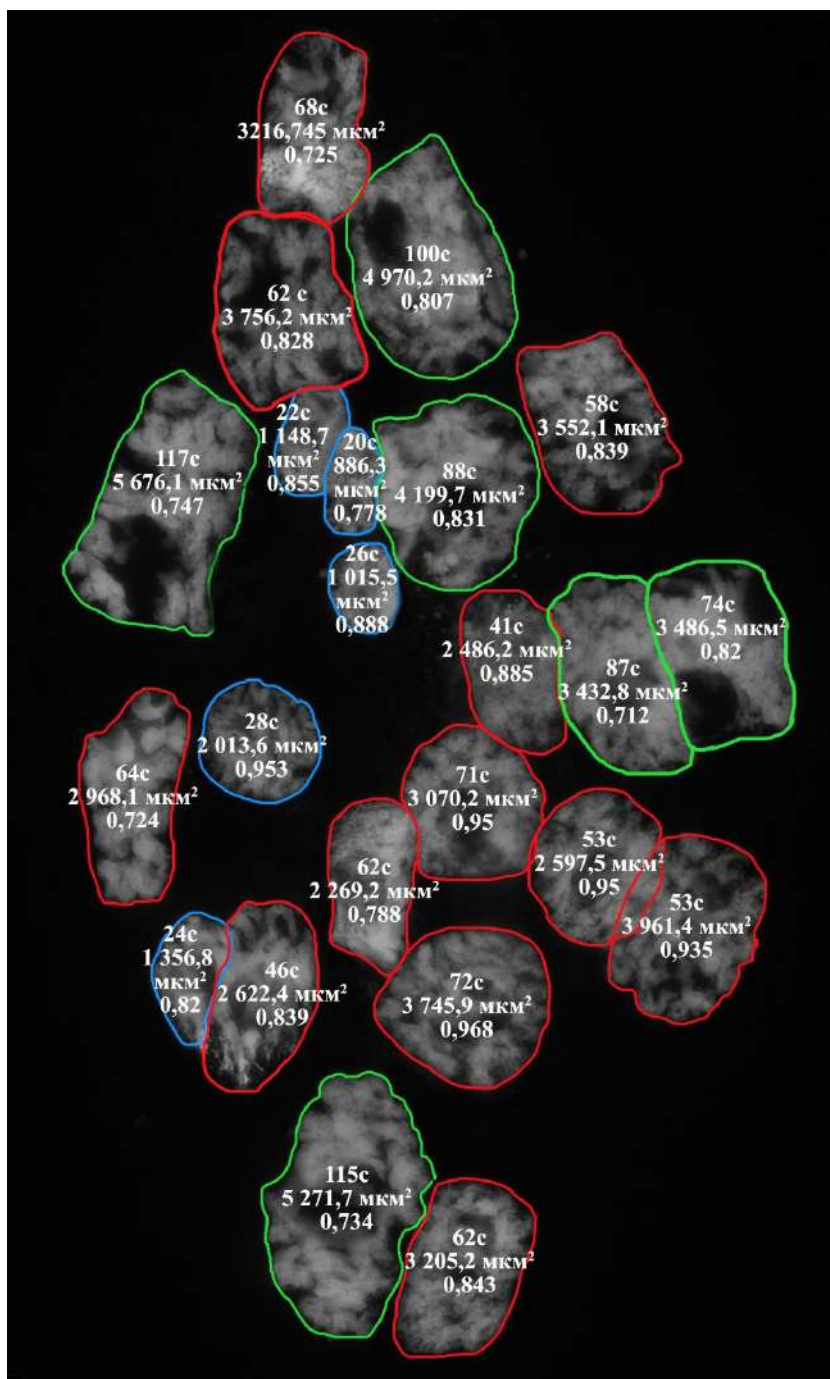


Рис. 92. Характеристики ядер антиподальных клеток на стадии средней дифференцировки, синим цветом обведены ядра клеток базального яруса, красным цветом обведены ядра клеток среднего яруса, зеленым цветом обведены ядра клеток апикального яруса. Цифрами обозначена плоидность ядер, площадь ядер, округлость ядер.

На рис. 93 приведен типичный комплекс на стадии ранней гибели. Среди клеток, особенно апикального яруса встречаются вытянутые клетки (0,575-0,961), в ядрах всех ярусов выявляются индивидуальные политенные хромосомы, в части клеток наблюдается объединение хромосомных территорий. Клетки разных ярусов значительно различаются по содержанию ДНК и площади ядер (в клетках базального яруса – 25-26С, среднего – 34-66С, апикального – 89-221 С, базальный ярус – 2102,3 – 2292,2 мкм<sup>2</sup>, средний – 2453,6 – 4608,5 мкм<sup>2</sup>, апикальный – 5411,2-13864,6 мкм<sup>2</sup>).

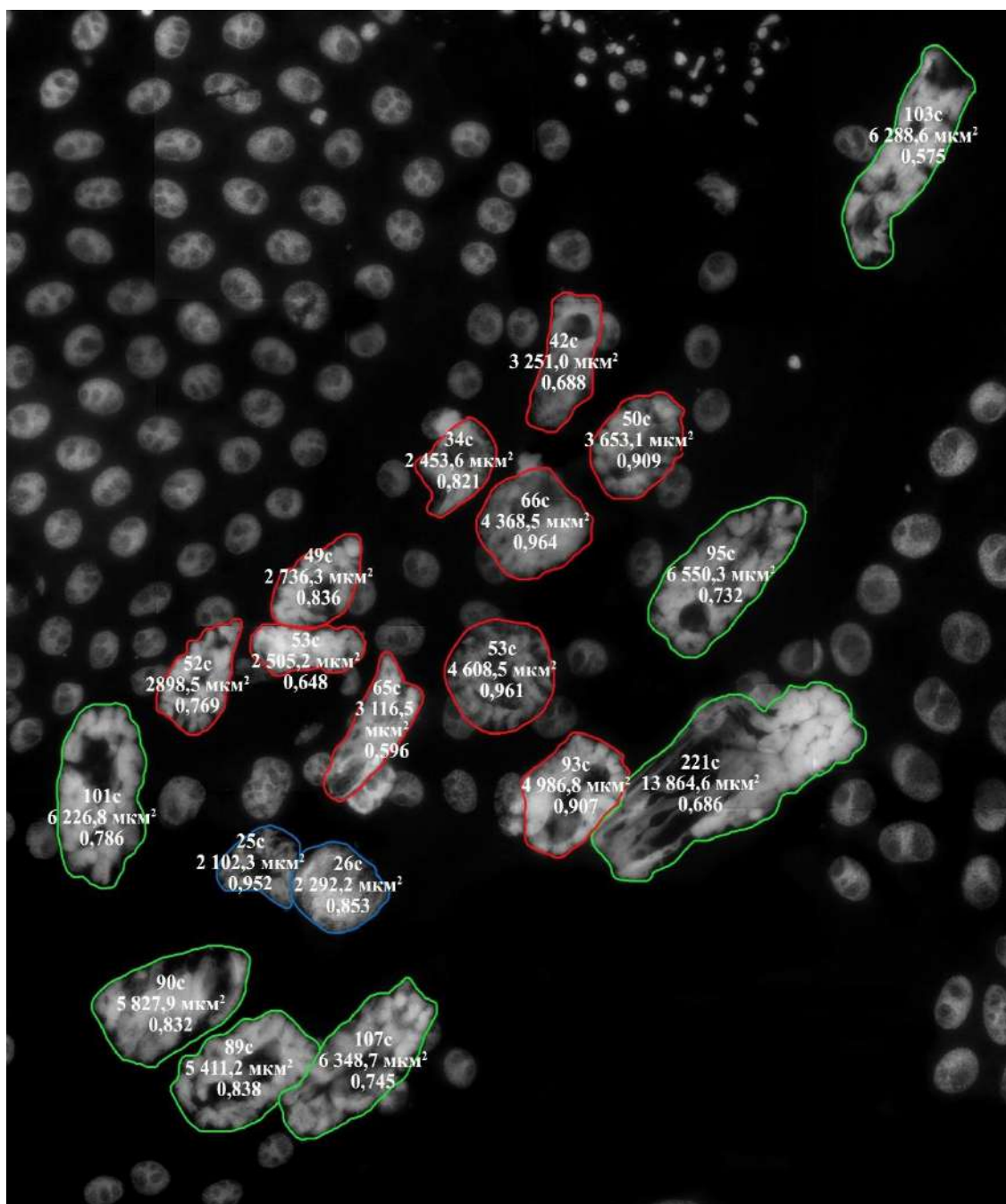


Рис. 93. Характеристики ядер антиподальных клеток на стадии ранней гибели, синим цветом обведены ядра клеток базального яруса, красным цветом обведены ядра клеток среднего яруса, зеленым цветом обведены ядра клеток апикального яруса. Цифрами обозначена плоидность ядер, площадь ядер, округлость ядер.

На рис. 94 приведен типичный комплекс на стадии средней гибели. Встречается много вытянутых ядер, выражены отличия в округлости ядер разных ярусов (базальный - 0, 706 - 0,873, средний - 0,357-0,663, апикальный - 0,257-0,68), в большинстве ядер наблюдается объединение хромосомных территорий. Клетки разных ярусов значительно различаются по содержанию ДНК и площади ядер (в клетках базального яруса - 32-44С, среднего - 30-84С, апикального - 53-244 С, базальный ярус - 1921,8 - 2903,7 мкм<sup>2</sup>, средний - 1823 - 3673,1 мкм<sup>2</sup>, апикальный - 2093,0-14756,9 мкм<sup>2</sup>).

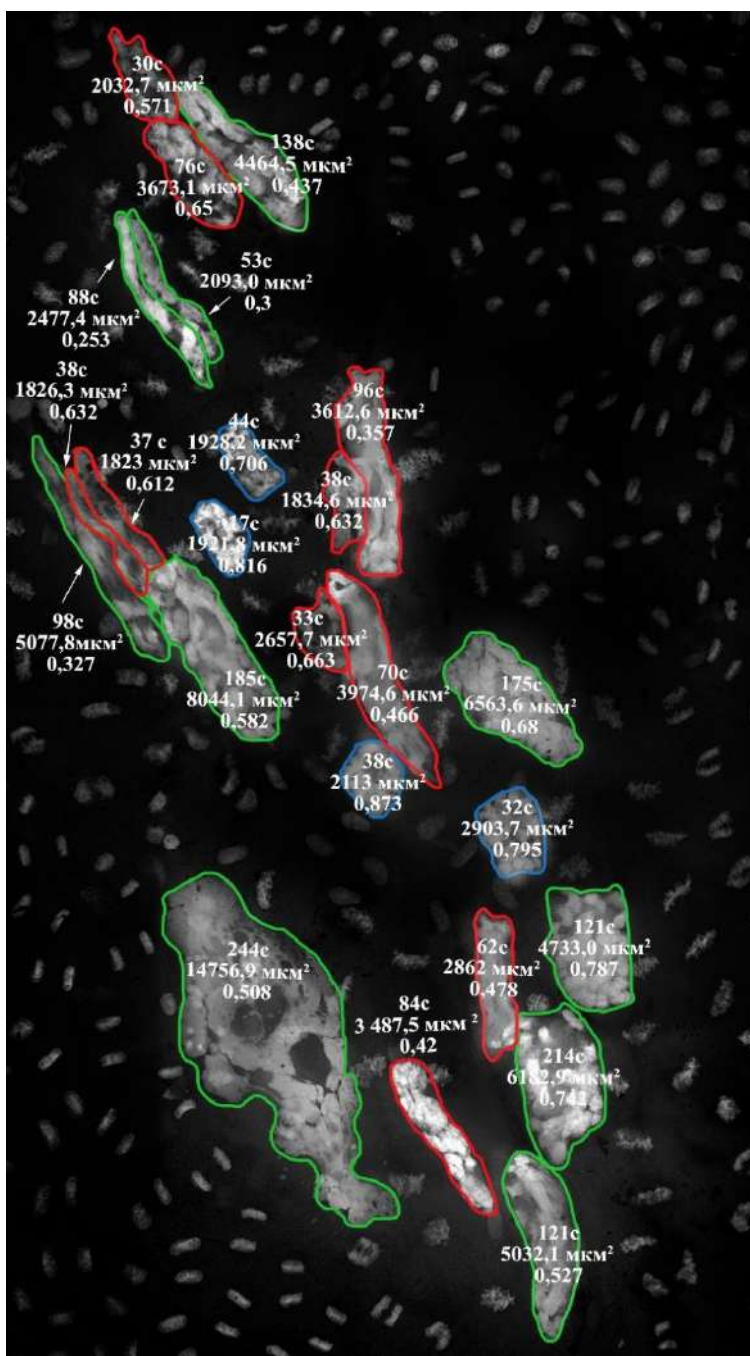


Рис. 94. Характеристики ядер антиподальных клеток на стадии средней гибели, синим цветом обведены ядра клеток базального яруса, красным цветом обведены ядра клеток среднего яруса, зеленым цветом обведены ядра клеток апикального яруса. Цифрами обозначена плоидность ядер, площадь ядер, округлость ядер.

#### 4.4. Структура органелл цитоплазмы антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели.

##### 4.4.1. Световая микроскопия органелл цитоплазмы

В цитоплазме антиподальных клеток, находящихся на стадии дифференцировки, с помощью иммуоцитохимического окрашивания выявили особенности локализации гранулярного ретикулума, диктиосом аппарата Гольджи, митохондрий, актиновых филаментов и микротрубочек.

Для локализации органелл, участвующих в выполнении секреторной функции, была проведена трехмерная реконструкция антиподальных клеток после иммуоцитохимического выявления гранулярного ретикулума и диктиосом. Было проведено сравнение локализации этих органелл в клетках разных ярусов комплекса на разных стадиях развития. Анализ распределения гранулярного ретикулума и диктиосом показал, что они равномерно располагаются по всему объему цитоплазмы в клетках всех ярусов, достоверных отличий для клеток разных ярусов выявлено не было. Диффузное распределение ЭПР и аппарата Гольджи на ранней стадии дифференцировки представлены на рис. 95 и 96.

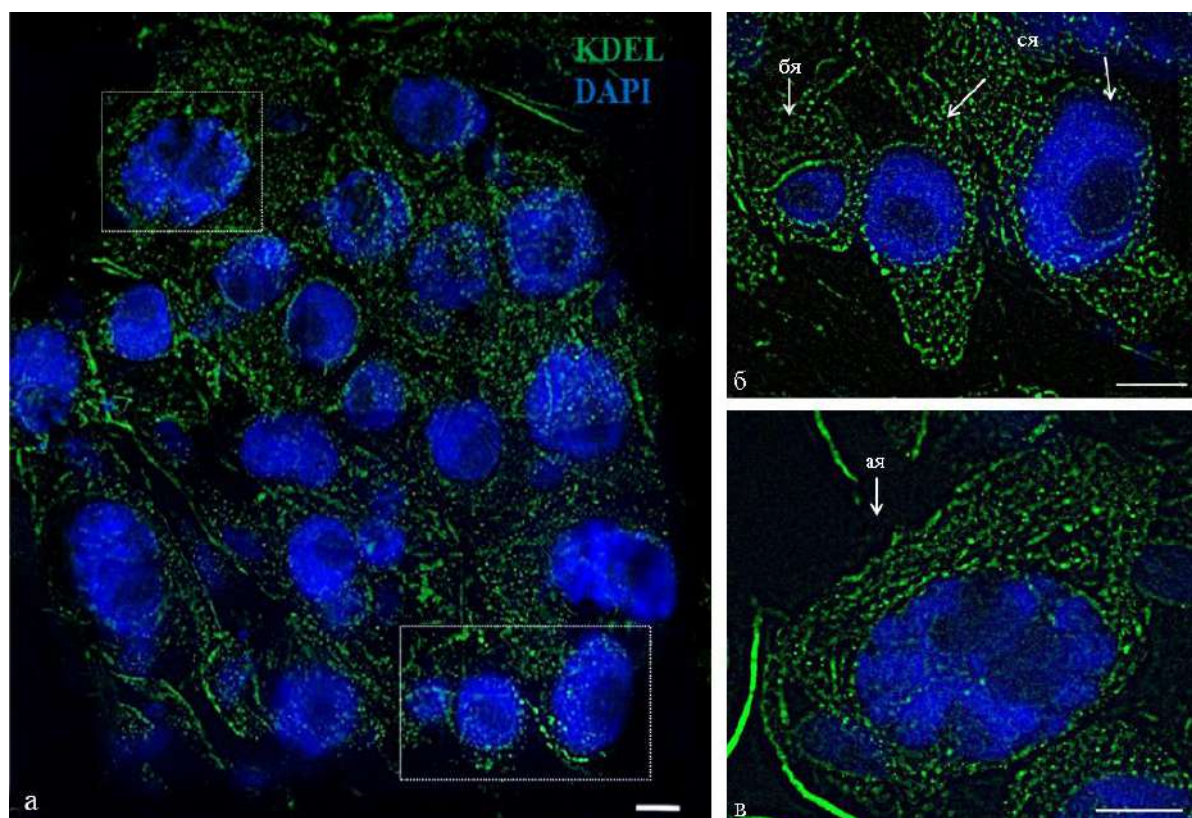


Рис. 95. Локализация ЭПР (KDEL) в клетках антиподального комплекса на ранней стадии дифференцировки. а-комплекс антиподальных клеток, б, в – антиподальные клетки. бя - клетки базального яруса, ся – клетки среднего яруса, ая - клетки апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.



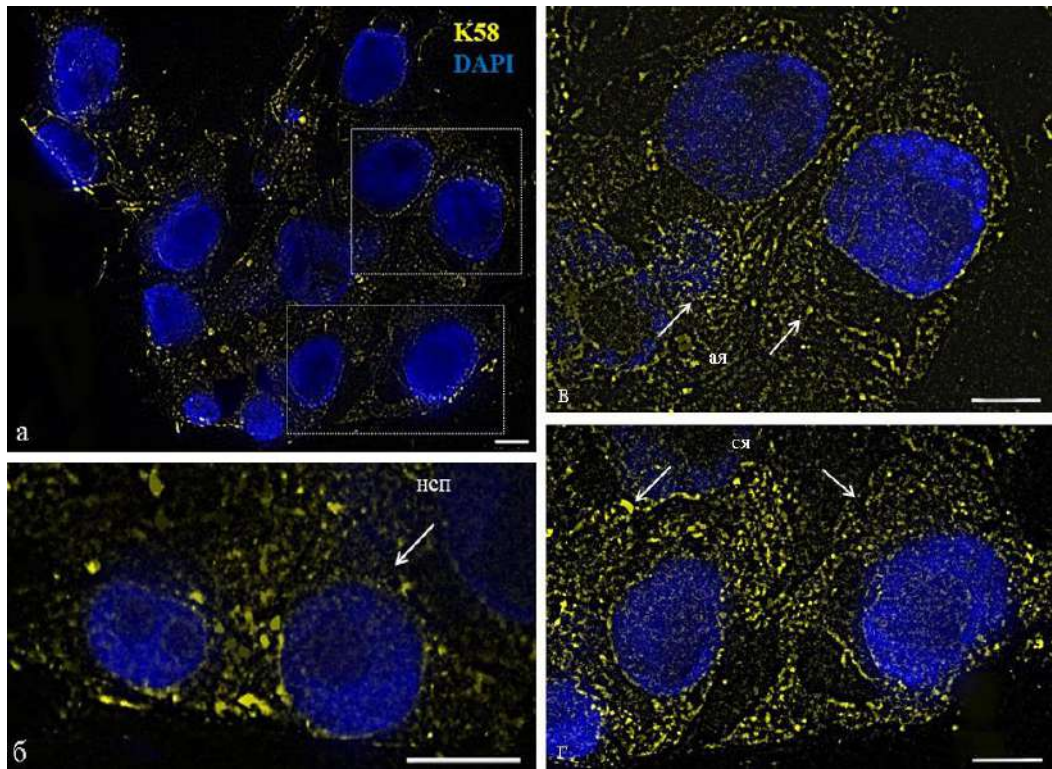


Рис. 96. Локализация аппарата Гольджи (K58) в клетках антиподального комплекса на ранней стадии дифференцировки. а - комплекс антиподальных клеток, б, в, г – антиподальные клетки. ая - клетки апикального яруса, ся - клетки среднего яруса Масштабный отрезок – 30 мкм.

На средней и поздней стадии дифференцировки ЭПР и диктиосомы аппарата Гольджи распределяются по цитоплазме равномерно во всех клетках комплекса. Распределение ЭПР и аппарата Гольджи на поздней стадии дифференцировки представлены на рис. 97 и 98.

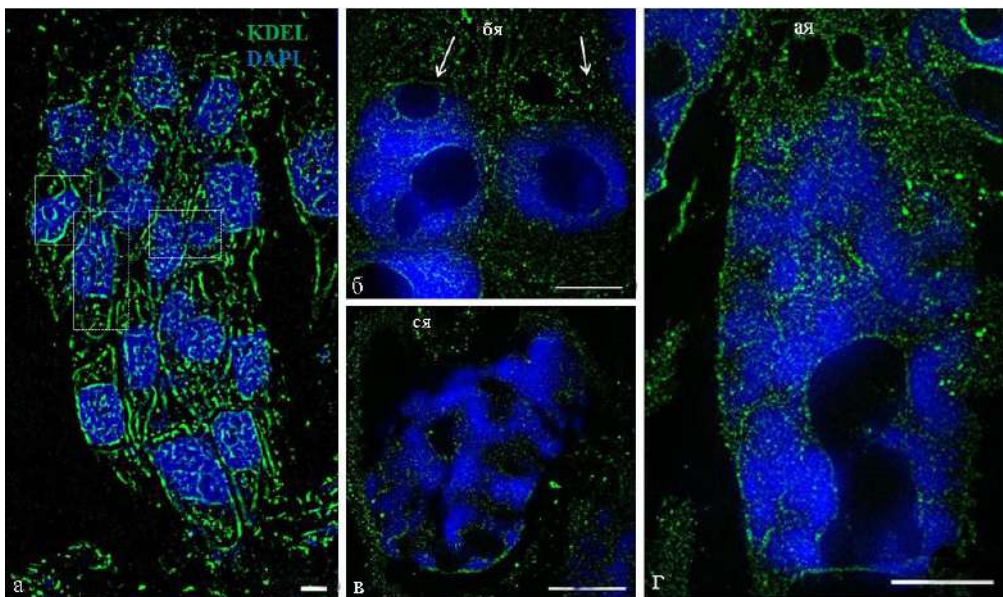


Рис. 97. Локализация ЭПР (KDEL) в клетках антиподального комплекса на стадии поздней дифференцировки. а - комплекс антиподальных клеток, б, в, г – антиподальные клетки. бя - клетки базального яруса, ся - клетки среднего яруса, ая - клетки апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.

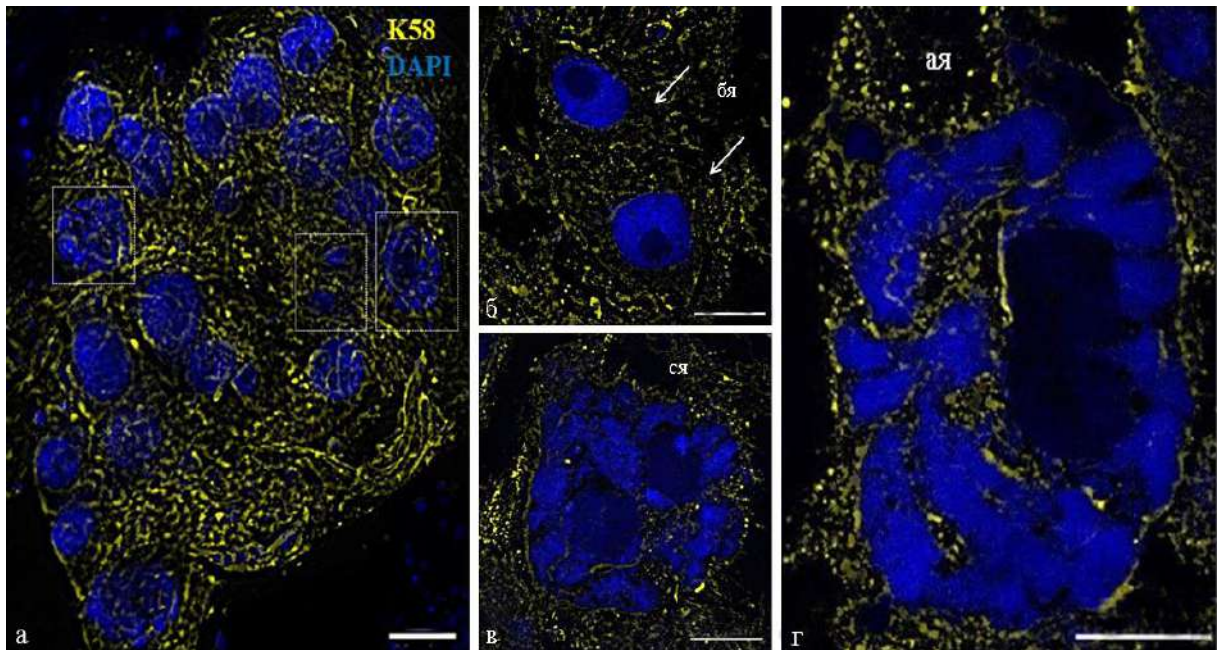


Рис. 98. Локализация аппарата Гольджи (K58) в клетках антиподального комплекса на поздней стадии дифференцировки. а-комплекс антиподальных клеток, б, в, г – антиподальные клетки. бя – клетки базального яруса, ся - клетки среднего яруса, ая - клетки апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.

На стадии гибели количество цистерн ЭПР (рис.99) и диктиосом аппарата Гольджи (рис.102) снижается по сравнению со стадией дифференцировки.

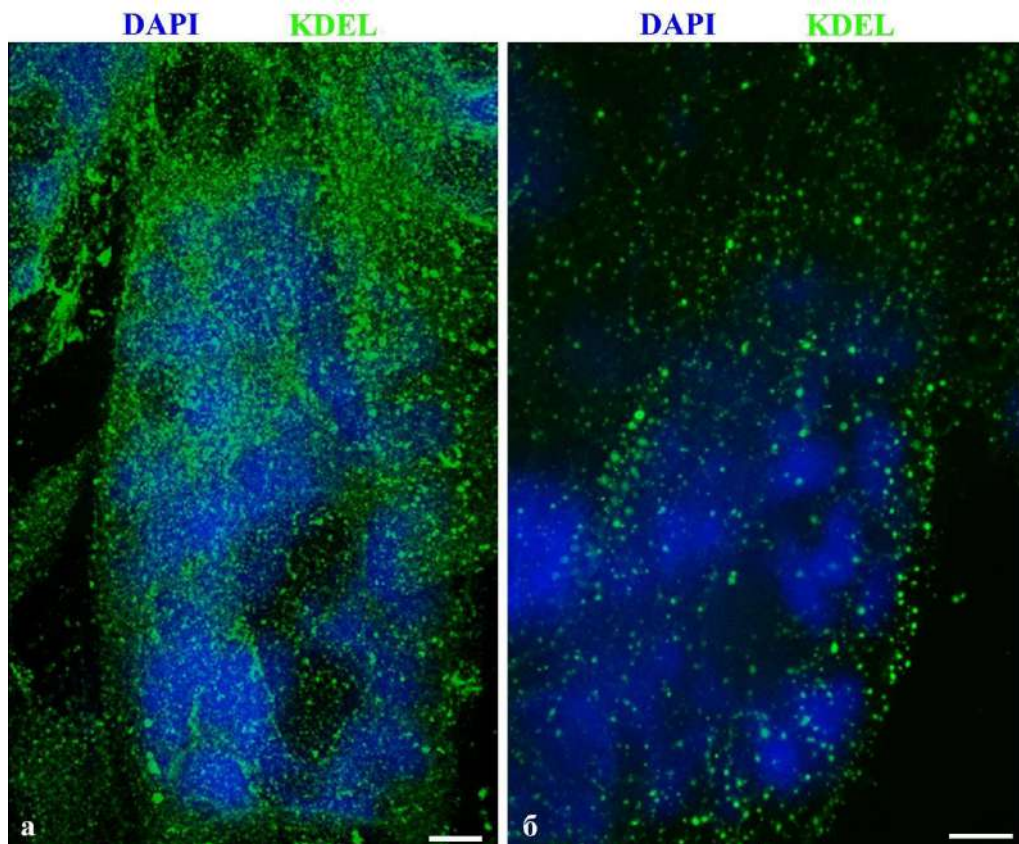


Рис. 99. Цистерны ЭПР (KDEL) антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки (а) и на стадии гибели (б). Трехмерная реконструкция. Масштаб – 10 мкм.

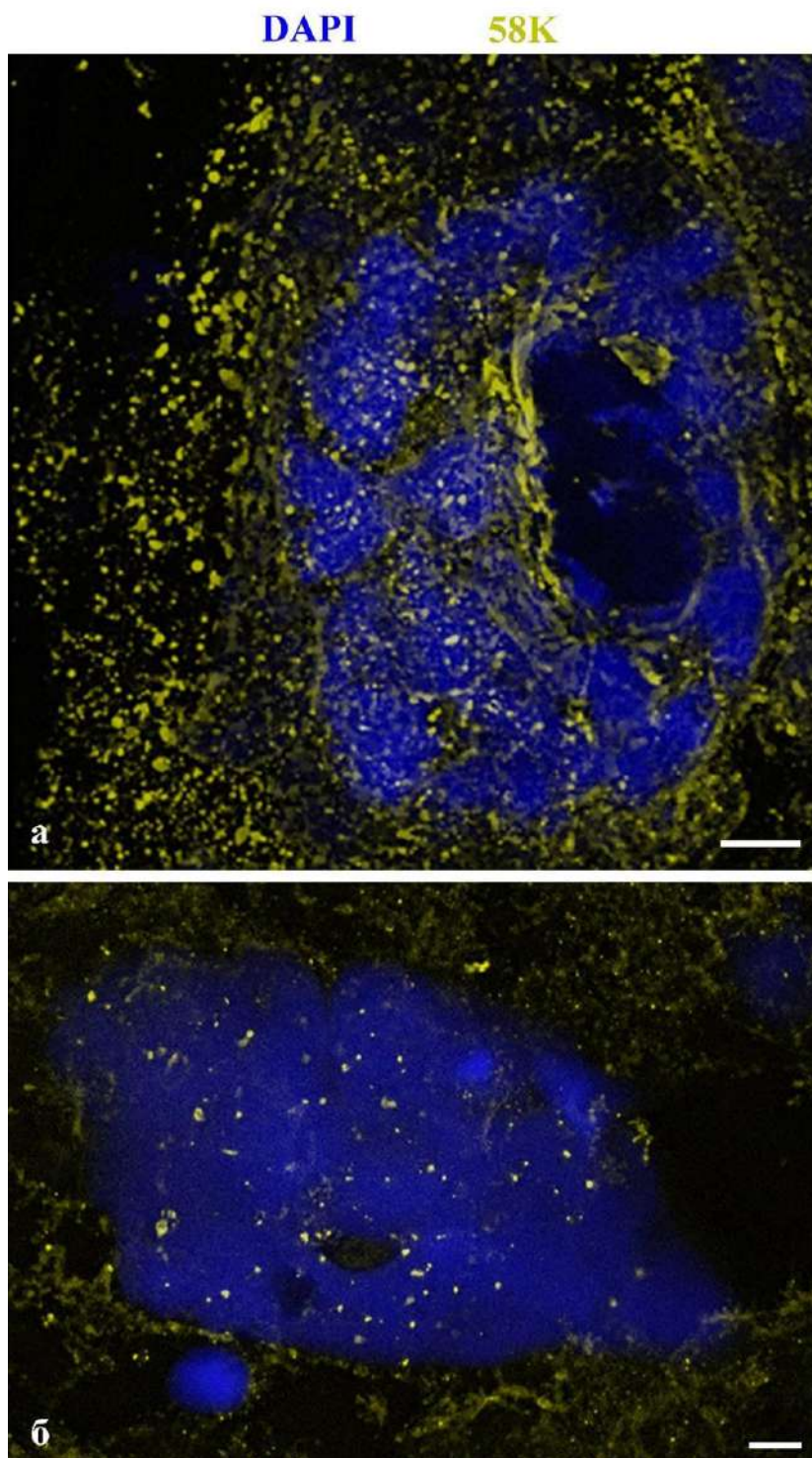


Рис. 100. Диктиосомы аппарата Гольджи (58K) антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки (а) и на стадии гибели (б). Трехмерная реконструкция. Масштаб – 10 мкм.

На стадии дифференцировки в цитоплазме клеток разных ярусов комплекса выявляются многочисленные митохондрии, равномерно расположенные по всему объему цитоплазмы (рис. 101).

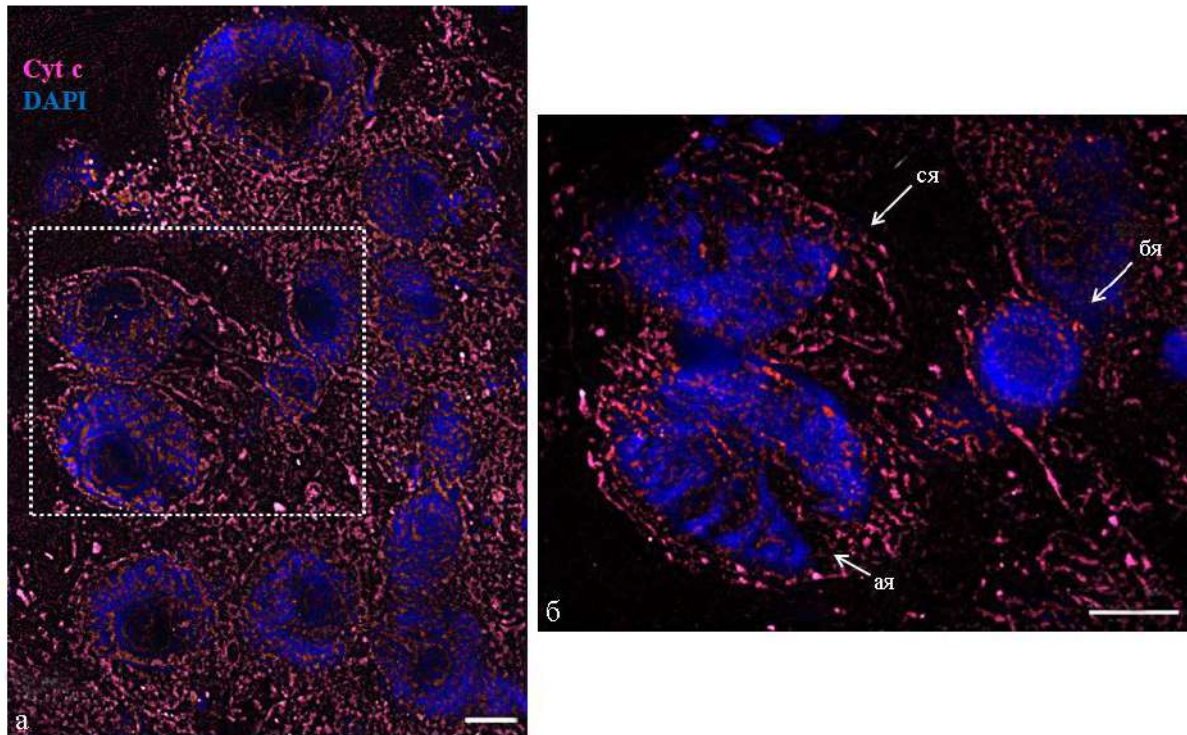


Рис. 101. Локализация митохондрий (cytochrome c) в клетках антиподального комплекса на средней стадии дифференцировки. а-комплекс антиподальных клеток, б, в, г – антиподальные клетки. бя – ядра (DAPI) клеток базального яруса, ся - ядра клеток среднего яруса, ая - ядра клеток апикального яруса. Масштабный отрезок – 30 мкм.

На стадии гибели клеток антиподального комплекса цитохром с выявляется в митохондриях (рис. 102, а) и цитоплазме (рис. 102, б) некоторых клеток, что свидетельствует о выходе цитохрома с из митохондрий. На ранних этапах гибели в большинстве клеток сохраняются интактные митохондрии. На средней стадии гибели выявляется большее число клеток с локализацией цитохрома с в цитоплазме (рис. 102, в). На финальных этапах гибели комплекса выход цитохрома с наблюдается во всех антиподальных клетках комплекса (рис. 102, г - и).

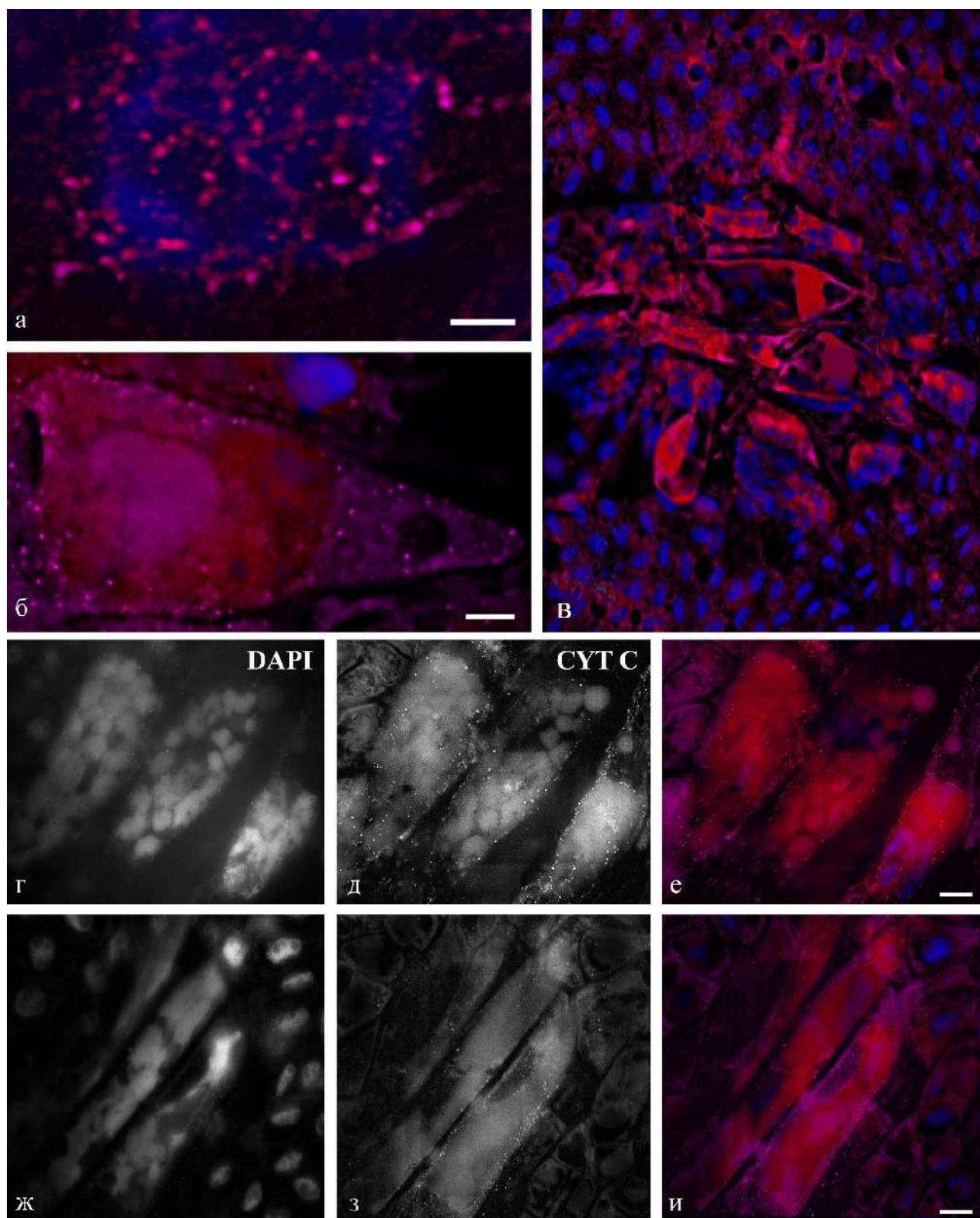


Рис. 103. Цитохром с в митохондриях (а) и антиподальных клетках (б) на стадии гибели комплекса (в) оплодотворенных зародышевых мешков. Ядра антиподальных клеток (г, д) и выход цитохрома с из митохондрий (д, з), совмещение (е, и). Масштабный отрезок – 10 мкм.

На стадии дифференцировки (рис. 104, а) и гибели антиподальных клеток неоплодотворенных (рис. 104, б) зародышевых мешков в цитоплазме выявляются интактные митохондрии. Выхода цитохрома с из митохондрий не наблюдается, даже в клетках с полностью деградировавшим хроматином (рис. 104, б).

Таким образом, митохондрии участвуют в программируемой клеточной гибели антиподальных клеток из оплодотворенных зародышевых мешков и не участвуют в клеточной гибели антиподальных клеток из неоплодотворенных зародышевых мешков.

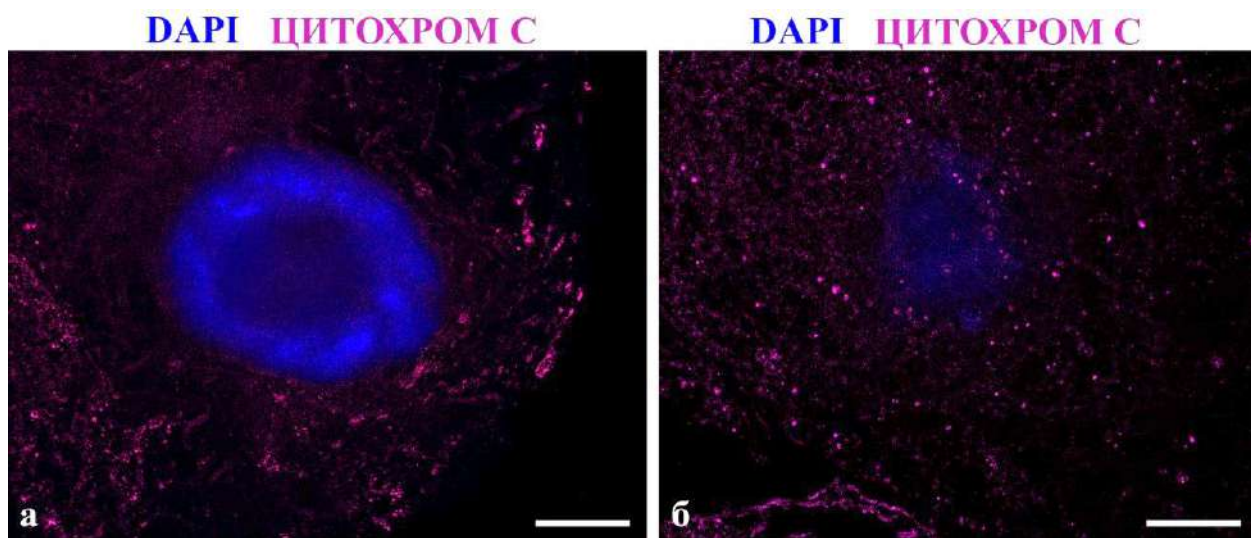


Рис. 104. а - Цитохром с в митохондриях антиподальной клетки неоплодотворенного зародышевого мешка на стадии дифференцировки. б - Цитохром с в митохондриях антиподальной клетки неоплодотворенного зародышевого мешка на стадии гибели. Масштабный отрезок – 10 мкм.

На ранней стадии дифференцировки в цитоплазме антиподальных клеток базального, среднего и апикального уровней выявляется тонкая неупорядоченная сеть из многочисленных пучков коротких микротрубочек (рис. 105, а, б). На поздней стадии дифференцировки выявляются плотные протяженные пучки микротрубочек (рис. 105, в, г). В антиподальных клетках на стадии программируемой клеточной гибели редкие, фрагментированные пучки микротрубочек сосредоточены в цитоплазме между инвагинаций ядерной оболочки вокруг политенных хромосом (рис.106). На поздней стадии гибели микротрубочки не выявляются.

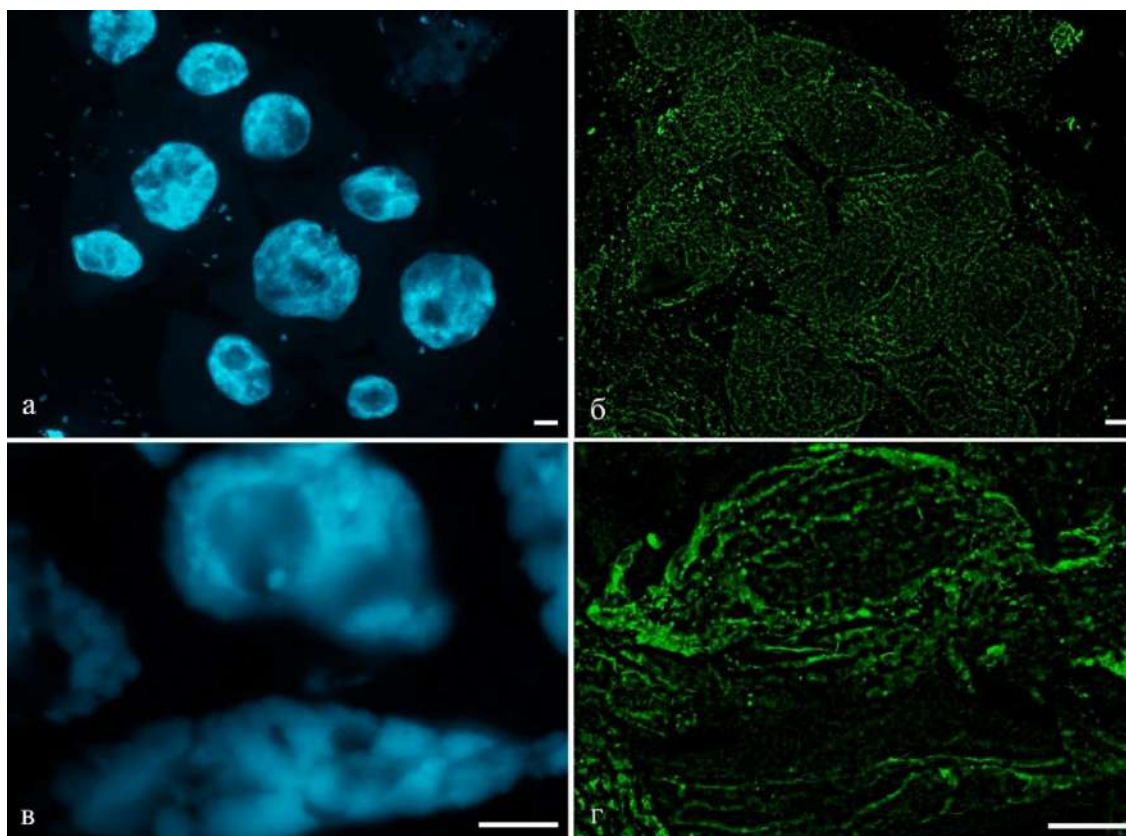


Рис. 105. Микротрубочки клеток антиподального комплекса на стадии дифференцировки. а, в – ядра (DAPI) антиподальных клеток, б, г – пучки микротрубочек (антитела к тубулину, клон DM1 $\alpha$ ) в цитоплазме антиподальных клеток на ранней и средней стадиях дифференцировки. Масштабный отрезок - 20 мкм.

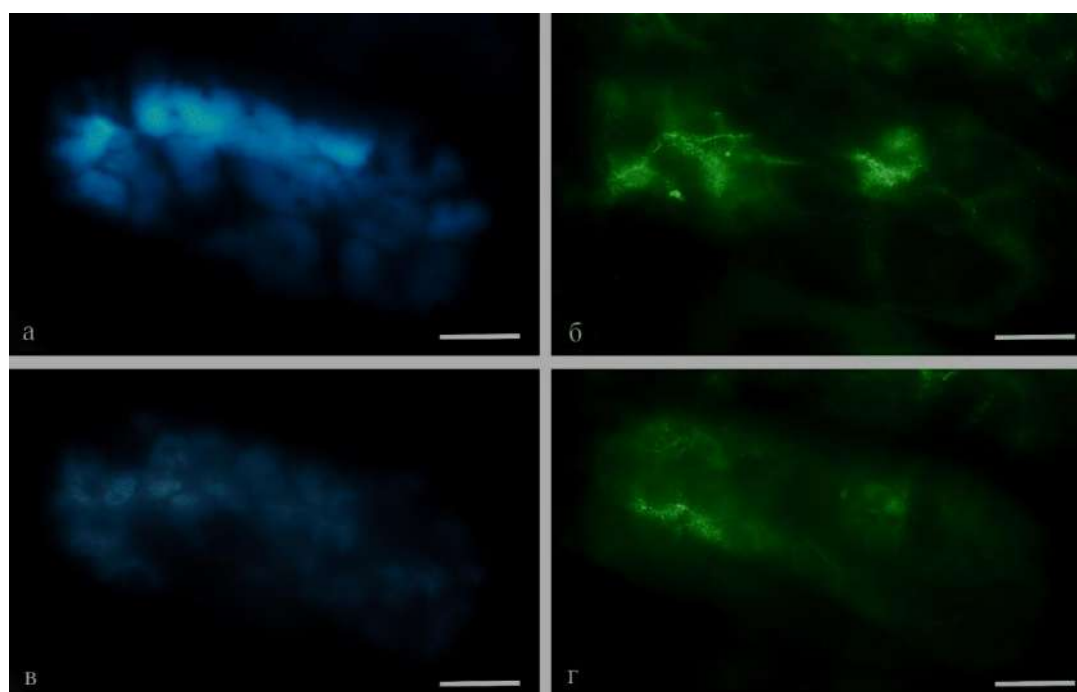


Рис. 106. Микротрубочки цитоплазмы антиподальной клетки на средней стадии программируемой гибели. Хромосомы ядра антиподальной клетки представлена на двух оптических срезах (а, в, DAPI). Редкие, фрагментированные пучки микротрубочек сосредоточены в цитоплазме между инвагинаций ядерной оболочки вокруг политенных хромосом (б, г, DM1 $\alpha$ ). Масштабный отрезок - 20 мкм.

На всех стадиях дифференцировки в клетках всех уровней комплекса выявлялась разветвлённая сеть актиновых филаментов (рис. 107). Протяженные пучки микрофиламентов формируют концентрические круги ядер всех антиподальных клеток, отдельные пучки локализованы в кортексе цитоплазмы под плазматической мембраной. На этапах гибели антиподальных клеток комплекса пучки актиновых филаментов прореживаются.

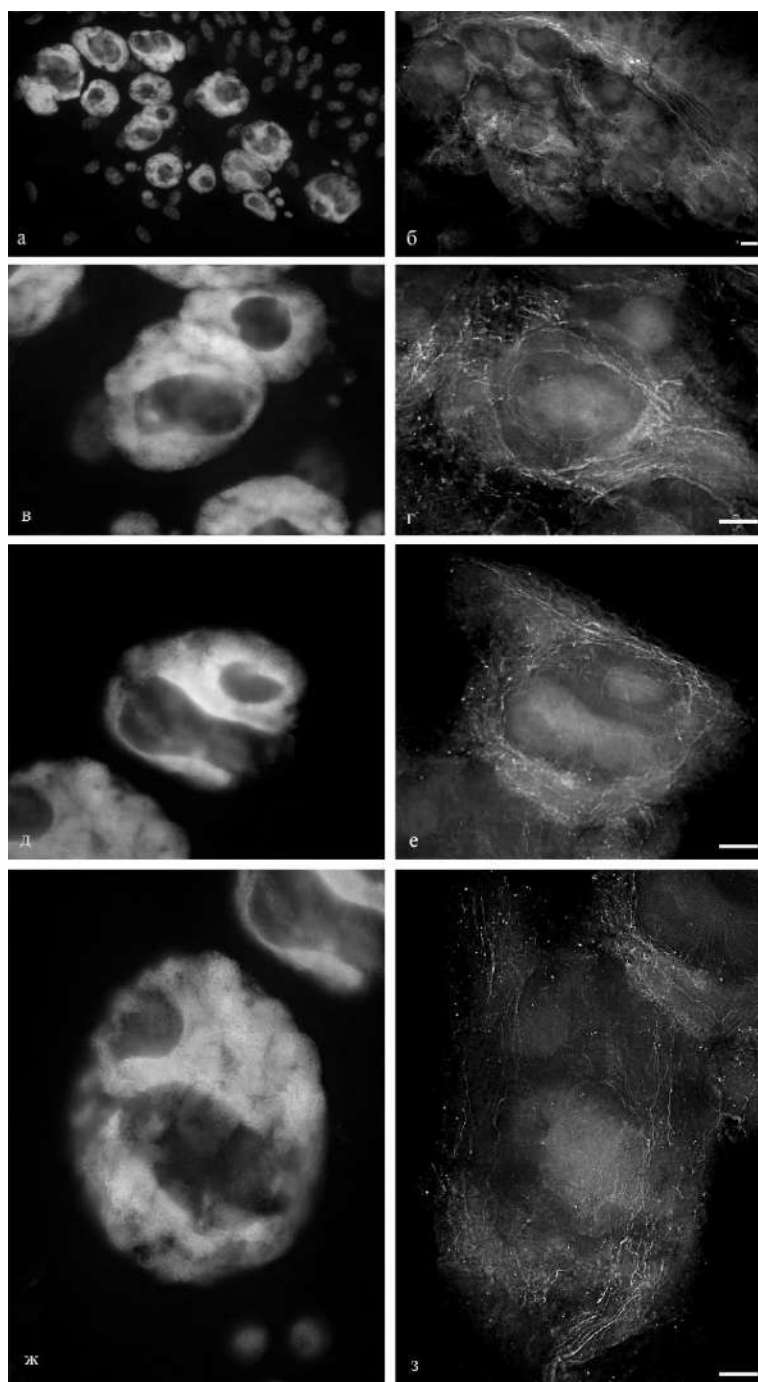


Рис. 107. Актиновые филаменты цитоплазмы антиподальных клеток на стадиях ранней и средней дифференцировки. Микрофиламенты окружают ядра антиподальных клеток комплекса (а) и выявляются между вакуолями и на периферии цитоплазмы (б). Микрофиламенты антиподальных клеток комплекса (в, д, ж – DAPI; актиновые филаменты - г, е, з). Масштабный отрезок - 10 мкм.



#### 4.4.2. Ультраструктура органелл цитоплазмы антиподальных клеток

Гранулярный ретикулум на ранних стадиях дифференцировки имеет вид разветвлённой сети плоских цистерн (20 нм) вблизи ядра (рис. 108, а, б), в цитоплазме клеток выявляются многочисленные цистерны (диаметр 40 нм), покрытые рибосомами (рис. 108, в). На стадии поздней дифференцировки и на стадиях гибели в цитоплазме антиподальных клеток выявляются концентрические круги гранулярного ретикулума (рис. 108, г, ж) и расширенные цистерны (более 60 нм) (рис. д, е) с меньшим количеством рибосом.

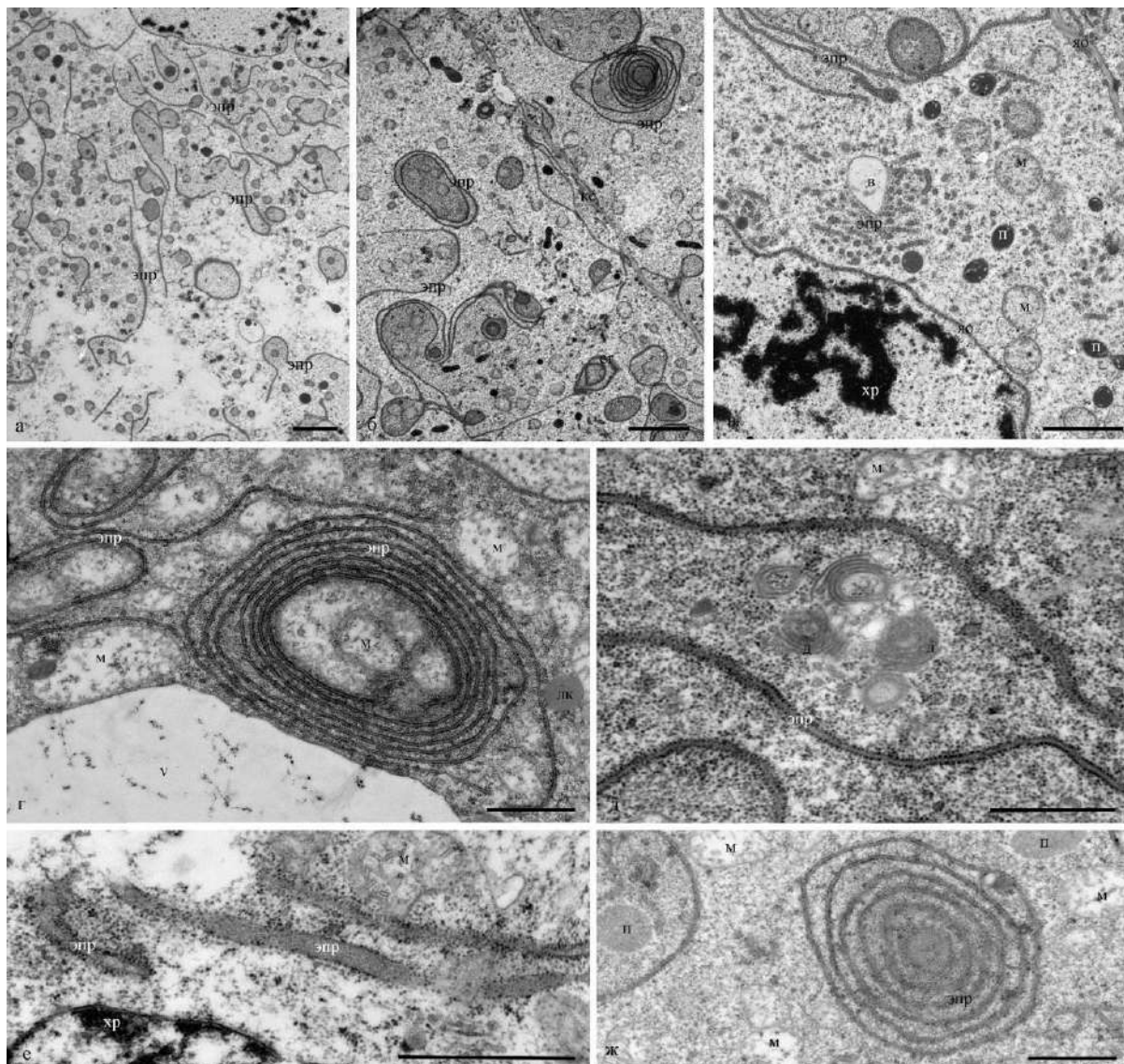


Рис. 108. Ультраструктура гранулярного ретикулума цитоплазмы антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. Сеть протяженных плоских цистерн (а, б, в) и трубочек (в, г) гранулярного ретикулума на ранней стадии дифференцировки. Концентрические круги (г, ж) и расширенные цистерны гранулярного ретикулума на стадиях ПКГ (д, е). Ядерная оболочка - яо; политенные хромосомы - хр; сегрегированные компоненты ядрышка - скяк; гранулярный ретикулум эпр; митохондрии - м; пластиды п; диктиосомы - д; вакуоли - в; клеточная стенка - кс. Масштабный отрезок: а, б, в - 10 мкм; г, д, е, ж - 5 мкм.

На ранних стадиях дифференцировки антиподальных клеток диктиосомы аппарата Гольджи имеют крупные расширенные ампулы с прозрачным содержимым на концах каждого из 6 -7 мешков стопки (рис.109, а, б). Дисковидные цистерны в составе аппарата Гольджи расположены более рыхло и неупорядоченно (рис.109, а, б). На более поздних стадиях развития комплекса (рис. 109, в-е) упорядоченные (параллельные) стопки мешков большинства диктиосом сильно изгибаются (в, д), цистерны аппарата Гольджи имеют разную протяженность (рис. 109, г). Около транс-цистерн выявляются многочисленные везикулы (рис. 109, в). Заметны мелкие ампулы на концах цистерн (рис. 109, в-е).

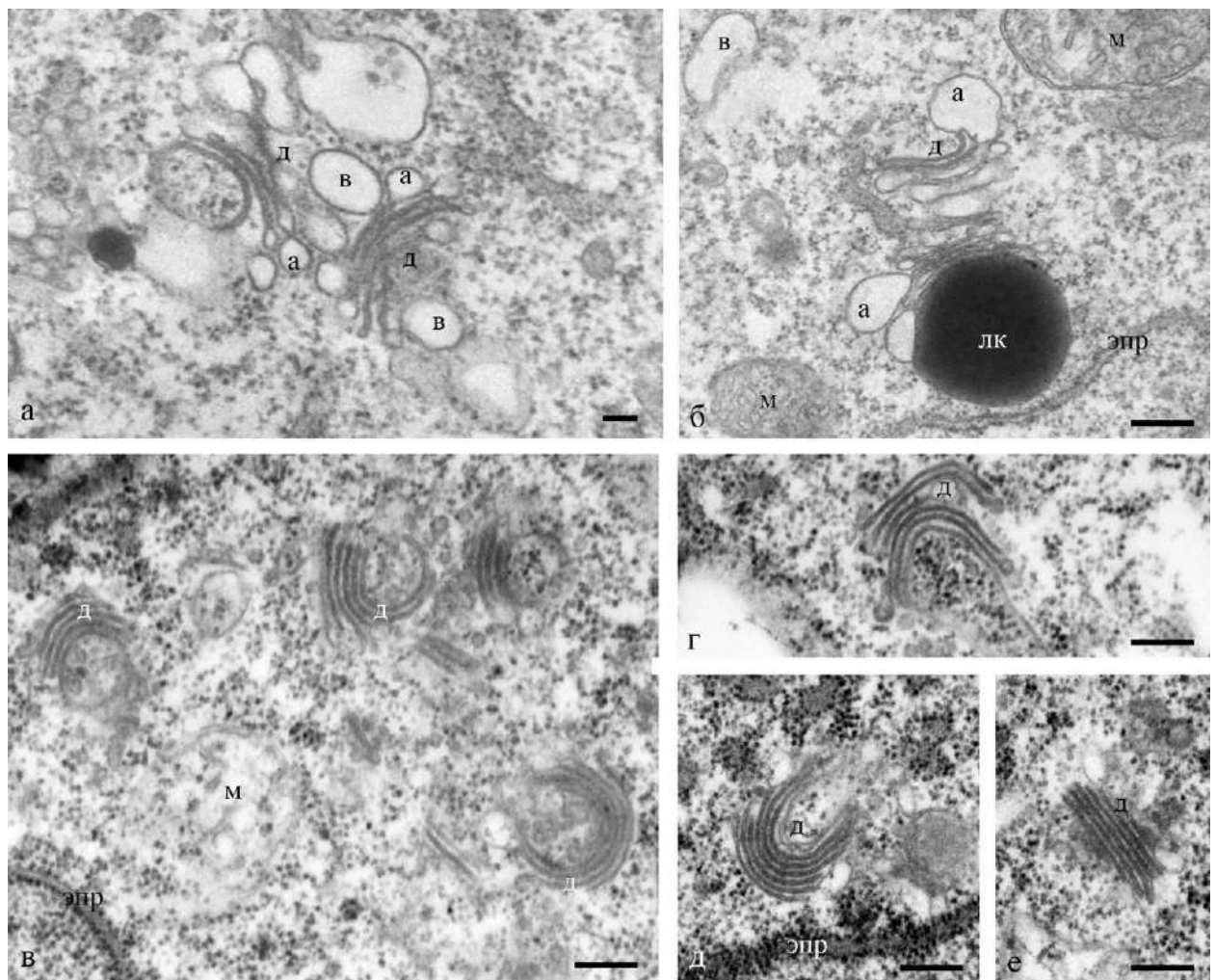


Рис. 109. Ультраструктура аппарата Гольджи в цитоплазме антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. На ранней стадии дифференцировки отдельные диктиосомы состоят из 5-7 плоских цистерн с расширенными ампулами (а, б). На стадиях программируемой клеточной гибели стопки цистерн диктиосом изогнуты (в, г, д, е). Диктиосомы – д; гранулярный ретикулум - эпр; митохондрии - м; вакуоли – в. Масштабный отрезок - 100 нм.

Митохондрии (рис. 110) на стадиях ранней дифференцировки – это небольшие округлые органеллы (диаметр 200 нм) с пальцевидными кристами (диаметр 10-100 нм) (рис.110, а, б). На более поздних этапах в клетках чаще выявляются чашевидные митохондрии (диаметр 1,5 мкм) (рис.110, в, г).

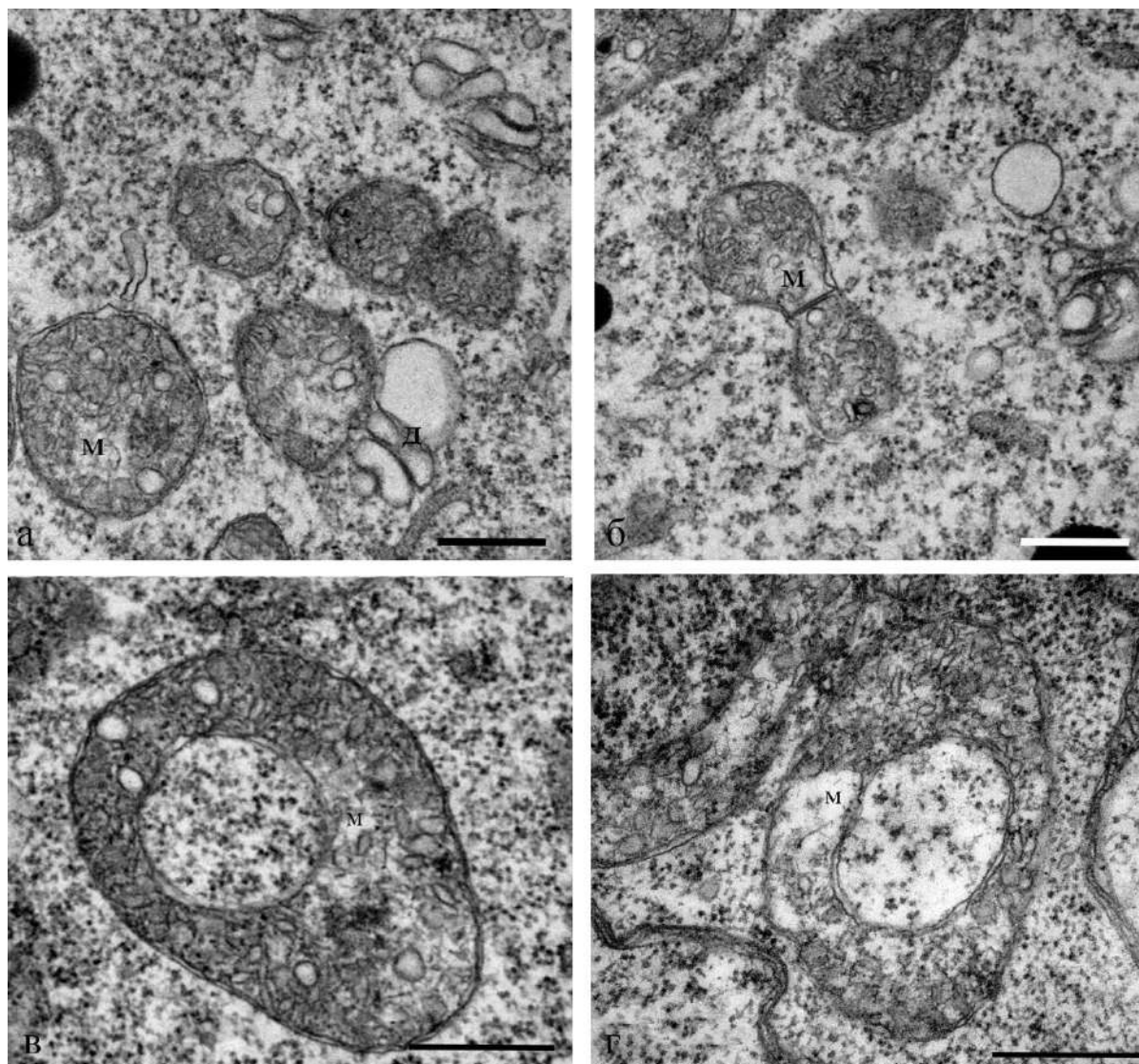


Рис. 110. Ультраструктура митохондрий цитоплазмы антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. Все митохондрии антиподальных клеток имеют пальцевидные неупорядоченные кристы. На ранних этапах дифференцировки митохондрии круглые с диаметром от 0,5– до 1 мкм (а, б), встречаются чашевидные митохондрии с диаметром 1 мкм, на стадиях ПКГ чаще выявляются чашевидные митохондрии (в, г). Масштабный отрезок - 500 нм.

Пластиды в антиподальных клетках представлены лейкопластами. На ранних этапах развития комплекса лейкопласты антиподальных клеток имеют разнообразную форму: выявляются гантелевидные с перетяжками (рис. 111, а) и чашевидными областями, кольцевидные (рис. 111, б), несколькими ламеллами и крахмальными зёрнами, позднее выявляются небольшие палочковидные пластиды с темной стромой и небольшим числом крахмальных зёрен (рис. 111, в). На концах некоторых пластид выявляются белковые тела (рис. 111, г).

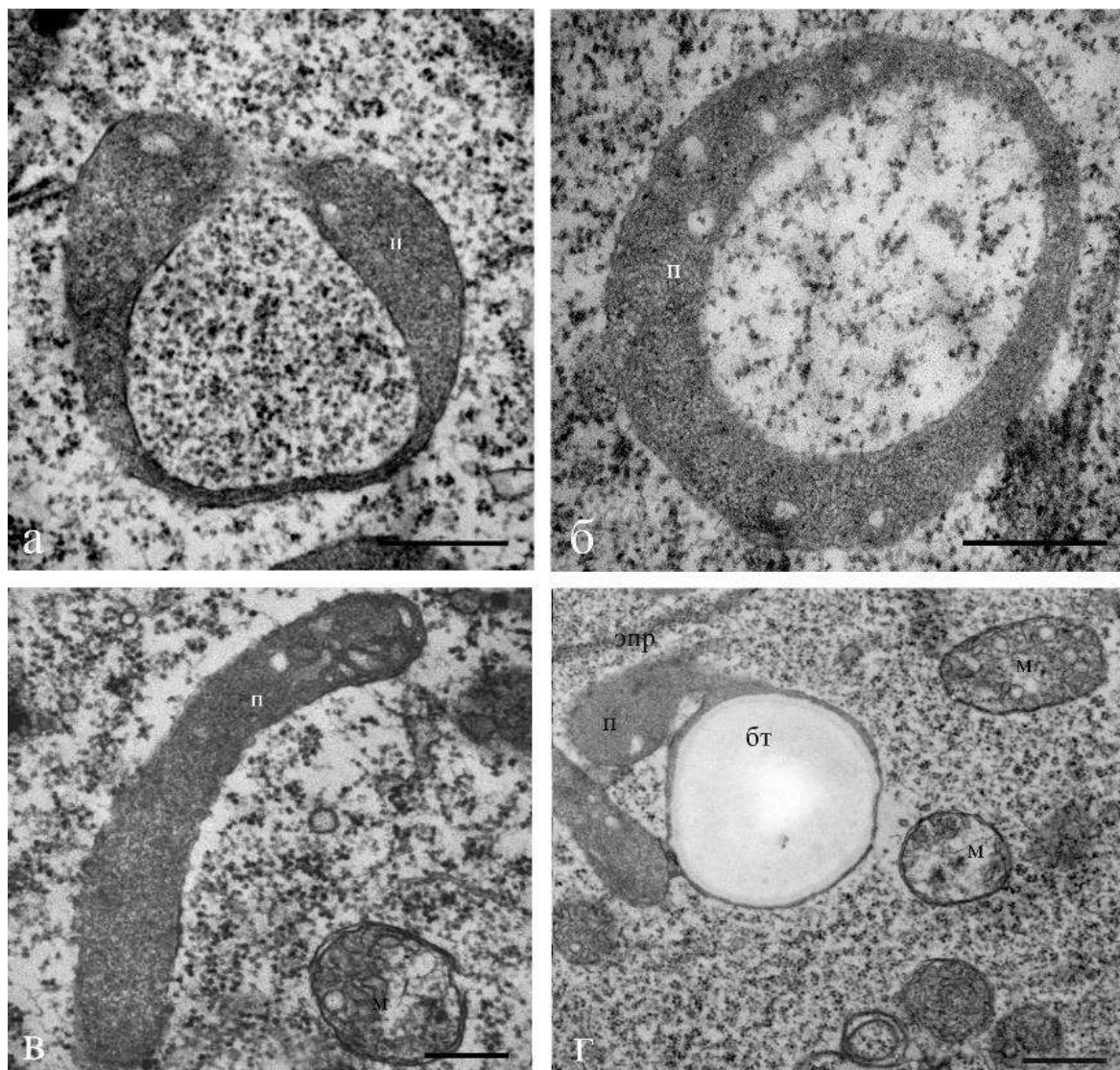


Рис. 111. Ультраструктура пластид (лейкопластов) цитоплазмы антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки. На стадиях активного функционирования клеток форма и размер пластид переменны. У пластид зернистая строма, выявляются единичные ламеллы и несколько мелких крахмальных зёрен (а-г). Пластиды могут иметь перетяжки (а), иметь чашевидную форму (б), форму палочки (в), или сложную форму (г) с белковым телом (бт). Масштабный отрезок - 500 нм.

Многочисленные масляные тельца, окруженные мембраной (рис. 112, а, б) и липидные капли без мембраны (рис. 113, а) выявляются в цитоплазме антиподальных клеток на ранней и средней стадиях дифференцировки около цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и вблизи митохондрий. На поздних стадиях гибели липидные капли можно увидеть и в инвагинациях, и в ядре (рис. 113, б, в).

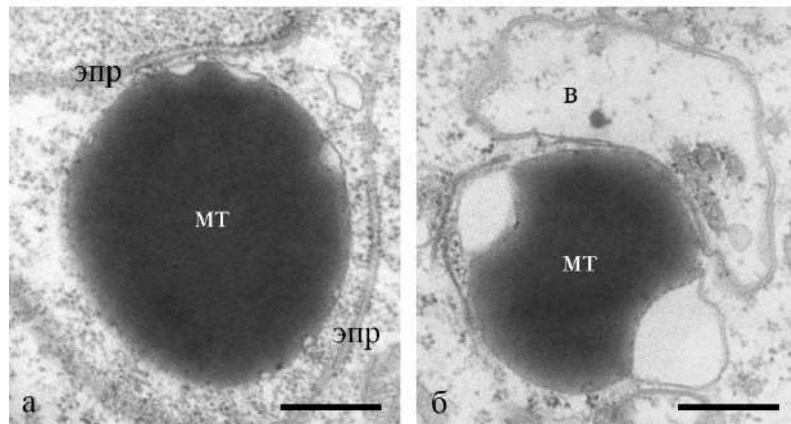


Рис. 112. Ультраструктура масляных телец (мт) антиподальных клеток вблизи ЭПР на стадии ранней дифференцировки. Масштабный отрезок - 2 мкм.

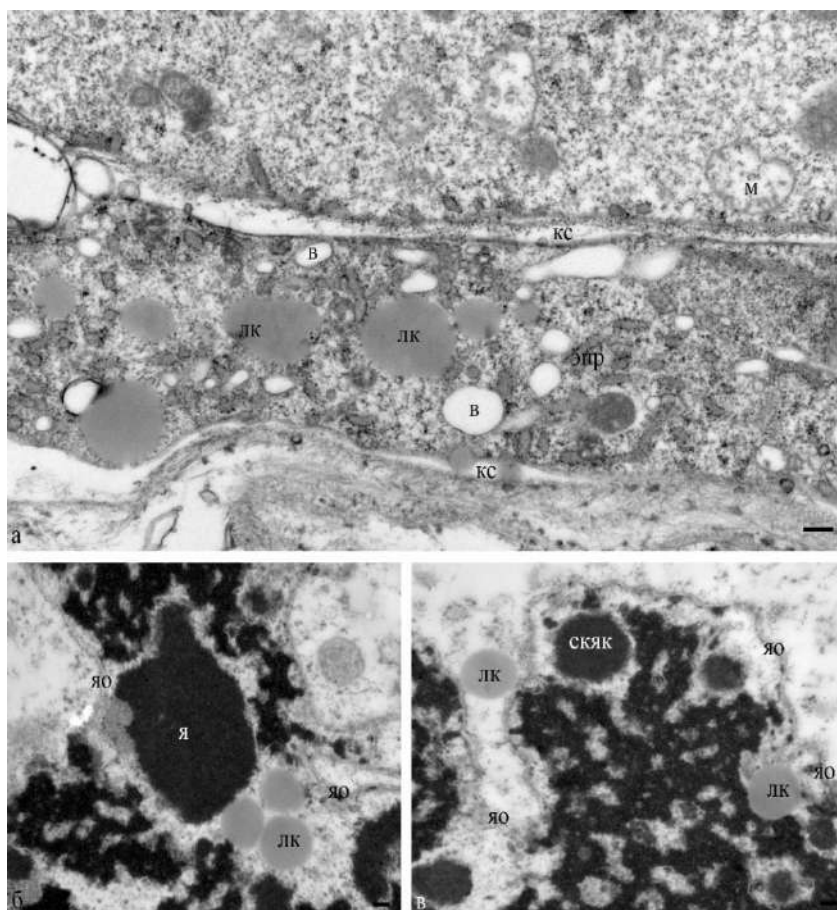


Рис. 113. Ультраструктура липидных капель антиподальных клеток на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели. Липидные капли (лк) в цитоплазме клетки на стадии дифференцировки – а вблизи ядра и в ядре антиподальных клеток на стадии ПКГ – б, в. лк – липидные капли; клеточная стенка кс; ядерная оболочка яо; вакуоли в. Масштабный отрезок - 2 мкм.

Структура клеточных стенок между антиподальными клетками неоднородная, толщина её неодинаковая, в ней наблюдаются неупорядоченные микрофибриллы гемицеллюлозы (рис. 114, а, б), липидные капли и везикулы (рис. 114, а, б), встречаются явления экзоцитоза мультивезикулярных тел в клеточные стенки или апопласт (рис. 114, а). Мультивезикулярные тельца часто объединены с плазматической мембраной и также выявляются в цитоплазме (рис. 115).

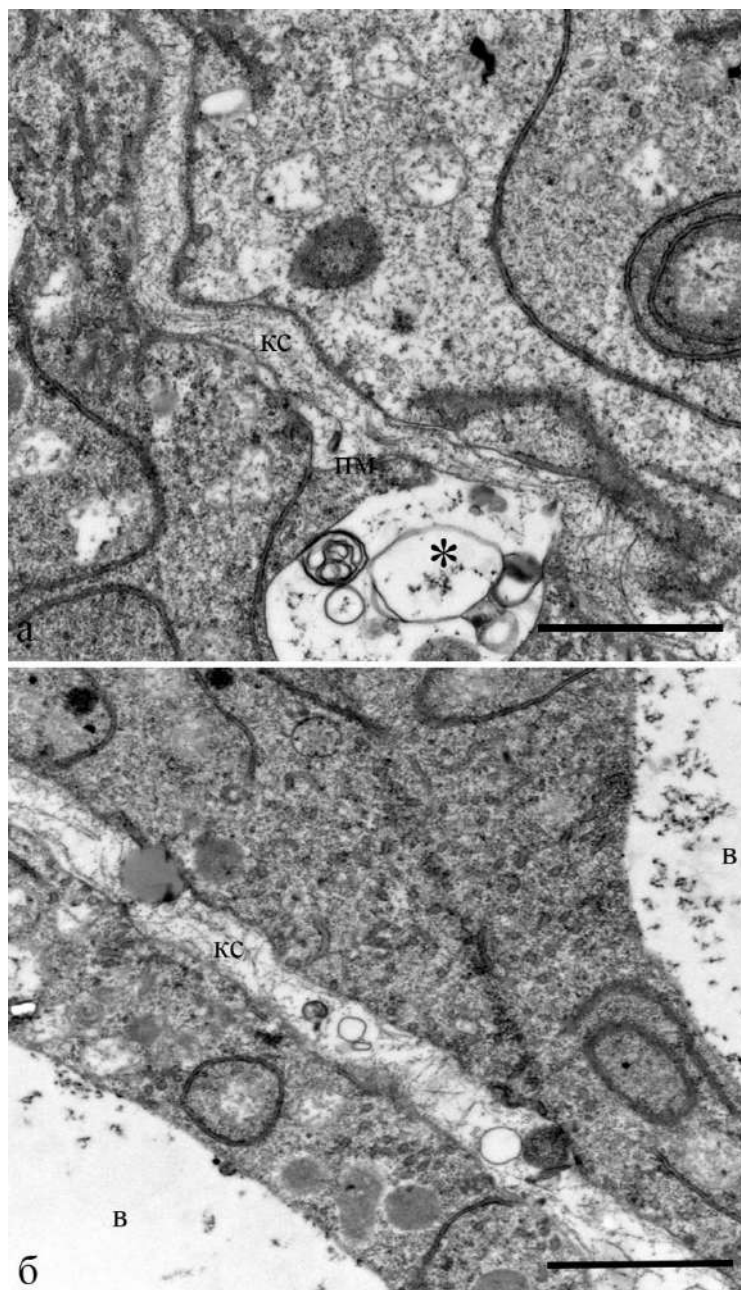


Рис. 114. Ультраструктура клеточных стенок антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки. Клеточные стенки (кС) между антиподальными клетками имеют неодинаковую толщину и неупорядочно расположенные микрофибриллы гемицеллюлозы, \* - мультивезикулярное тело, объединенное с плазматической мембраной (пм). Масштабный отрезок - а - 2 мкм; б - 5 мкм.

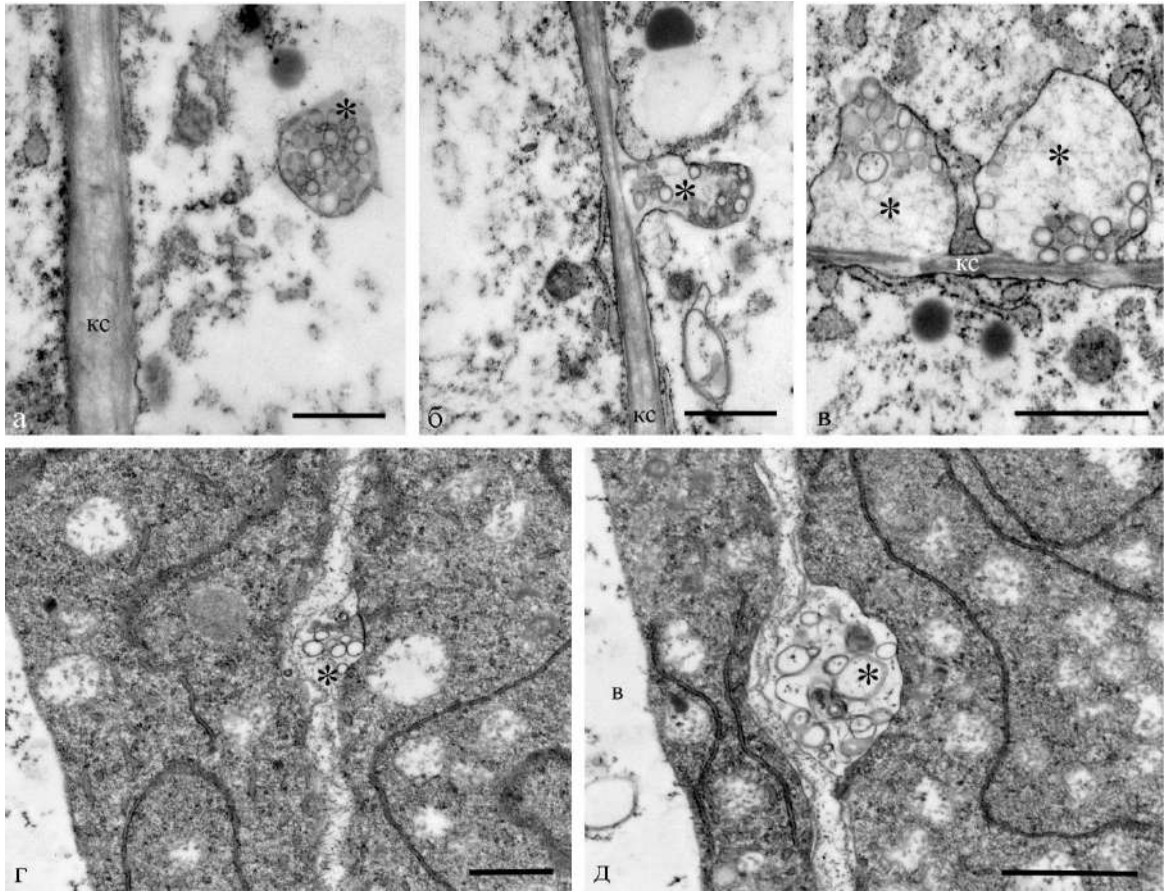


Рис. 115. Ультраструктура мультивезикулярных телец антиподальных клеток на стадиях дифференцировки в цитоплазме антиподальных клеток (а), объединенные с плазматической мембраной (б, в). В области клеточных стенок обнаружены компоненты мультивезикулярных телец (г, д, звездочки). Масштаб – а – 2 мкм; б, в – 1 мкм, г, д – 2 мкм.

Наблюдался перенос органелл – пластид и митохондрий через широкие каналы клеточной стенки между клетками (рис. 116) и между антиподальными клетками и ценоцитом эндосперма.

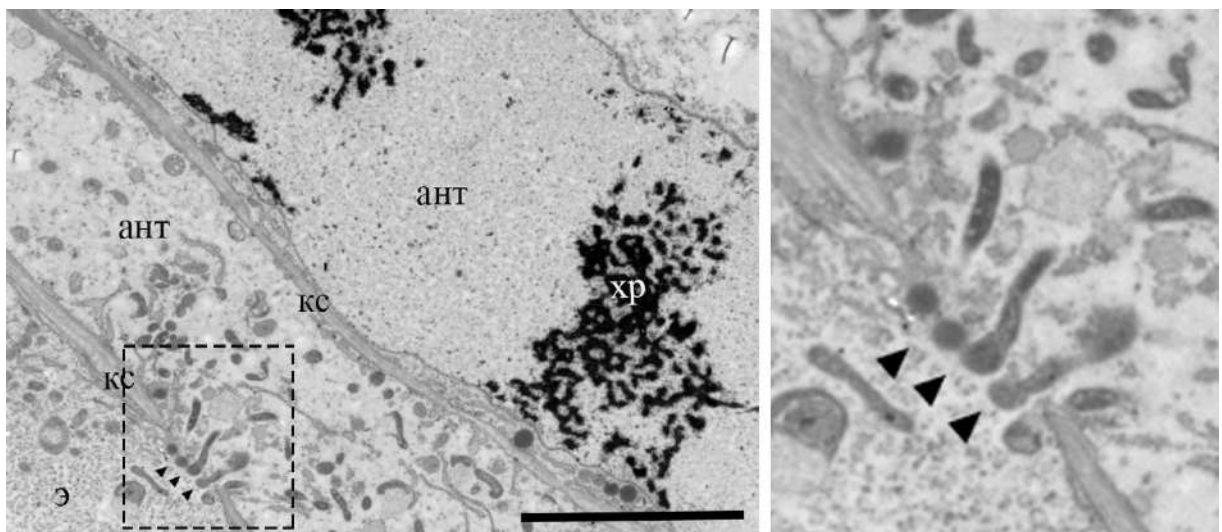


Рис. 116. Перенос различных органелл из антиподальной клетки (ант) в эндосперм (э) через широкие каналы (стрелки) в клеточной стенке (кс). Масштабный отрезок - 2 мкм.

#### 4.5. Периодизация развития антиподальных клеток

В работе была поставлена задача установления корреляции характерных морфологических признаков клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы на этапах дифференцировки и программируемой клеточной гибели со временем после опыления материнского растения. Для этого нами была проведена кастрация и ограниченно свободное опыление растений пшеницы, и проведен микроскопический анализ тотальных препаратов зародышевых мешков, выделенных из семязачек, зафиксированных на разных сроках после опыления.

Выявили, что ранняя дифференцировка антиподальных клеток (рис. 36, а) происходит до 24 часов после опыления, на этой стадии хромосомы антиподальных клеток не индивидуализированы. Средняя дифференцировка (рис. 36, б), при которой одной из важных характеристик ядра является наличие индивидуальных политенных хромосом, наступает через 48 часов, а поздняя стадия дифференцировки (рис. 36, в), на которой наблюдается уплощение ядер - через 72-96 часов. На стадии поздней дифференцировки могут наблюдаться явления экструзии материала ядрышка и хроматина в цитоплазму антиподальных клеток.

Ранняя стадия клеточной гибели (рис. 36, г) выявлялась через 120 часов, в некоторых клетках на этой стадии наблюдались разрывы ДНК, 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, сегрегация ядрышка, экструзия компонентов ядра. Поздняя стадия гибели (рис. 36, д), сопровождающаяся полной абсорбцией клеток, происходила на 8-10 сутки после опыления.



#### 4.6. Уровень экспрессии генов

Для выявления уровня экспрессии генов нами были взяты образцы антиподальных клеток, зародышевых мешков и корней.

В качестве исследуемых генов мы выбрали *YUCCA 9* (ген, связанный с метаболизмом ауксина), *cytochrome p450*, *AT5G01860* (суперсемейство этилена C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and C<sub>2</sub>HС zinc fingers superfamily protein), *At1g77790* (ген белка из семейства гликозил гидролаз 17) *Hsp70* (ген белка теплового шока), *At2g31030* (ген белка, связывающегося с оксистеролом). Для данных генов были найдены ортологи у пшеницы с помощью базы данных Plaza (таблица 3).

Таблица 3. Исследуемые гены и их ортологи у пшеницы.

Ген <i>Arabidopsis</i>	Функция	Предполагаемый ортолог у <i>Triticum</i>
<i>YUCCA 9</i>	Auxin metabolism (метаболизм ауксина)	<i>TraesCS2A02G011500</i>
<i>AT3G12580</i>	Cytochrome p450 (цитохром p450, детоксикация)	<i>TraesCS7D01G427500LC.1</i>
<i>AT5G01860</i>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> and C <sub>2</sub> HС zinc fingers superfamily protein (белок из семейства C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> and C <sub>2</sub> HС, содержащий домен цинковый палец, метаболизм этилена)	<i>TraesCS7A02G276700</i>
<i>At1g77790</i>	Glycosyl hydrolase family 17 protein (белок из семейства гликозил-гидролаз)	<i>TraesCS1A02G312700</i>
<i>At3g14630</i>	<i>Hsp70</i> (ген белка теплового шока)	<i>LOC543123</i>
<i>At2g31030</i>	Oxysterol-binding family protein (оксистерол-связывающий белок)	<i>TraesCS4B02G042300</i>

Использованные праймеры представлены в таблице 4.

Таблица 4. Праймеры, использованные в работе.

Ген	Функция	Праймеры, Seq 5' to 3'
<i>LOC543123F</i>	Ген белка теплового шока	TGAACCCCATCAACACCGTC

<i>LOC543123R</i>	Ген белка теплового шока	ТТААТГТCACTCTGACAGGGCA
<i>TraesCS7D01G427500LC.1F</i>	Цитохром р450	CGTGATCGCCGTGATTCTTC
<i>TraesCS7D01G427500LC.1R</i>	Цитохром р450	TCGAGGCTCTTGAGGACCATA
<i>TraesCS1A02G312700F</i>	Белок из семейства гликозил-гидролаз	GGCGTACAACAACAACGTGA
<i>TraesCS1A02G312700R</i>	Белок из семейства гликозил-гидролаз	GAACAGGTACGTCTCCACGG
<i>TraesCS2A02G011500F</i>	Метаболизм ауксина	TCATGGGCAAGTCCACCTTC
<i>TraesCS2A02G011500R</i>	Метаболизм ауксина	TCTTGTGCGACGAACCAGAGC
<i>TraesCS4B02G042300F</i>	Оксистерол-связывающий белок	GCTGTAAGCCCTTCAACCCT
<i>TraesCS4B02G042300R</i>	Оксистерол-связывающий белок	AGCCATTTCCCTCACAGTGG
<i>TraesCS7A02G276700F</i>	Метаболизм этилена	GGAGATAGTGGCCAAGCTGC
<i>TraesCS7A02G276700R</i>	Метаболизм этилена	CGTGCACACGATGAACGTAG
<i>Ta54227F</i>	Референсный ген	CAAATACGCCATCAGGGAGAACATC
<i>Ta54227R</i>	Референсный ген	CGCTGCCGAAACCACGAGAC

Относительные уровни экспрессии генов в антиподальных клетках представлены в таблице 5. Наиболее сильно экспрессируемые в антиподальных клетках оказались гены цитохрома р450 (в 4,6 раза сильнее референсного гена) и Hsp70 (в 10,4 раза сильнее референсного гена).

Таблица 5. Уровень экспрессии генов в антиподальных клетках.

Антиподальные клетки				
Ta54227	1	1	1	медиана
YUCCA 9 – auxin metabolism	0,218	0,157	0,145	0,157
Cytochrome p450	4,8	4,1	4,68	4,68
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> and C <sub>2</sub> HC zinc fingers superfamily protein	0,913	0,923	0,866	0,913
Glycosyl hydrolase family 17 protein	0,703	0,498	0,55	0,55
Hsp70	11	10,4	9,7	10,4
Oxysterol-binding family protein	2	1,4	1,3	1,4

Для сравнения мы определили относительные уровни экспрессии этих же генов в клетках целого зародышевого мешка и корня (рис. 117 и 118). Если сравнить данные по чистой фракции антиподальных клеток и фракцию всех клеток зародышевого мешка (содержащую зародыш, эндосперм и антиподальные клетки) (рис.117), то экспрессия всех

генов за исключением *YUCCA 9* (метаболизм ауксина) в антиподальных клетках больше, чем в клетках зародышевого мешка. Экспрессия гена цитохрома p450 больше в 1,9 раза, гена белка, связанного с метаболизмом этилена - в 2,1 раза, гена белка из семейства гликолиз-гидролаз - в 3,9 раза, *Hsp70* (гена белка теплового шока) - в 9,5 раза, гена оксистерол-связывающего белка - в 6,3 раза.

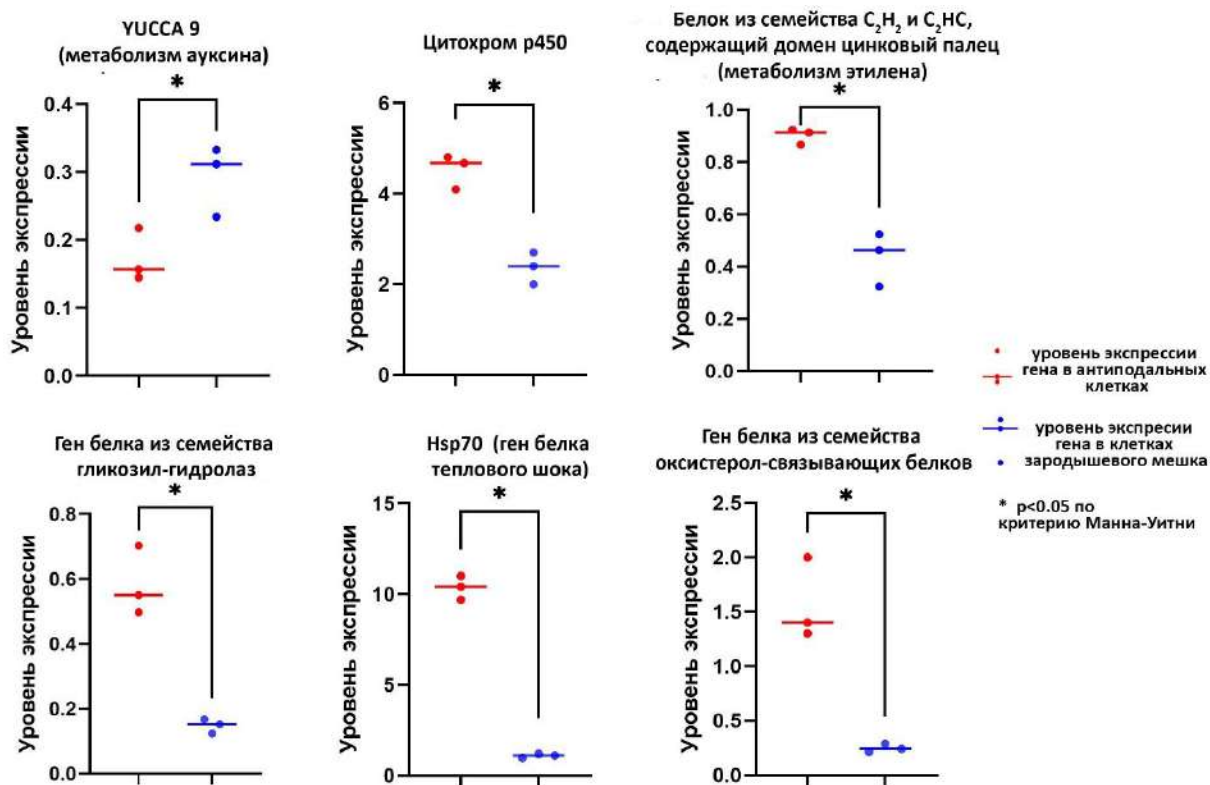


Рис.117. Уровень экспрессии генов в антиподальных клетках по сравнению с клетками зародышевого мешка, линия – медиана, \* - p < 0.05 по критерию Манна-Уитни

Следует отметить, однако, что в клетках корня уровни экспрессии большинства исследованных нами генов выше, чем в антиподальных клетках (рис. 118). Заметным исключением является лишь ген *Hsp70*, который экспрессируется в антиподальных клетках в 1,8 раза сильнее, чем в клетках корня.

Для сравнения использовался t-критерий, различия считали значимыми при p < 0.05.

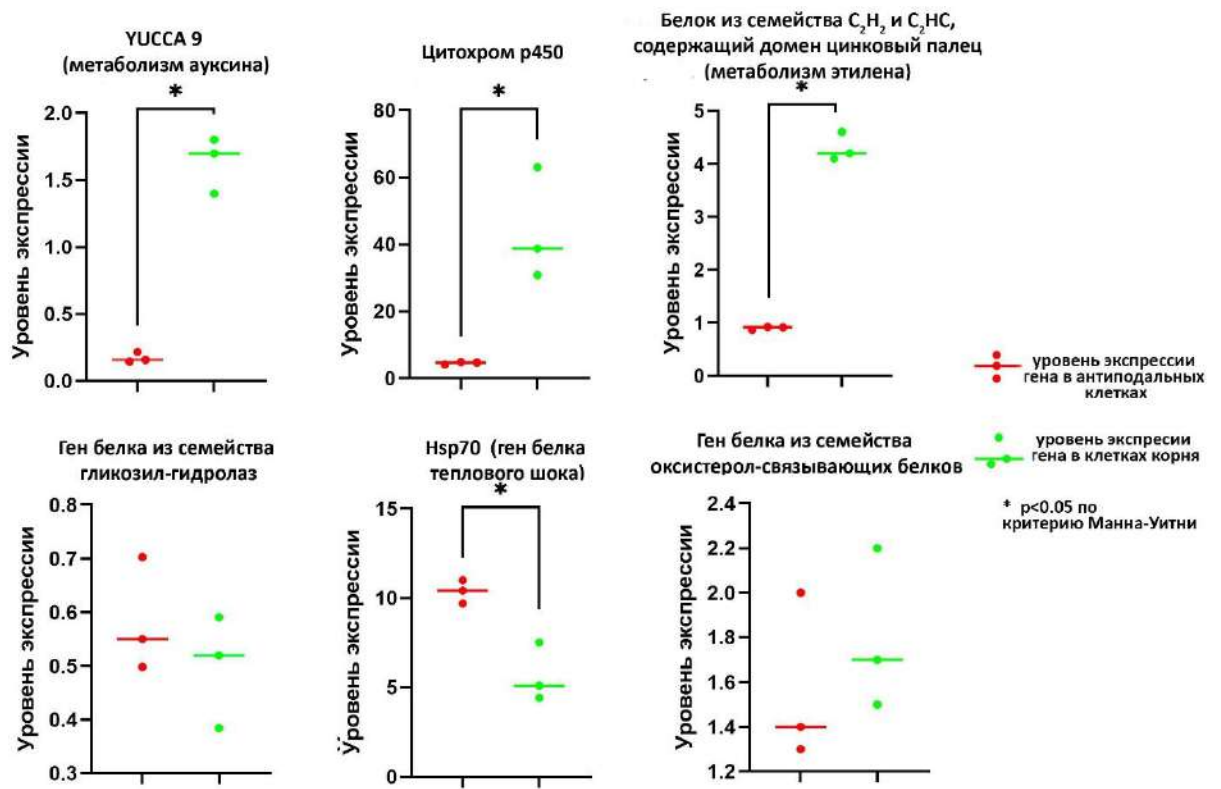


Рис.118. Уровень экспрессии генов в антиподальных клетках по сравнению с клетками корня, линия – медиана, \* -  $p < 0.05$  по критерию Манна-Уитни

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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

Были также использованы тезисы докладов (см. раздел 8.2)

### 5.1. Морфология клеток зародышевого мешка пшеницы, количество и продолжительность жизни

Комплекс антиподальных клеток локализуется в халазально-латеральной части зародышевых мешков растений (Батыгина, 1994). Для антиподальных клеток разных видов растений характерен полиморфизм - вариабельность их морфологии, количества и продолжительности жизни (Батыгина, 1994). Антиподальные клетки у большей части растений погибают до или вскоре после оплодотворения, однако у некоторых групп растений, в частности, злаков, антиподальные клетки сохраняются длительное время после оплодотворения. На ранних стадиях развития антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы, протекающих до оплодотворения, три инициальные антиподальные клетки делятся и формируют три яруса: базальный, граничащий с нуцеллусом, апикальный, граничащий с эндоспермом и средний, располагающийся между ними. В ядрах антиподальных клеток после многочисленных раундов эндоредупликации формируются гигантские политенные хромосомы (Чабан и др., 2011).

У *Zea mays* было выявлено 20 (Dibol, 1968) – 25 (Weatherwax, 1926) антиподальных клеток. У *Oryza sativa* разные исследователи наблюдали 3-5, 5, 5-10, 10-15, 6-20 антиподальных клеток, продолжительность жизни которых составляла трое суток после опыления (Maeda and Myake, 1996). Были проанализированы комплексы антиподальных клеток разных сортов *Triticale*, у которых продолжительность жизни варьировала от 96 до 120 часов после опыления (Kaltsikes, 1973). У *Hordeum vulgare* выявляли 35-55 (Engell, 1994), 50-70 антиподальных клеток (Петрова и др., 1985), продолжительность жизни которых составляла 5-6 суток после опыления, у *Secale cereale* 16-32 антиподальных клеток, у пшеницы 8-20 (Morrison, 1955), 15-25 (Bennett, 1973), 20 и более (Wei-Cheng et al., 1988), 25-27 (Чабан и др., 2011), 24-36 клеток (Троичинська, Бланковська, 2006) и продолжительность жизни 5-7 дней (Morrison, 1955; Bennett, 1973). Продолжительность жизни антиподальных клеток в неоплодотворенных зародышевых мешках не изучалась.

В изученных нами оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешках пшеницы количество антиподальных клеток варьировало от 20 до 27. Продолжительность жизни антиподальных клеток после оплодотворения (как в оплодотворенных, так и в неоплодотворенных зародышевых мешках) составляла около 10 дней. Стадия

дифференцировки занимала до 4 суток, первые признаки гибели начинали выявляться на 4-5 сутки после опыления.

На основании данных, полученных при изучении структуры тотальных препаратов оплодотворенных (рис. 119) и неоплодотворенных (рис. 120) зародышевых мешков на разных сроках развития семязачатка нами построена схема преобразования клеток антиподального комплекса зародышевых мешков в ходе их дифференцировки и гибели.

В оплодотворенных зародышевых мешках (рис. 1179) на ранней стадии дифференцировки все клетки антиподального комплекса имеют ядра сходного размера и цитоплазму с двумя крупными вакуолями (рис. 119, а). Позднее в части ядер выявляются индивидуальные политенные хромосомы (рис. 119, б). Начало клеткообразования в синцитии эндосперма совпадает с началом программируемой клеточной гибели

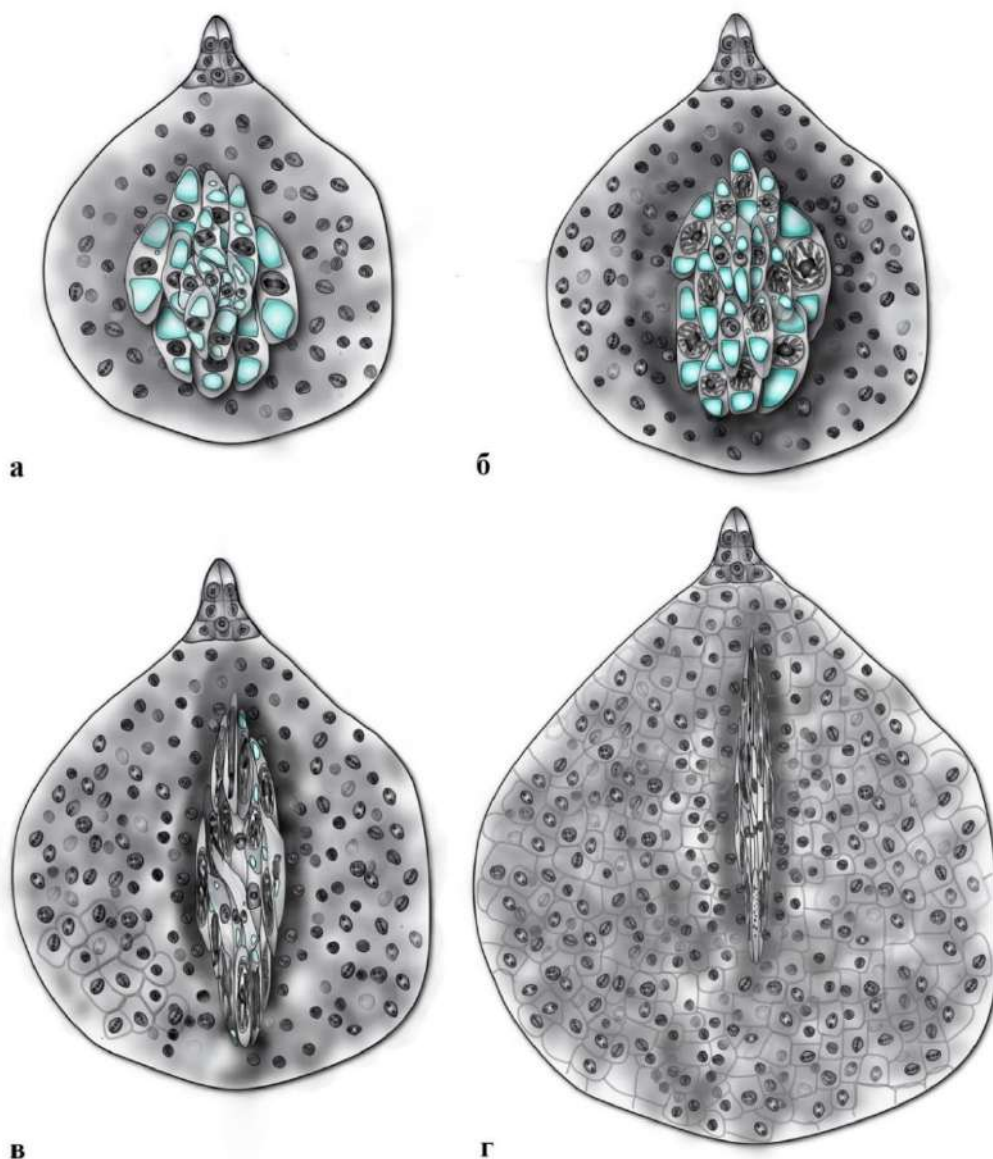


Рис. 119. Антиподальные комплексы оплодотворенных зародышевых мешков пшеницы. Клетки антиподальных комплексов на разных стадиях дифференцировки (а – ранняя, б – поздняя) и гибели (в – ранняя, г – поздняя).

антиподальных клеток (рис. 119, в), на стадии многослойного клеточного эндосперма антиподальные клетки полностью резорбируются его клетками (рис. 119, г).

В неоплодотворенных зародышевых мешках выявляются полностью сформированные антиподальные комплексы, которые также проходят стадию дифференцировки (рис. 120, а, б) и гибели (рис. 120, в, г). Однако 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. Предполагается, что именно эндосперм в оплодотворенных мешках является индуктором клеточной гибели (Чабан и др., 2011), в неоплодотворенных же зародышевых мешках присутствует только центральная клетка, которая, напротив, выделяет ауксины для роста антиподальных клеток (Chetoor and Evans, 2015).

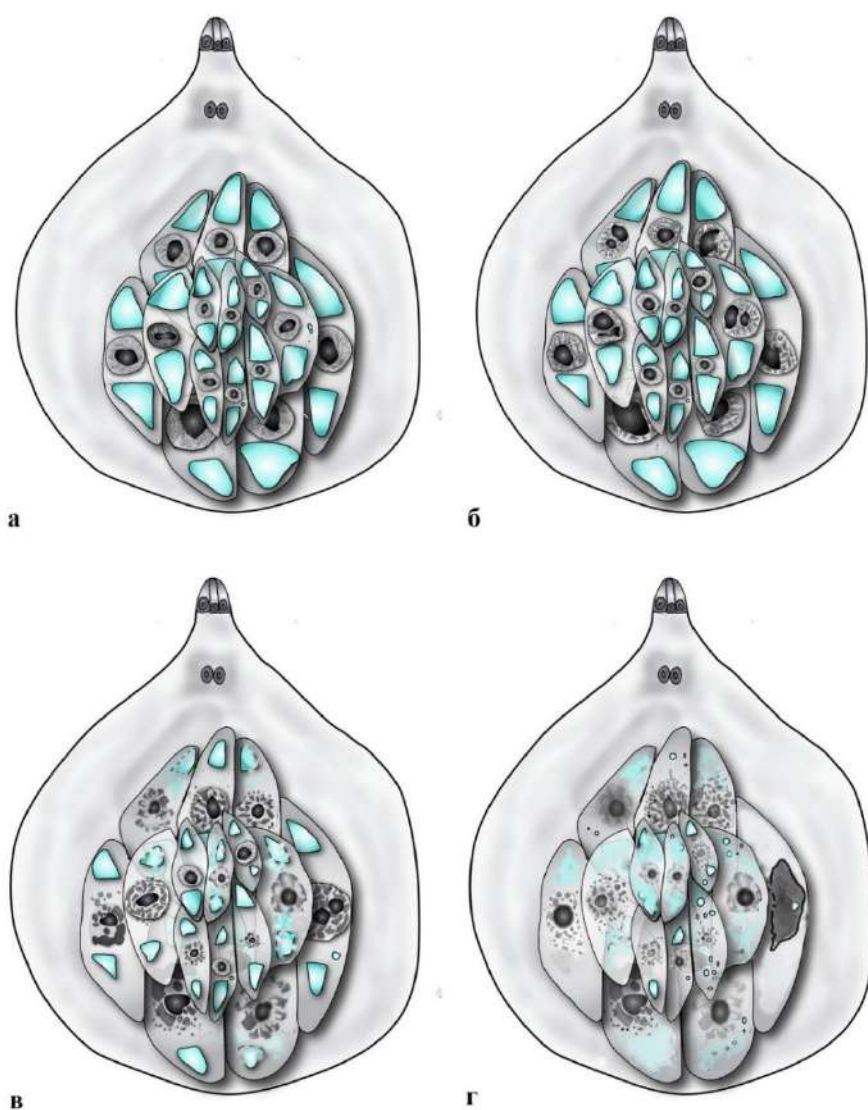


Рис. 120. Антиподальные комплексы неоплодотворенных зародышевых мешков пшеницы. Клетки антиподальных комплексов на разных стадиях дифференцировки (а – ранняя, б – поздняя) и гибели (в – ранняя, г – поздняя).

### 5.2.1. Структура ядер антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки и клеточной гибели

Антиподальные клетки большей части злаков, в частности, *Oryza sativa* (Maeda and Miyake, 1996), *Hordeum vulgare* (Engell, 1994), *Triticale* (Kaltsikes, 1973), *Secale cereale*, *Triticum aestivum* (You and Jensen, 1984) имеют одно ядро. Антиподальные клетки *Zea mays* многоядерные (Dibol and Larson, 1966), в их клетках содержится 5-6 ядер (Weatherwax, 1926). У *Avena sativa* (Krawtczyk, 2016) и *Phleum boehmeri* (Joachimiak, 1981) в составе одного антиподального комплекса присутствуют как одноядерные, так и двуядерные антиподальные клетки.

Антиподальные клетки злаков имеют крупный размер (Dibol and Larson, 1966; Dibol, 1968; Kaltsikes, 1973; You and Jensen, 1984; Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997). Так, у *Oryza sativa* ядра имеют диаметр более 25 мкм (Maeda and Miyake, 1996), у *Hordeum vulgare* около 60 мкм (Петрова и др., 1985). В ядрах выявляются очень крупные ядрышки, содержащие вакуоли (Dibol and Larson, 1966; Dibol, 1968; Kaltsikes, 1973; You and Jensen, 1984; Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997). Ядерная оболочка формирует многочисленные инвагинации (Morrison, 1954; Hoshikawa, 1960; Diboll, Larson, 1966; Diboll, 1968; You, Jensen, 1985; Engell, 1994; Maeda et al., 1996; Maeda et al., 1997).

В ядрах антиподальных клеток функционируют гигантские политенные хромосомы, структура которых отличается от структуры политенных хромосом животных отсутствием соматической конъюгации хроматид, и, следовательно, связанной с этим поперечной исчерченности - картиной дисков и междисков (Ивановская, 1973; Конарев, Блюденев, 1978; Петрова и др., 1985; Пушкина и др., 1989; Хрусталева и др., 2010; Чабан и др., 2011; Доронина и др., 2019).

В течение периода дифференцировки антиподальных клеток после многочисленных раундов эндоредупликации ploидность антиподальных клеток значительно увеличивается и у пшеницы может максимально достигать 256С (Bennett, 1973).

Антиподальные комплексы клеток *Triticum aestivum* L. с ядрами разной морфологии-фибрилярными, с политенными хромосомами и сильно вытянутыми описаны ранее в работе Лазаревой и Ченцова. С помощью Ag-Nor окрашивания и иммуноцитохимического выявления фибрилларина в ядрах антиподальных клеток комплексов на ранней стадии развития выявляли крупные ядрышки и латентные мини-ядрышки и на поздних стадиях онтогенеза компоненты ядрышек в телах политенных хромосом (Лазарева, Ченцов, 2004). Наши данные подтверждают полученные ими факты.



В работе Чабан с соавторами впервые описано формирование трёхуровневого комплекса антиподальных клеток пшеницы и показано, что размеры ядер антиподальных клеток на стадии дифференцировки после оплодотворения отличаются: наибольшего размера достигают ядра клеток апикального яруса. В составе гигантских хромосом выявляются отдельные фибриллы – хромонемы, в ходе развития размеры ядрышек увеличиваются, клетки удлиняются (Чабан и др., 2011).

Согласно нашим наблюдениям, морфология ядер антиподальных комплексов зародышевых мешков пшеницы менялась в ходе развития. На основании характерных

Структура ядер клеток антиподального комплекса на стадии дифференцировки

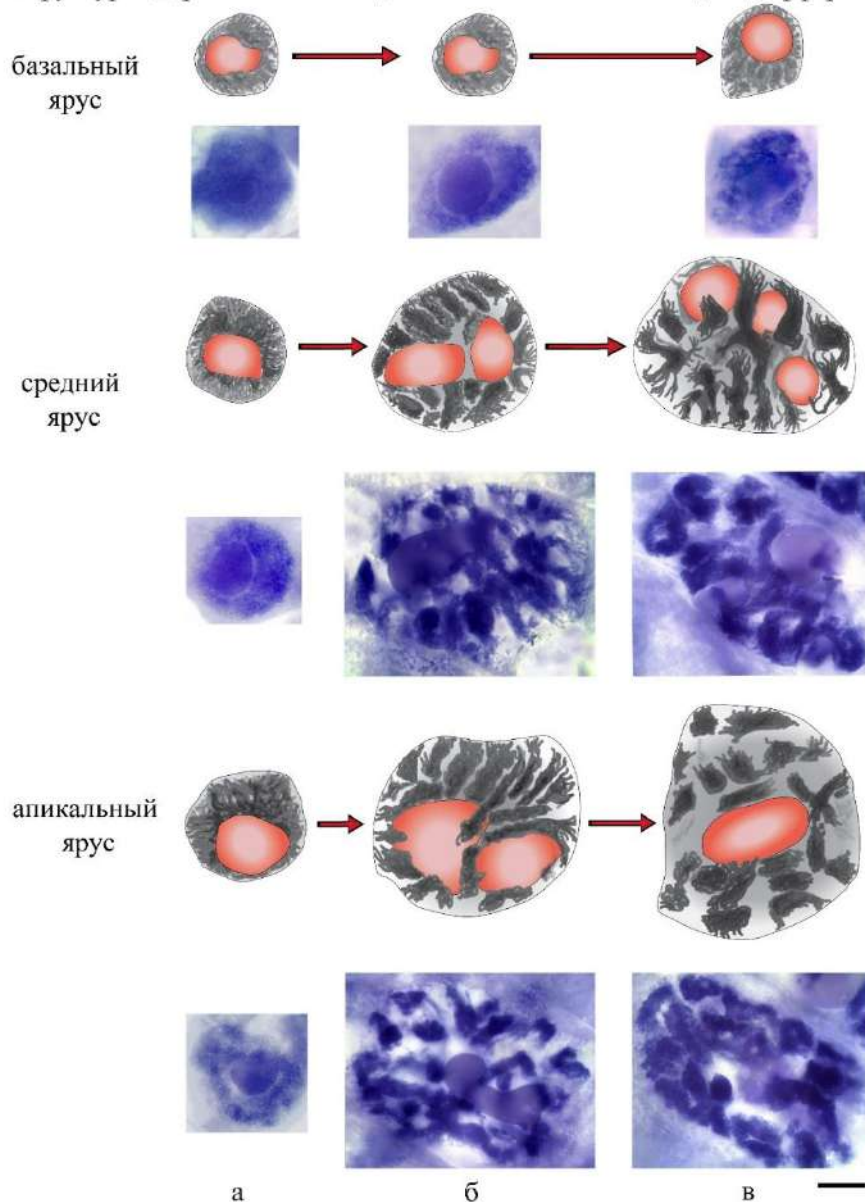


Рис. 121. Ядра антиподальных клеток на разных стадиях дифференцировки комплекса. Гематоксилин Каррачи. а – фибриллярные эндополиплоидные ядра ярусов комплекса на ранней стадии дифференцировки. б, в – обособленные индивидуальные политенные хромосомы ядер среднего и апикального яруса на средней и поздней стадии дифференцировки. Масштабная линейка – 30 мкм.

изменений ядра нами были выделены три стадии дифференцировки – ранняя, средняя и поздняя. На основании полученных данных была создана схема преобразований ядер клеток разных ярусов антиподальных комплексов на стадии дифференцировки (рис. 121).

Антиподальные клетки на ранней и средней стадиях дифференцировки имели одно крупное ядро и от одного до четырех ядрышек. Ядра имели округлую форму, и диаметр ядер до 20 мкм на ранней и до 30 мкм на средней стадии дифференцировки. На ранней стадии дифференцировки в ядрах не выявлялись индивидуальные политенные хромосомы. По мере увеличения размеров ядер апикального яруса, уже на средней стадии дифференцировки, наблюдались политенные хромосомы.

Во всех ядрах антиподальных клеток на стадии дифференцировки мы обнаружили структуры, связанные с различными участками хромосом, и с помощью регрессивного

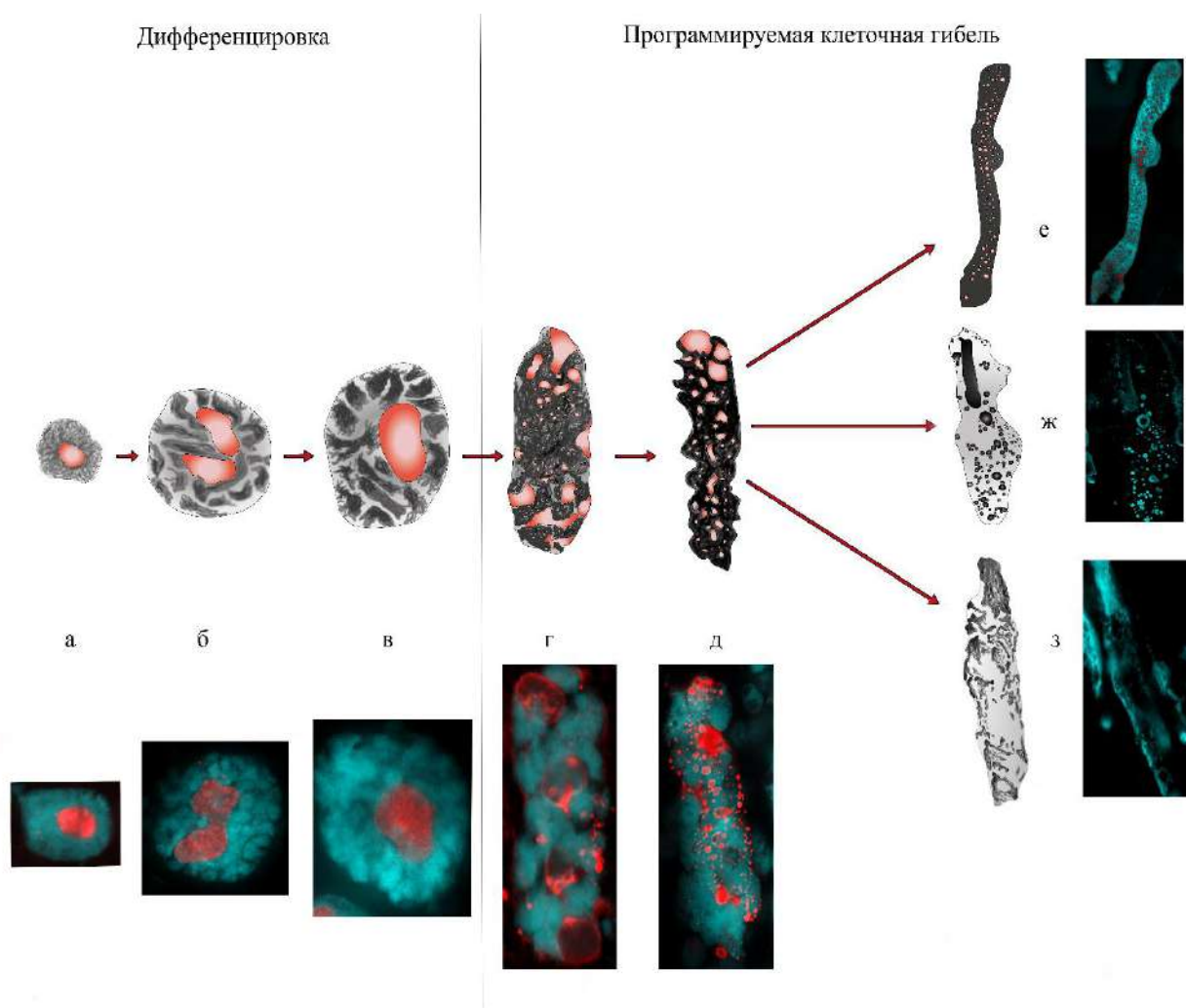


Рис. 122. Схема структуры ядер антиподальных клеток на стадиях дифференцировки и гибели. а, б, в – ранняя, средняя, поздняя стадии дифференцировки, ядра клеток с политенными хромосомами и дефинитивными ядрышками; г, д ранняя и средняя стадия гибели, ядра с объединенными хромосомами и сегрегированными ядрышками, е, ж, з – поздняя стадия гибели.

контрастирования РНК по методу Бернарда выявили в них и на поверхности хромосом РНП.

На стадии поздней дифференцировки и гибели, ядра вытягивались и имели до 30 мкм в ширину и до 80-100 мкм в длину, а тела политенных хромосом уплотнились и объединялись. Как на этапах дифференцировки, так и гибели вблизи политенных хромосом выявлялись многочисленные транскрипты, а у многих клеток на стадии гибели наблюдалась экструзия гранулярного компонента ядрышка через разрывы ядерной оболочки. Мы предполагаем, что таким образом клетки обеспечиваются необходимыми мРНК и рибосомами для трансляции белков. На стадии гибели выявляется сегрегация компонентов ядрышка. Варианты преобразований ядер на стадии гибели представлены на схеме (рис. 122). В ходе гибели хроматин ядер становится более плотным, может происходить уплощение ядер до веретеновидной формы или фрагментация.

Полученные данные о строении ядер клеток антиподальных комплексов на стадиях дифференцировки и гибели были систематизированы на результирующей схеме (рис. 123) и в таблице 6. Эта схема является принципиально новой, так как на ней представлена

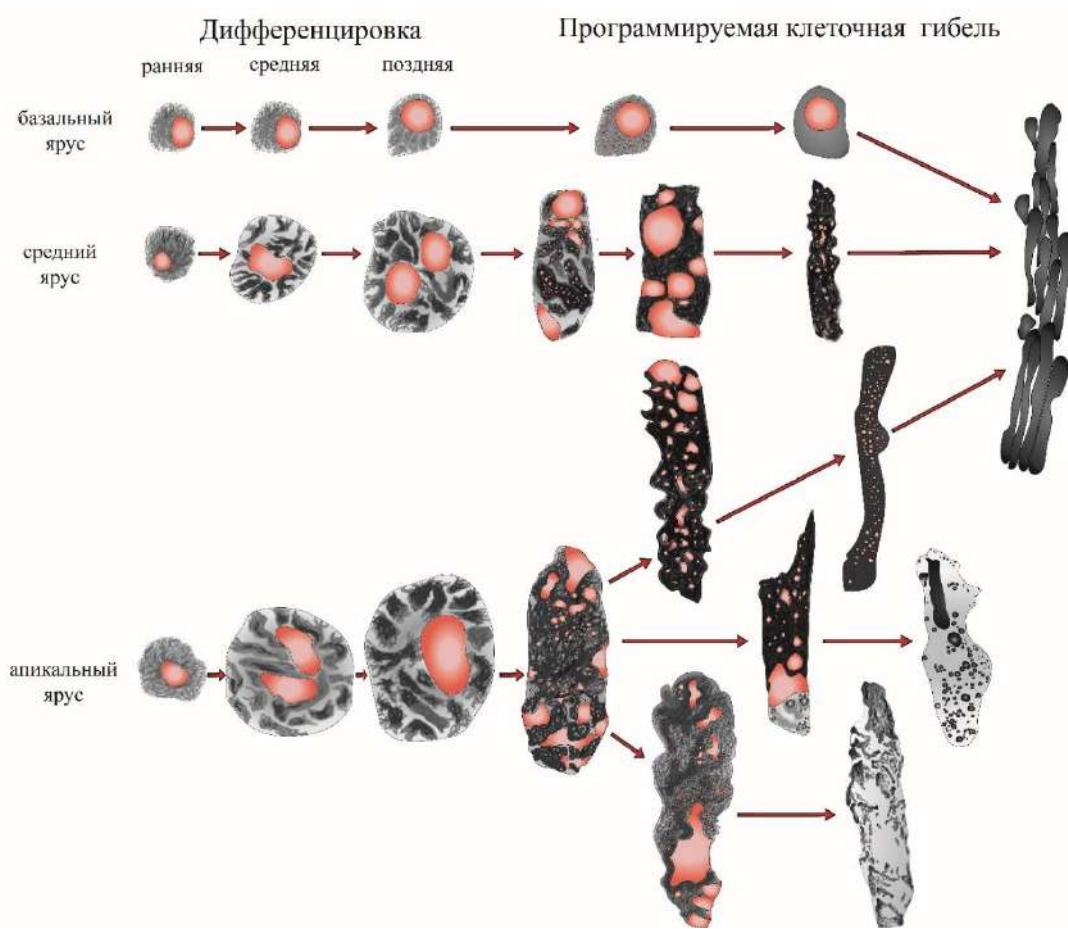


Рис. 123. Структура ядер базального, среднего и апикального ярусов антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки и гибели комплекса.

картина последовательных изменений морфологии ядер антиподальных клеток всех ярусов комплекса на стадиях дифференцировки и последующей гибели. Авторы более ранних работ ограничивались описанием структуры антиподальных клеток в один из моментов их онтогенеза (чаще всего антиподальных комплексов, находящихся на стадии дифференцировки).

Таблица 6. Особенности ядер антиподальных клеток оплодотворённых зародышевых мешков на стадиях дифференцировки и гибели.

Стадия развития	Ядро			
	Форма	Хромосомы	Ядрышко	Ядерная оболочка
Ранняя дифференцировка 1-3 сутки после опыления	круглая	недифференцированные	1-4	незначительные инвагинации
Средняя дифференцировка 3-4 сутки после опыления	овальная	отдельные хромосомы	1-2	глубокие инвагинации
Поздняя дифференцировка 4 сутки после опыления	вытянутая	отдельные хромосомы	1-2	глубокие инвагинации
Ранняя гибель 4-5 сутки после опыления	вытянутая	плотные хромосомы с лакунами	1-2, сегрегаты	глубокие протяженные инвагинации, разрывы, экструзии ядра и ядрышка
Поздняя гибель 6-10 сутки после опыления	вытянутая и уплощенная	сближенные, либо объединенные хромосомные территории, фрагментация ядра	1-2, расслоение и уплощение	глубокие протяженные инвагинации, разрывы, экструзии ядра и ядрышка

### 5.2.2. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков на стадии дифференцировки и клеточной гибели

Данные, полученные нами с помощью световой микроскопии, позволили составить схему преобразований ядер антиподальных клеток неоплодотворенных (рис. 124) зародышевых мешков в ходе стадии дифференцировки и гибели комплекса.

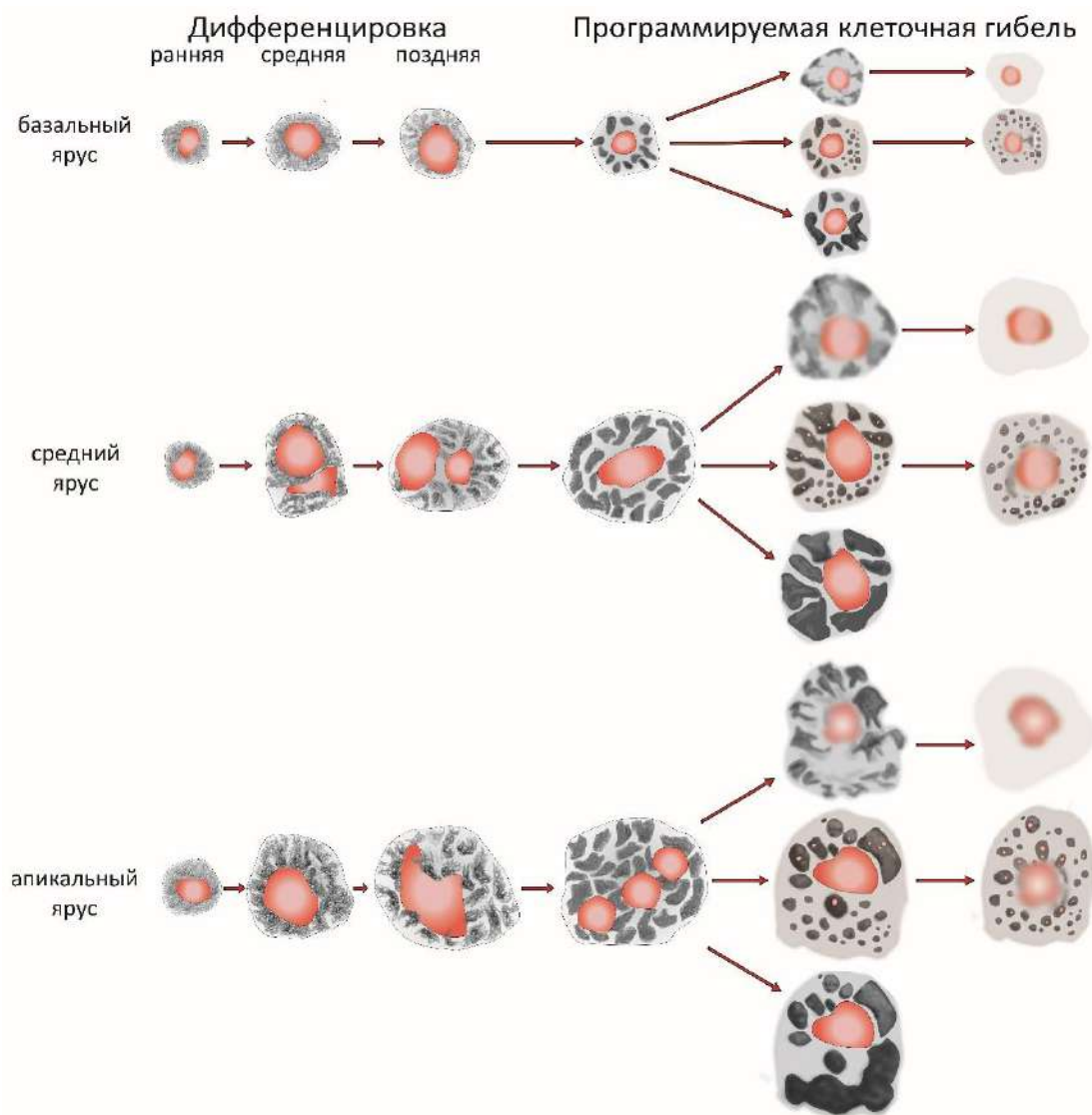


Рис. 124. Структура ядер антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки и гибели комплекса.

В течение всей стадии дифференцировки хроматиды в ядрах антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков более декомпактизованы, как в составе ядер фибриллярной структуры, так и в составе индивидуальных политенных хромосом, по сравнению с антиподальными клетками оплодотворенных зародышевых мешков. Таким образом, клетки этих антиподальных комплексов активно выполняют свою программу,

несмотря на отсутствие клеток эндосперма. Мы предполагаем, что они вступают на путь гибели, когда не поступает сигнальных факторов от эндосперма.

Интересно, что на стадии гибели этих клеток структура их ядер отличается от структуры ядер антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков – не наблюдалось объединение всех хромосомных территорий и сегрегации ядрышка. Однако на стадии гибели были выявлены разрывы ДНК, маркируемые методом TUNEL. При этом выявляются ядра с крупными фрагментами рыхлого хроматина разной величины, ядра с протяженными хромосомами и мелкими фрагментами хроматина на поверхности. В ряде ядер сохраняются ядрышки и мелкие фрагменты хроматина в ядре и в цитоплазме, что свидетельствует о принципиально другом пути гибели антиподальных клеток неоплодотворенных зародышевых мешков.

Данные о структуре антиподальных клеток неоплодотворённых зародышевых мешков пшеницы являются новыми, т.к. ранее изучались только клетки антиподальных комплексов оплодотворенных зародышевых мешков пшеницы. Общая структура отдельных антиподальных клеток комплекса неоплодотворённых зародышевых мешков была описана ранее лишь в работах Чабан (Чабан, 2008; Чабан и др., 2011), однако подробного изучения судьбы антиподальных клеток таких комплексов на различных этапах дифференцировки и клеточной гибели в этих работах не проводилось.

### 5.3. Структура политенных хромосом антиподальных клеток

На изображениях, полученных с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, в программе ImageJ проведены измерения сечений фибрилл в ядрах антиподальных клеток и ядрах эндосперма. Толщина наиболее часто встречающейся на срезах фибриллы составляла 0,2-0,3 мкм, а самой тонкой фибриллы, одной из двух в составе предыдущей 0,9-0,15 мкм.

FISH-гибридизация теломерных районов политенных хромосом антиподальных клеток зародышевых мешков позволила маркировать концы разобъённых хроматид в составе каждой политенной хромосомы, как облако точек.

В составе выделенных из ядер антиподальных клеток распластанных политенных хромосом мы выявили отдельные фибриллы, эти фибриллы, переплетаясь между собой образовывали крупные косы в составе плеч хромосом. Эти крупные косы, спирализуясь формировали плечо хромосомы.

Наличие фибрилл толщиной 0,2-0,3 мкм в ядрах клеток было показано для пшеницы (Блюденов, Конарев, 1978) и фибрилл толщиной 0,3 – 0,6 мкм, анастомозирующих друг с другом было показано для ячменя (Петрова и др., 1985).

#### **5.4. Содержание ДНК, площадь и округлость ядер антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки и гибели**

Беннет с соавторами измеряли количество ДНК в ядрах антиподальных клеток разных зародышевых мешков *Triticum aestivum* L., фиксированных через определенные временные отрезки после цветения, и выявили среди антиподальных ядер каждого комплекса ядра с низким и высоким содержанием ДНК (Bennett et al., 1973). В нашей работе мы впервые связали содержание ДНК ядер антиподальных клеток *Triticum aestivum* L. с их морфологией и топологией на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели, показав, что они отличаются по ploидности, площади, структуре ядер и расположению в антиподальном комплексе.

Несмотря на то, что в некоторых работах содержатся сведения о содержании ДНК антиподальных клеток (Bennett et al., 1973), нами впервые оценена динамика изменения содержания ДНК ядер клеток различных ярусов антиподальных комплексов на стадиях дифференцировки и гибели.

Данные о динамике изменения площади и формы ядер разных ярусов комплекса, оценке процентного содержания разных морфотипов ядер на разных стадиях развития являются принципиально новыми, т.к. подобные данные в литературе отсутствуют.



## 5.5. Структура органелл цитоплазмы антиподальных клеток на стадии дифференцировки и клеточной гибели

Все исследования, посвящённые изучению антиподальных клеток, свидетельствуют о большом количестве органелл в их цитоплазме, авторы отмечают наличие разветвленной сети эндоплазматического ретикулума, многочисленных митохондрий, пластид и диктиосом аппарата Гольджи (Dibol and Larson, 1966; You and Jensen, 1984; Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996; Maeda, Miyake, 1997). Однако в отличие от нашей работы, авторы не описывают динамику изменения структуры органелл в ходе дифференцировки.

Мы наблюдали изменения формы и размера митохондрий в цитоплазме антиподальных клеток пшеницы. На ранних стадиях дифференцировки выявлялись небольшие круглые (0,5 мкм в диаметре) с неупорядоченными пальцевидными кристами, на поздних стадиях дифференцировки чашевидные митохондрии (0,8 мкм). Пластиды на всех стадиях дифференцировки и гибели были с тёмным зернистым матриксом, округлые (0,5 мкм в диаметре), вытянутые (2 мкм в длину), часто с перетяжкой и чашевидные. В пластидах присутствовало небольшое количество крахмальных зерен и от 1 до 8 неупорядоченных ламелл.

Подобные описания морфологии митохондрий и пластид были приведены в литературе для антиподальных клеток пшеницы (You and Jensen, 1984) и других культурных злаков - *Zea mays* (Dibol and Larson, 1966), *Oryza sativa* (Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997), *Hordeum vulgare* (Engell, 1994). Авторы отмечали разнообразие формы пластид и митохондрий. Показано сходство форм пластид и митохондрий, в цитоплазме антиподальных клеток пшеницы (You, Jensen, 1984) и ячменя (Engell, 1994). В цитоплазме антиподальных клеток *Triticum aestivum* (You, Jensen, 1985), *Hordeum vulgare* (Engell, 1994), *Oryza sativa* (Maeda, Miyake, 1996; Maeda, Miyake, 1997) и *Zea mays* (Diboll, Larson, 1966) наблюдали полиморфизм формы митохондрий.

Пластиды синтезируют аминокислоты, жирные кислоты, нуклеотиды, митохондрии участвуют синтезируют АТФ, увеличение размера и изменение структуры этих органелл может свидетельствовать о возрастании их функциональной нагрузки в процессе дифференцировки комплекса.

Мы показали, что в течение дифференцировки и гибели антиподальных клеток пшеницы структура эндоплазматического ретикулума меняется – от сети протяженных плоских цистерн ЭПР и коротких трубочек на ранней стадии дифференцировки до концентрических кругов на средней и поздней стадии дифференцировки, на стадии гибели цистерны ЭПР расширяются. На стадиях ПКГ число рибосом, связанных с ретикулумом, по нашим визуальным оценкам, уменьшалось.

В литературе было отмечено, что цистерны ЭПР варьировали по длине и по форме, однако изменение структуры было связано не с этапами дифференцировки, а с фактом оплодотворения. Короткие параллельные цистерны ЭПР выявлялись до оплодотворения у *Oryza sativa* (Maeda and Miyake, 1996, Maeda and Miyake, 1997) и *Hordeum vulgare* (Engell, 1994), а концентрические круги выявлялись после оплодотворения. У *Zea mays* были описаны только короткие и протяженные цистерны ЭПР. В антиподальных клетках пшеницы на стадии зрелого мегагаметофита выявлялись как параллельные цистерны, так и концентрические круги, охватывавшие участки цитоплазмы с органеллами (You and Jensen, 1984).

Мы наблюдали изменения структуры диктиосом цитоплазмы антиподальных клеток пшеницы. На ранних стадиях дифференцировки комплекса мы наблюдали диктиосомы, состоящие из 5-8 параллельных цистерн с большими (100×250-300 нм) ампулами с прозрачным содержимым на периферии каждой цистерны. На стадиях гибели стопки цистерн диктиосом имели с-образную форму или форму кольца, ампулы на краях цистерн были маленькие с темным содержимым, вблизи аппарата Гольджи выявлялись многочисленные везикулы. Возможно, это связано с изменением секрета, секретлируемого аппаратом Гольджи на разных стадиях дифференцировки.

Многочисленные диктиосомы аппарата Гольджи выявлялись также у *Zea mays* (Dibol and Larson, 1966), *Oryza sativa* (Maeda and Miyake, 1996) и *Hordeum vulgare* (Engell, 1994). Присутствие расширенных ампул цистерн и многочисленных везикул около аппарата Гольджи было отмечено для *Hordeum vulgare* после оплодотворения (Engell, 1994).

С помощью трехмерной реконструкции изображений клеток после иммуноцитохимического окрашивания, мы впервые выявили локализацию гранулярного ретикулума и диктиосом, участвующих в секреторной активности клеток. На этапе дифференцировки они равномерно располагаются по объему цитоплазмы, вблизи плазматической мембраны и в инвагинациях ядерной оболочки. Такое распределение органелл характерно для всех ярусов антиподального комплекса. На стадии клеточной гибели число этих органелл снижается.

Нами была впервые описана система микротрубочек и актиновых филаментов на стадиях дифференцировки и гибели клеток антиподального комплекса пшеницы. Сначала в цитоплазме выявлялась тонкая сеть пучков микротрубочек, с чередующимися участками пучков разной толщины, позднее эта сеть перестраивалась, формировались протяженные неоднородные плотные тяжи. Мы впервые наблюдали концентрические пучки актиновых филаментов вокруг ядер клеток и параллельные пучки на периферии клетки на стадии

дифференцировки. На стадиях ПКГ пучки микротрубочек располагаются в инвагинациях ядерной оболочки, затем пучки микротрубочек и актиновых филаментов утончались, их сеть прореживалась.

В цитоплазме также наблюдали масляные тельца различного размера, окруженные мембраной и липидные капли в цитоплазме антиподальных клеток пшеницы, диаметром 0,2-0,4 мкм, часто вблизи митохондрий и ЭПР. На этапах ПКГ липидные капли выявлялись в ядре. Возможно, они попадали в ядро через разрывы ядерной оболочки, образование которых характерно для этой стадии гибели. В цитоплазме *Zea mays* (Dibol and Larson, 1966) и *Oryza sativa* (Maeda and Miyake, 1996) тоже выявляли липидные капли.

Как в наблюдаемых нами антиподальных клетках пшеницы, так и в антиподальных клетках *Zea mays*, *Oryza sativa* и *Hordeum vulgare* в цитоплазме присутствовали вакуоли от одной большой на клетку до нескольких маленьких (Dibol, 1968; Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996). Наличие вакуолей играло важную роль в отчетливой поляризации антиподальных клеток (Engell, 1994).

Мы наблюдали вакуоли на всех этапах дифференцировки и гибели комплекса антиподальных клеток пшеницы. По нашему мнению, на ранних стадиях дифференцировки клеток антиподального комплекса вакуоли выполняют осморегуляторную функцию, тогда как на стадиях поздней дифференцировки и гибели они играют роль депо веществ.

Клеточные стенки антиподальных клеток *Zea mays* и *Oryza sativa* со стороны нуцеллуса имели сосочки (Dibol and Larson, 1966; Maeda and Miyake, 1996). Неоднородность толщины клеточных стенок антиподальных клеток наблюдалась у *Hordeum vulgare*. Клеточные стенки, граничащие с нуцеллусом, были значительно толще клеточных стенок, граничащих с эндоспермом, и клеточных стенок между антиподальными клетками. В процессе целлюляризации эндосперма толщина клеточных стенок антиподальных клеток, граничащих с эндоспермом, увеличивалась. В клеточных стенках антиподальных клеток, граничащих с нуцеллусом, выявляли многочисленные плазмодесмы, в то время в клеточных стенках, граничащих с эндоспермом, и клеточных стенках между антиподальными клетками количество плазмодесм было небольшим (Engell, 1994).

Мы наблюдали похожую картину структуры клеточных стенок между клетками антиподальных комплексов пшеницы и нуцеллусом. В клеточных стенках между антиподами выявлялись неупорядоченно расположенные микрофибриллы целлюлозы, что может быть следствием неупорядоченного расположения тонкой сети микротрубочек под плазматической мембраной. На стадиях поздней дифференцировки и гибели вблизи плазматической мембраны мы наблюдали мультивезикулярные тельца, которые часто

выявлялись в ассоциации с клеточной стенкой или внутри её. Мы предполагаем, что при этом наблюдаем процесс экзоцитоза в апопласт антиподального комплекса.

Известно, что растения накапливают и хранят белки в специализированных вакуолях PSV-protein storage vacuoles - мультивезикулярных тельцах (МБТ), необходимых для развития и созревания семян. Эти запасующиеся белки мобилизуются позже, для обеспечения питательными веществами прорастающих семян. Показано, что во время прорастания семян бобов (*Vigna radiata*) белки рецептора вакуолярной сортировки (VSR vacuolar sorting receptor) и гидролитические ферменты синтезируются *de novo*. С помощью иммуноэлектронной микроскопии удалось идентифицировать цистеиновую протеазу - алеураин и показать, что VSR и алеураин колокализуются в МБТ в прорастающих семенах. Таким образом, МБТ в прорастающих семенах выполняют двойную функцию: в качестве хранилища для протеаз, которые физически отделены от PSV в зрелом семени, и в качестве промежуточного звена для VSR (рецептора)-опосредованной доставки протеаз из аппарата Гольджи в PSV для деградации белка во время прорастания семян (Wang et al., 2007). Так как клетки антиподального комплекса детерминированы мы предполагаем, что эти МБТ выполняют аналогичную функцию хранения белков и одновременно транспортируют вновь синтезированные протеазы в эндосперм, для последующей деградации этих белков во время прорастания семян.

Возможно, в МБТ содержатся фитаспазы, участвующие в клеточной гибели, поскольку во время, пока клеточная гибель еще не наступила они должны транспортироваться в апопласт (Фомичева, 2012).

Данные об органеллах цитоплазмы антиподальных клеток в течение дифференцировки и гибели систематизированы в таблице 7 и на схеме (рис. 125).

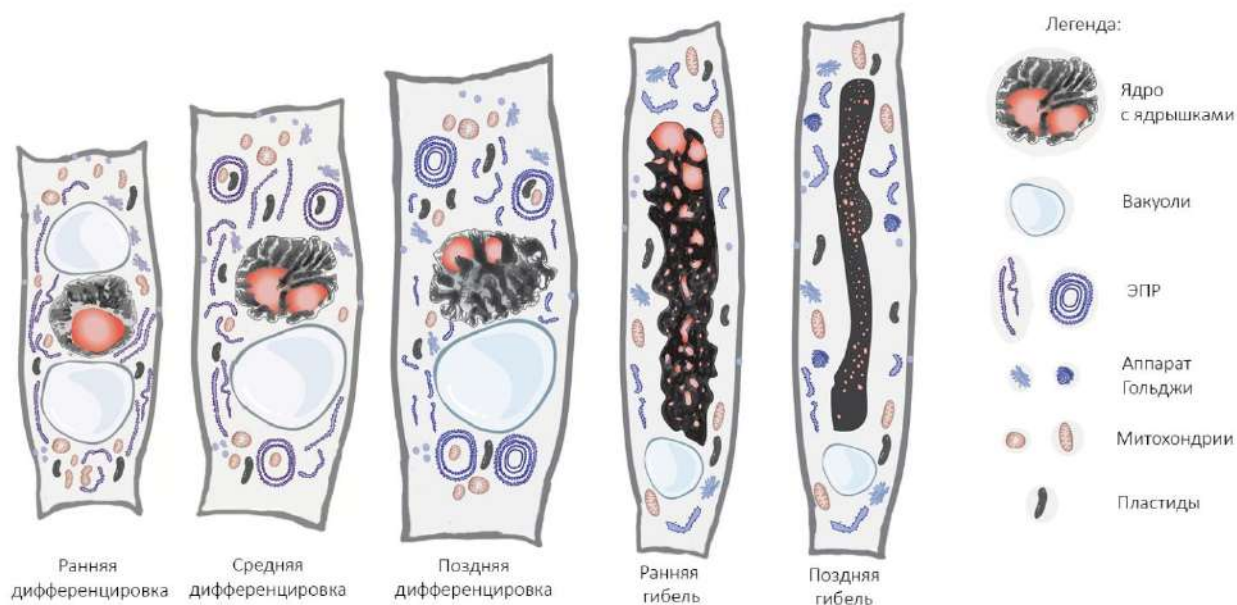


Рис. 125. Схема преобразований антиподальных клеток пшеницы на стадии дифференцировки и гибели

Таблица 7. Особенности цитоплазмы антиподальных клеток на стадиях дифференцировки и гибели.

Стадия развития	Цитоплазма					
	ЭПР	Аппарат Гольджи	Митохондрии	Пластиды	Цитоскелет	Вакуоли
Ранняя дифференцировка 1-3 сутки после опыления	узкие трубки и цистерны	5-7 цистерн с расширенными ампулами	округлые (d 0,5 мкм)	шаровидные, овальные, палочковидные, чашевидные	тонкая сеть	большие, с 2 сторон ядра
Средняя дифференцировка 3-4 сутки после опыления	протяженные цистерны, концентрические круги	5-7 цистерн с расширенными ампулами	овальные (0,5 – 0,8 мкм), чашевидные	палочковидные, чашевидные	тонкая сеть	большие
Поздняя дифференцировка 4 сутки после опыления	концентрические круги, коротки трубочки	5-7 цистерн с расширенными ампулами	овальные (0,5 – 0,8 мкм), чашевидные	палочковидные, чашевидные	тонкая сеть	большие
Ранняя гибель 4-5 сутки после опыления	расширенные цистерны	5-7 цистерн с маленькими ампулами	овальные (0,5 – 0,8 мкм), чашевидные	палочковидные	тяжи между инвагинациями ядра	большие
Поздняя гибель 6-7 сутки после опыления	расширенные цистерны	5-7 изогнутых цистерн, замкнутые в кольцо	овальные (0,5 – 0,8 мкм), чашевидные	палочковидные	редкие тяжи	большие

## 5.6. Гибель антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы

Гибель антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы является ярким примером dPCD, т.е. гибели клеток растений в ходе дифференцировки тканей и органов. На ранних стадиях развития зародышевого мешка клетки антиподального комплекса за счет крупных вакуолей выполняют осморегулирующую функцию, после двойного оплодотворения в ходе дифференцировки выполняют синтетическую и секреторную функции, обеспечивая развивающийся эндосперм защитными и питательными веществами. В ходе целлюляризации ценоцита эндосперма запускается программируемая клеточная гибель антиподальных клеток. Таким образом, судьба антиподальных клеток четко детерминирована и предопределена.

ПКГ - необходимый процесс при развитии любого семени растений, обеспечивающий питательными веществами заново образующиеся после двойного оплодотворения ткани. У всех культурных злаков на ранних стадиях развития семени необходимыми процессами для формирования нормального эндосперма (Чабан и др, 2011) являются: пролиферация инициальных антиподальных клеток, дифференцировка, в ходе которой формируются политенные хромосомы, и утилизация всех наработанных ими веществ в ходе деградации клеток антиподального комплекса. Эндосперм всех культурных злаков – важный пищевой продукт. Поэтому изучая особенности правильного формирования и последующих этапов ПКГ именно антиподального комплекса зародышевого мешка культурных злаков можно попытаться понять, как антиподальные клетки обеспечивают защиту и развитие ткани нуклеарного ценоцита эндосперма.

Ультраструктура ядер антиподальных клеток ячменя была описана в работе Петровой и др. в 1985г. Они обратили внимание на ячеистую структуру политенных хромосом и наличие между хроматидами «ядрышко-подобных» структур различной морфологии, но не связали появление этих структур с сегрегацией компонентов ядрышка (Петрова и др., 1985).

Мы подробно изучили морфологию ядер клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы в ходе ПКГ. На стадии дифференцировки комплекса гигантские политенные хромосомы антиподальных ядер состоят из отдельных хроматид, которые позднее переплетаются между собой и дополнительно спирализуются. В начале гибели комплекса хроматиды политенных хромосом сближаются, тела хромосом уплотняются в них формируются лакуны различной величины, где часто локализуются сегрегированные компоненты ядрышка. Явление сегрегации ядрышка клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы и наличие в сегрегированных

компонентах ядрышка аргентофильных белков ядрышка, фибрилларина и белка 53кДа было показано ранее в работе Лазаревой и Ченцова (Лазарева и Ченцов, 2004).

Мы выявили сегрегированные компоненты ядрышка, различающиеся по величине, форме и ультраструктуре между хроматидами политенных хромосом только в ядрах антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков пшеницы, находящихся на стадиях гибели антиподального комплекса. В составе этих многочисленных глобул, нами идентифицированы некоторые белки ядрышка. Мы обнаружили, после Ag-Nor окрашивания препаратов, что аргентофильные белки ядрышка равномерно распределены или формируют одну - две «шапочки» на поверхности сегрегированных глобул. Покрытые аргентофильными белками глобулы упорядочено располагаются в телах политенных хромосом ядер и одновременно выявляются в цитоплазме антиподальных клеток. После дифференциального окрашивания акридиновым оранжевым в антиподальных клетках РНК выявляется в виде мелких гранул в лакунах политенных хромосом в составе сегрегированных глобул.

Иммуноцитохимическая детекция фибрилларина в ядрах антиподальных клеток пшеницы на стадии гибели комплекса показала, что фибрилларин перераспределяется из ядрышка в лакуны реформированного хроматина. Интересно, что часть лакун остается свободными от фибрилларина. При этом в разных антиподальных клетках выявляются сегрегаты фибрилларина различающиеся по форме и размерам. Мы изучили ультраструктуру сегрегированных компонентов ядрышка и обнаружили, что некоторые из них - округлые однородные тельца, другие имеют неправильную форму и сложную структуру, когда к их центральной, менее плотной области примыкают один или два более плотных сегмента (темные «шапочки»), в некоторых ядрах сегрегаты мелкие и плотные, как бисер.

Ранее при изучении ультраструктуры гигантских хромосом антиподальных клеток ячменя (Петрова и др., 1985), были выявлены разнообразные «ядрышко-подобные» структуры. Описанные в работе мелкие «ядрышко-подобные» структуры, локализованные в области политенных хромосом ячменя, были похожи на сегрегированные компоненты ядрышек антиподальных клеток пшеницы. Однако, в отличие от структур, выявленных в антиподальных клетках ячменя, сегрегированные компоненты ядрышка антипод пшеницы никогда не содержали гранул на поверхности, и «шапочки» у сложно организованных агрегатов были электронноплотные. Авторы (Петрова и др., 1985) предположили, что многообразные «ядрышко-подобные тельца» в ядрах антипод ячменя являются амплифицированными ядрышками. На наш взгляд, имеет место не амплификация ядрышка, а происходит сегрегация-диссоциация материала ядрышка.

В статье (An and You, 2004) была проведена попытка описания и анализа структуры ядер антиподальных клеток пшеницы до, в момент и после двойного оплодотворения, окрашенных флуорохромом DAPI. Авторы утверждали, что дегенерация антипод начинается в момент, когда все ядра клеток антиподального комплекса имеют округлую форму и небольшие размеры, аргументируя это тем, что «периферия некоторых ядер становится волнистой». На наш взгляд это обусловлено наличием многочисленных инвагинаций ядерной оболочки. Такие инвагинации характерны для ядер антиподальных клеток пшеницы (You and Jensen, 1985; Лазарева, Ченцов, 2004; Чабан и др., 2011) и ячменя (Engell, 1994). Мы показали, что антиподальные клетки уже на ранней стадии дифференцировки имеют инвагинации поверхности ядер, что хорошо видно при изучении их ультраструктуры. Усиление яркости флуоресценции ядер авторы оценивали визуально, что, на наш взгляд, не является корректным. И наконец, когда авторы обнаруживали ядра с пустотами внутри, то объясняли этот феномен «исчезновением хроматина» гибнущих ядер. По нашему мнению, «пустоты» этих ядер – места, где располагаются гигантские ядрышки антиподальных клеток пшеницы. Мы считаем, что события, описанные авторами (An and You, 2004) не соответствуют этапам гибели антиподальных клеток, а являются стадией дифференцировки их ядер. Таким образом события, которые происходят непосредственно при гибели антиподальных клеток пшеницы в работе не рассматривались.

В работе Wei-cheng et al., 1988 авторы изучали структуру антиподальных клеток пшеницы в ходе деградации и их роль в формировании эндосперма. В своей работе они показали отсутствие отложения каллозы в клеточной стенке между антиподальными клетками и эндоспермом. На ультраструктурном уровне выявлены широкие каналы в клеточной стенке антиподальных клеток, граничащих с эндоспермом. Авторы показали, что гибнущие антиподальные клетки пшеницы отдают содержимое своей цитоплазмы (ЭПР, пластиды, митохондрии), и ядра (участки хромосом) для поддержания пролиферации и роста ценоцита эндосперма (Wei-cheng et al., 1988). Мы также наблюдали аналогичные картины между антиподальными клетками и эндоспермом.

В работе Чабан и соавторов описаны основные черты морфологии гибнущих антиподальных клеток комплексов оплодотворенных зародышевых мешков пшеницы–уплощение клеток, конденсация хроматина, распад ядрышек и экструзия его компонентов в цитоплазму самих антипод, и в эндосперм (Чабан, 2008; Чабан и др., 2011). Эти данные сопоставимы с полученными в нашей работе. Мы наблюдали многочисленные экструзии гранул ядрышка и частей хромосом в цитоплазму антипод через разрывы ядерной оболочки.



Яркими маркерами клеточной гибели у растений является фрагментация ДНК и выход цитохрома с из митохондрий, что и было впервые продемонстрировано нами для клеток антиподального комплекса пшеницы.

Есть данные о том, что в ходе клеточной гибели некоторых тканей семязачатка растений, например, при гибели клеток нуцеллуса (Domínguez and Sejudo, 2014) и эндосперма пшеницы (Chen et al., 2013) происходит фрагментация ДНК, выявляемая методом TUNEL. Ранее, разрывы ДНК ядер антиподальных клеток пшеницы, выявленные по методу TUNEL, были локализованы в хромосомах некоторых ядер антиподального комплекса и в области гигантских ядрышек (Чабан и др., 2011).

Мы выявили разрывы ДНК некоторых ядер клеток антиподальных комплексов на разных стадиях гибели. На ранних стадиях, когда в ядрах выявляются индивидуальные хромосомы, разрывы локализовались в определённых участках хромосом (часто, вблизи ядерной оболочки и около ядрышка), иногда с разной интенсивностью в отдельных хромосомах и по-разному в каждом ядре комплекса. На более поздних стадиях, в ядрах с объединенными хромосомами разрывы выявлялись во всем объеме ядра.

Нами показано, что при клеточной гибели комплекса антиподальных клеток наблюдается выход цитохрома с из митохондрий, что может свидетельствовать о возможной роли цитохрома с в процессе их клеточной гибели. Подобных исследований на антиподальных клетках растений ранее не проводилось. Имеются данные о том, что при некоторых вариантах клеточной гибели растений, например, гибели клеток тапетума мака (Yao et al., 2004), тапетума подсолнечника (Balk and Leaver, 2001), пыльцевых трубок мака (Thomas and Franklin-Tong, 2004), гибели культур клеток растений и при действии теплового шока, маннозы, менадиона, церамида и т.д. (Balk et al., 2003, Balk et al., 1999, Krause and Durner, 2004, Stein and Hansen, 1999, Sun et al., 1999, Vacca et al., 2006, Yao et al., 2004), дифференцировке сосудов ксилемы циннии (Yu et al., 2002) также наблюдается выход цитохрома с из митохондрий.

События, которые мы наблюдали в клетках антипод оплодотворенных зародышевых мешков пшеницы - выход цитохрома с из митохондрий, разрывы ДНК, выявляемые методом TUNEL, уплотнение хроматина и его фрагментация, роднят клеточную гибель антиподальных клеток с апоптоз-подобным типом клеточной гибели по классификации Reape and McCabe (Reape and McCabe, 2013), или с неаутолитической клеточной гибелью по классификации van Doorn (Van Doorn et al., 2011). Тем не менее, клеточная гибель антиподальных клеток пшеницы имеет свои характерные особенности: во-первых – сопровождается рядом сложных перестроек структуры ядер, во-вторых, сегрегацией компонентов ядрышка, и в-третьих, прямой экструзией гранулярного компонента ядрышка

и частей хромосом через разрывы ядерной оболочки в цитоплазму антиподальных клеток, а затем, в эндосперм. Возможно, эти особенности обусловлены тем, что гибнут и утилизируются ценоцитом эндосперма содержимое не простых диплоидных клеток материнских тканей семязачатка, а высокополиплоидных антиподальных клеток и вещества, транскрибируемые гигантскими политенными хромосомами.

Интересно, что комплекс антиподальных клеток в неоплодотворённых зародышевых мешках имеет свои характерные особенности. Хотя в неоплодотворенном зародышевом мешке не формируется эндосперм, во всех таких мешках присутствует полностью сформированный комплекс антипод, находящийся на различных стадиях дифференцировки и гибели. Политенные хромосомы в таких клетках более декомпактизованы и в клетках выявляются одно-два ядрышка. В цитоплазме локализуются огромные вакуоли и мелкие вакуоли вблизи ядра. На стадиях своей гибели в ядрах таких антиподальных клеток выявляются разрывы ДНК в области отдельных хромосом или в частях нескольких хромосом около ядрышка. Позднее в ядрах не происходит объединения хромосом, а наблюдается разрезание хромосом на крупные и мелкие фрагменты. При этом сегрегации компонентов ядрышка и выхода цитохрома с из митохондрий не происходит. На основании этих наблюдений можно предположить, что гибель этих антиподальных клеток в отсутствие индуктора гибели – эндосперма идёт по другому пути, отличающемуся от гибели антиподальных клеток оплодотворённых зародышевых мешков. Так как наблюдается кариорексис в ядрах антиподальных клеток и фрагменты хроматина оказываются в цитоплазме можно предположить, что это скорее некротическая гибель по классификации Reape and McCabe (Reape and McCabe, 2013), или с неаутолитическая клеточная гибель по классификации van Doorn (Van Doorn et al., 2011).

## 5.7. Профиль экспрессии генов в антиподальных клетках зародышевого мешка пшеницы

Идентификация ключевых транскриптов и выяснение профилей экспрессии генов в антиподальных клетках очень важно для понимания функций антиподальных клеток. Данные о генах, которые могут экспрессироваться в антиподальных клетках пшеницы, в литературе отсутствуют, поэтому любой прогресс в этой области значителен. В качестве референсного гена был взят Ta54227. 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. Оказалось, что в антиподальных клетках пшеницы эти гены также активно экспрессируются. Была изучена экспрессия гена гидролазы (Glycosyl hydrolase family 17 protein) и гена, связанного с метаболизмом стероидов (Oxysterol-binding family protein), активно экспрессирующиеся в антиподальных клетках арабидопсиса. Поскольку растительные гормоны регулируют фактически все события в развитии растений, нами был выбран ген, связанный с метаболизмом этилена, экспрессировавшийся 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*. Оказалось, что эти гены также довольно активно экспрессируются в антиподальных клетках пшеницы.

В дальнейших исследованиях было бы интересно выявить более тканеспецифические гены и исследовать профили экспрессии генов в антиподальных клетках пшеницы в пределах полного транскриптома. Это – технически трудная задача, которая до сегодняшнего дня никем не решена, поскольку получение образцов антиподальных клеток в достаточном количестве и адекватной чистоты – нелегкая задача.

## **5.8. Функциональное значение антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы**

Антиподальные клетки выполняют роль барьерной и трофической ткани в зародышевом мешке, располагаясь между материнскими тканями и тканями, образованными в ходе двойного оплодотворения. Большинство исследователей (Cannon, 1900; Brenchley, 1909; Jensen, 1918; Brink and Copper, 1944; Hoshikawa, 1960; Dibol and Larson, 1966; Dibol, 1968; Kaltsikes, 1973; Bennett et al., 1973; Kaltsikes, 1975; Huber, 1984; You and Jensen, 1984; Wei-Cheng et al., 1988; Engell, 1994; Maeda and Miyake, 1996; Maeda and Miyake, 1997; Sabelli and Larkins, 2009; Чабан et al., 2011) высказывали предположение о секреторной и питающей функции антиподальных клеток женского гаметофита. В пользу этой версии свидетельствует наличие политенных хромосом в ядрах антиподальных клеток, крупные вакуолизированные ядрышки, многочисленные органеллы цитоплазмы и хорошо развитый синтетический аппарат – ЭПР и аппарат Гольджи. Предполагается, что накопленные питательные вещества могут передаваться развивающемуся нуклеарному эндосперму (Kaltsikes, 1973; Kaltsikes, 1975; Huber, 1984, Engell, 1994; Чабан и др., 2011), кроме того, антиподальные клетки могут выделять активные вещества (возможно, гормоны), необходимые для развития эндосперма (Engell, 1994; Чабан и др., 2011). Brink and Copper называют антиподальные клетки самой заметной и самой активной тканью в зародышевом мешке (Brink and Copper, 1944), а Engell метаболическим центром для поглощения и выработки питательных веществ (Engell, 1994). В работах Поддубной-Арнольди и Цингер показано, что антиподальные клетки дают более яркие гистохимические реакции на пероксидазу, цитохромооксидазу, SH-группы и белки, аскорбиновую кислоту, чем остальные клетки зародышевого мешка (Поддубная-Арнольди, 1976). В антиподальных клетках нами было показано увеличение экспрессии генов, связанных с метаболизмом, гормонами и антистрессорным действием по сравнению с другими клетками зародышевого мешка.

В недавних работах (Чабан, 2008; Чабан и др., 2011, Doronina и Lazareva, 2021) продемонстрировано явление экструзии участков хромосом и компонентов ядрышка в вакуоли прилегающего синцития эндосперма. При изучении ультраструктуры антиподальных клеток на стадиях программируемой гибели мы также обнаружили экструзию ядрышкового материала из ядра в цитоплазму. Переход компонентов цитоплазмы и органелл через широкие каналы клеточной стенки был продемонстрирован на этапе гибели антиподальных клеток пшеницы (Wei-Cheng et al., 1988). Такие явления мы также наблюдали у гибнущих антиподальных клеток пшеницы. Эти редкие типы секреции свидетельствует о большой роли продуктов, вырабатываемых антиподальными клетками.

для обеспечения нормального развития эндосперма. Возможно, они вырабатывают как питательные вещества, так и многочисленные антистрессорные факторы, обеспечивающие нормальное развитие эндосперма зерновки, который, в свою очередь, в дальнейшем обеспечит нормальное развитие зародыша.

После двойного оплодотворения развитие антиподальных клеток напрямую сопряжено с онтогенезом эндосперма. В ходе своей дифференцировки антиподальные клетки вырабатывают необходимые для правильного развития эндосперма продукты, и, когда их работа заканчивается, эндосперм становится индуктором их гибели (Чабан и др., 2011; Doronina и Lazareva, 2021). Тем интереснее изучить эти взаимоотношения при аномалиях развития семени. В ржано-пшеничных и ржано-ячменных гибридах объем комплексов антиподальных клеток меньше по сравнению с исходными видами. Было показано, что при уменьшении числа антиподальных клеток в комплексе, уменьшении размера антипод или понижении их функциональной активности эндосперм полностью не развивается и формируется так называемое «невыполненное зерно» (Brink and Cooper, 1944; Ригин и Орлова, 1977). Нарушение структуры зрелого зерна подтверждает важность и необходимость продуктов, вырабатываемых клетками антиподального комплекса для правильного развития эндосперма. Существует мнение, что спермии *Secale* при двойном оплодотворении и формировании гибридов каким-то образом влияют на возможность антиподальных клеток синтезировать вещества (Brink and Cooper, 1944). Было показано, что если у клеток антиподальных комплексов пшениц, тритикале, ржи, уменьшаются размеры ядер антиподальных клеток до оплодотворения, то нарушается формирование нормального зерна. Поэтому оценка объема антиподальных ядер была предложена в качестве маркера будущей урожайности данных растений. Это еще одно свидетельство важности именно антиподальных клеток культурных злаков (Бланковская, 1989).

Известно, что, когда антиподальные клетки находятся на стадии дифференцировки и активно функционируют, происходит гибель клеток нуцеллуса. В ряде работ предполагается, что антиподальные клетки могут участвовать как в секреции гидролитических ферментов, разрушающих клетки нуцеллуса, так и в избирательном поглощении и транспорте веществ из ткани нуцеллуса в эндосперм (Maeda and Miyake, 1996; Engell, 1994). Мы также наблюдали явления программируемой клеточной гибели клеток нуцеллуса во время стадий дифференцировки антиподального комплекса пшеницы. По морфологическим признакам клеточная гибель клеток нуцеллуса напоминает вакуолярную клеточную гибель. Участие антиподальных клеток в процессе клеточной гибели нуцеллуса кажется нам логичным.

В некоторых работах высказывалась идея о том, что антиподальные клетки питают зародыш, однако эта версия подвергалась критике, т.к. в период максимальной синтетической и секреторной активности антиподальных клеток в зародыше не происходит ни интенсивных делений, ни процессов дифференцировки, которые начинаются только после полной деградации клеток антиподального комплекса (Brink and Cooper, 1944).

Формирование комплексов высокополиплоидных антиподальных клеток с гигантскими неклассическими политенными хромосомами у зародышевых мешков всех культурных злаков является типичным примером функциональной соматической полиплоидизации геномов. Гигантские политенные хромосомы осуществляют транскрипцию мРНК, обеспечивающих правильное формирование и защиту эндосперма, в клетках которого накапливаются все вещества, необходимые для развития зародыша при прорастании семени.

Наши предположения о возможных функциях антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадии дифференцировки и гибели систематизированы на схемах (рис. 126, 127).

Мы предполагаем, что на ранней стадии дифференцировки антиподальные клетки выполняют осморегуляторную функцию за счет крупных вакуолей, в этот момент в клетках начинается процесс эндоредупликации. На стадии средней и поздней дифференцировки в антиподальных клетках активно идут процессы эндоредупликации ДНК и синтеза веществ. На основании полученных нами данных и данных литературы, мы предполагаем, что это питательные вещества, гормоны, витамины и антистрессорные факторы. Эти вещества обеспечивают нормальное развитие эндосперма на нуклеарной стадии. Целлюляризация эндосперма запускает программируемую клеточную гибель антиподальных клеток. Гибель клеток комплекса наступает неодновременно, и некоторые клетки еще продолжают активно функционировать. Одновременно гибнущие клетки передают в эндосперм фрагменты хроматина и ядрышка путем экструзии и органеллы цитоплазмы через широкие каналы между эндоспермом и антиподальными клетками. На финальных этапах гибели антиподальные клетки полностью резорбируются эндоспермом.

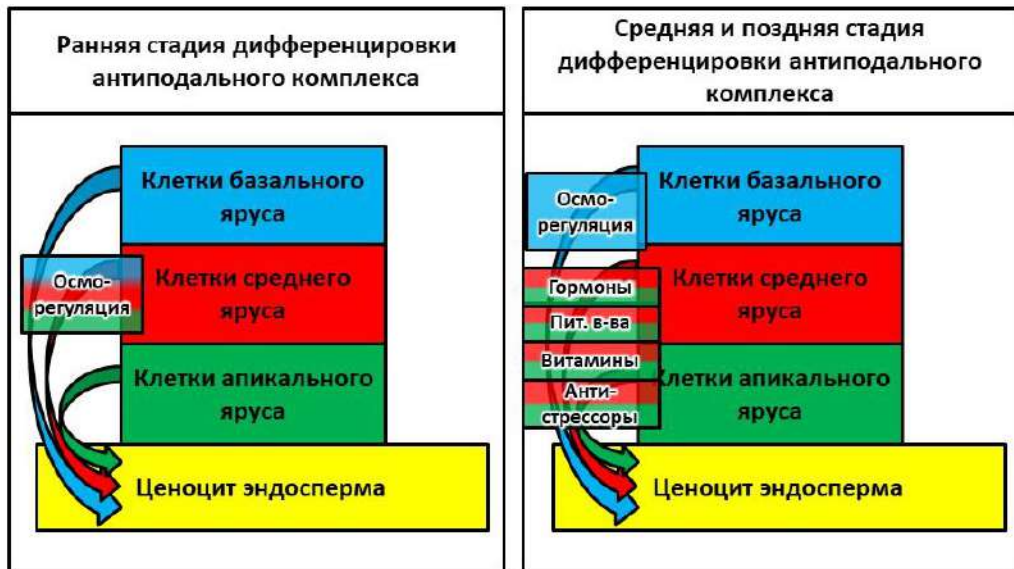


Рис. 126. Функции антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки комплекса.

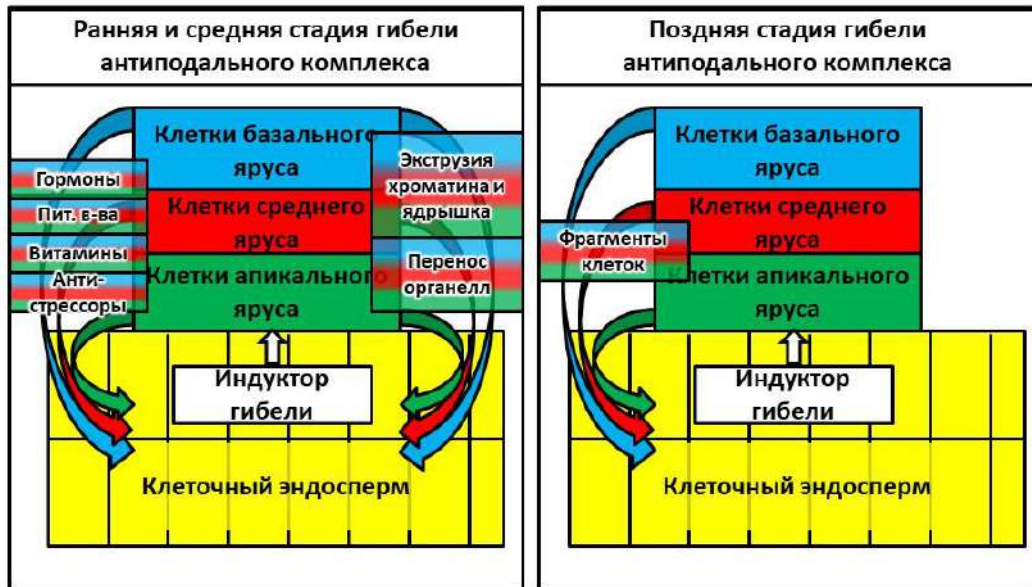


Рис. 127. Функции антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков в ходе программируемой клеточной гибели комплекса.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. 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 (целлюризация эндосперма) и без него.

Увеличение уровня экспрессии генов, обеспечивающих защитные и метаболические функции в клетках антиподальных комплексов, предполагает дальнейший поиск и выявление генов, уровень экспрессии которых обеспечивается формированием и функционированием политенных хромосом.



## 7. 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.

## 8. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

### 8.1. Статьи

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.*

### 8.2. Тезисы докладов

1. **Доронина Т. В.** Онтогенез клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2016. — Москва: Москва, 2016.
2. **Доронина Т. В.** Структурно-функциональные особенности клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы на этапе программируемой клеточной гибели // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2017. — Т. 2017 из ООО МАКС Пресс Москва. — Москва: Москва, 2017.
3. **Доронина Т. В.**, Чабан И. А., Лазарева Е. М. Структура ядер антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы в ходе их дифференцировки и ПКГ. Тезисы докладов конференции: Клеточная биология: Проблемы и перспективы // Клеточная биология: проблемы и перспективы (2-5 октября 2017). — клеточная биология. — Институт цитологии РАН Санкт-Петербург Санкт-Петербург, институт Цитологии РАН, 2017. — С. 57–58.
4. **Doronina T.** The antipodal cells in the embryo sac of wheat // 20th Symposium of Biology Students in Europe, Book of abstract. — Lund, Sweden, 2017.
5. **Doronina T. V.**, Lazareva E. M. Plant programmed cell death // 21th Symposium of Biology Students in Europe, Book of abstract. — Zagreb, Croatia, 2018.

6. **Doronina T. V.**, Chaban I. A., Lazareva E. M. Nuclei of wheat antipodal cells during programmed cell death // 21th Symposium of Biology Students in Europe, Book of abstract. — Zagreb, Croatia, 2018.
7. **Доронина Т. В.**, Чабан И. А., Лазарева Е. М. Структурные особенности антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы в ходе дифференцировки и гибели // Материалы XVIII Конференции-школы с международным участием Актуальные проблемы биологии развития. — Издательство Перо Москва, 2019. — С. 41–42.
8. **Doronina T. V.**, Chaban I. A., Lazareva E. M. Structural reorganization of nuclei of wheat antipodal cells during programmed cell death // 22th Symposium of Biology Students in Europe, Abstract booklet. — Glasgow, Great Britain, 2019. — P. 61.
9. **Doronina T. V.**, Chaban I. A., Lazareva E. M. Structural reorganization of nuclei of wheat antipodal cells during programmed cell death // Biopolymers and Cells. — Vol. 35. — Ukraine: Ukraine, 2019. — P. 206–207.
10. **Doronina T.** Life and death of antipodal cells of wheat embryo sac // МАТЕРИАЛЫ II Межфакультетская студенческая научно-практическая конференция Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future МГУ, 22-23 января 2019 г. — Москва, МГУ, 2019. — P. 51–52.
11. **Doronina T. V.**, Lazareva E. M. Evolution and diversity of programmed cell death // 22th Symposium of Biology Students in Europe, Abstract booklet. — Glasgow, Great Britain, 2019. — P. 29.
12. **Doronina T.** Plant programmed cell death // МАТЕРИАЛЫ III Межфакультетская студенческая научно-практическая конференция Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future 22-23 января 2020 г., Москва, МГУ. — Москва, МГУ, 2020. — P. 29–30.
13. **Доронина Т. В.** Ядра антиподальных клеток пшеницы при программируемой клеточной гибели // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2021 / Под ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов, Е. И. Зимакова. — Москва: Москва, 2021.
14. **Doronina T. V.**, Lazareva E. M. Plant polytene chromosomes // Abstract book SymBioSE 2021 Portugal. — Portugal, 2021. — P. 50.
15. **Doronina T. V.**, Chaban I. A., Lazareva E. M. Antipodal cells of the embryo sac of wheat as a unique object to study plant polytene chromosomes // Abstract book SymBioSE 2021 Portugal. — Portugal, 2021.

16. **Doronina T.** Antipodal cells of the embryo sac of wheat as a unique object to study plant polytene chromosomes // International Conference on microbiology, cancer and cell science. — UAE, 2022.

## 9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьев Е.В., Барский В.Е. Ультраструктура политенных хромосом *Drosophila melanogaster*//Доклады академии наук СССР. – 1983. – Т. 273. – №. 4-6. – С. 985.
2. Батыгина Т.Б., 1987. Хлебное зерно Л.: Наука. Р. 103.
3. Бланковская Т.Ф. Способ определения жизнеспособности зародышевого мешка у хлебных злаков. – А.с. СССР № 1273024 // Бюлл. Госкомизобретений. – 1986б. - № 44
4. Бланковська Т. П., Шестопап О. Л. Количество и размеры антипод шестирядного и двухрядного ячменя //Вісник Одеського національного університету. Біологія. – 2002. – Т. 7. – №. 1. – С. 249-253.
5. Блюденев М. А., Конарев В. Г. О тонкой структуре хромосом антиподальных клеток гексаплоидных пшениц//Цитология и генетика. – 1978. – Т. 12. – №. 3. – С. 200-206.
6. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – Наука, 1981.
7. Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. – Наука. Сиб. отделение, 1992.
8. Зыбина Е. В. Цитология трофобласта. – Наука, 1986.
9. Ивановская Е. В. Природа псевдофрагментации ядер с политенными хромосомами //Цитология и генетика. – 1970. – Т. 4. – №. 5. – С. 392-396.
10. Ивановская Е. В., Прокофьева З. Д. Политения в ядрах антипод пшеницы //ДАН СССР. – 1963. – Т. 152. – №. 2. – С. 446.
11. Ивановская Е.В., 1973. Функциональная морфология политенных хромосом антипод пшеницы // Цитология. Т. 15. С. 1445–1452.
12. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом. – М., Л.: Наука, 1972. – 211 с.
13. Кирикович С. С., Левитес Е. В. Роль политении и хромосомно-мембранных взаимодействий в генетических процессах у растений //Генетика. – 2013. – Т. 49. – №. 8. – С. 909-909.
14. Кордюм Е.Л., 2008. Двойное оплодотворение у цветковых растений: 1898 – 2008 // Цитология и генетика. Т. 3. С. 12–26.
15. Лазарева Е. М., Ченцов Ю. С. Особенности локализации фибрилларина, белка с мол. массой 53 кДа и Ag-Nor-белков в гигантских ядрах клеток антипод пшеницы //Цитология. – 2004. – Т. 46. – №. 2. – С. 125-135.

16. Морозова Е. М. Дополнительная ядерная ДНК в клетках зародышевых мешков *Haemanthis albiflos*, *Ornithogalum caudatum* //Известия РАН. Серия биологическая. – 2002. – №. 2. – С. 238-242.
17. Петрова Т. Ф. Метод приготовления тотальных эмбриологических препаратов эндосперма //Ботанический журнал. – 1970. – Т. 55. – С. 1662-1664.
18. Петрова Т. Ф. Политенные хромосомы пшеницы, ржи и тритикале //VII симпоз. по эмбриологии растений. Киев: Наукова думка. – 1978. – №. 3. – С. 68-70.
19. Петрова Т.Ф., Соловьянова О.Б., Ченцов Ю.С., 1985. Ультраструктура гигантских политенных хромосом в антиподах ячменя // Цитология. Т. 17. С. 499 –503.
20. Поддубная-Арнольди В.А., 1976. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы М.: Наука. С. 508.
21. Полуконова Н. В. Теоретические и прикладные аспекты исследования функциональной активности политенных хромосом под влиянием разных факторов //Бюллетень медицинских интернет-конференций. – Общество с ограниченной ответственностью «Наука и инновации», 2015. – Т. 5. – №. 6. – С. 929-939.
22. Пушкина, Н. П., Ананьев, Е. В., Барский, В. Е., Яковлева, Е. Ю. Светооптическое и электронно-микроскопическое исследование структуры и закономерностей формирования политенных хромосом в клетках антипод ячменя *Hordeum vulgare* //Цитология. – 1989. – Т. 31. – №. 9. – С. 1029.
23. Трочинська Т. Г., Бланковська Т. Ф. Морфологічні особливості клітин антиподального комплексу деяких форм злаків. //Вісник Одеського національного університету. Біологія. – 2006. – Т. 11. – №. 9. – С. 140-148.
24. Фомичева А.С., Тужиков А.И., Белошистов, Р. Е. Трусова С.В., Галуллина Р.А., Мочалова Л.В., Чичикова Н.В., Вартапетян А.Б., 2012. Программированная клеточная смерть у растений // Успехи биологической химии. Т. 52. С. 97–126.
25. Хрусталева Е. А., Ананьина Т. В., Стегний В. Н. Пространственная организация политенных хромосом в ядрах антипод *Hordeum vulgare* L //Цитология. – 2010. – Т. 52. – №. 8. – С. 688-689.
26. Чабан И. А., Лазарева, Е. М., Кононенко, Н. В., Поляков, В. Ю. Развитие антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы //Онтогенез. – 2011. – Т. 42. – №. 2. – С. 101-115.
27. Чабан И.А., 2008. Генезис антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы.
28. Шестопап О. Л., Бланковська Т. П. Сравнительный анализ показателей антиподального комплекса *Hordeum bulbosum* L. (2N= 28) и сортов двухрядного

- ячменя //Вісник Одеського національного університету. Біологія. – 2006. – Т. 11. – №. 6. – С. 186-192.
29. Шестопал, О. Л., Мехова, Е. І., Гочева, Е. А. Антиподальний комплекс дворядного ячменю за різних умов вирощування. //Вісник Одеського національного університету. Генетика і цитологія. – 2004. – Т. 9. – №. 1. – С. 152-158.
30. Эзау К., Анатомия семенных растений (в 2-х кн.). М.: Мир. С. 218.
31. Эмбриология цветковых растений, терминология и концепции / Под общ.ред Батыгиной Т.Б. 1994. СПб: Мир и семья. С. 508.
32. Ярыгин В. и др. Биология. – Общество с ограниченной ответственностью Издательство ЮРАЙТ, 2018.
33. Anderson A. M. Development of the female gametophyte and caryopsis of *Poa pratensis* and *Poa compressa* // Journal of Agricultural Research. – 1927. – V. 34. – P. 1001-1018.
34. Artschwager, E. Development of flower and seed of sugar cane. //Journal of Agricultural Research. – 1927. – V. 37. – P.1-30.
35. Beck P., Horton J. S. Microsporogenesis and embryogeny in certain species of *Bromus* //Botanical Gazette. – 1932. – Т. 93. – №. 1. – С. 42-54.
36. Bennett M. D. et al. Cell development in the anther, the ovule, and the young seed of *Triticum aestivum* L. var. Chinese Spring //Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences. – 1973. – Т. 266. – №. 875. – С. 39-81.
37. Bennett M. D., Smith J. B., Barclay I. Early seed development in the *Triticeae* //Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences. – 1975. – Т. 272. – №. 916. – С. 199-227.
38. Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., Gallois, P. What happened to plant caspases? //Journal of experimental botany. – 2008. – Т. 59. – №. 3. – С. 491-499.
39. Buono R. A., Hudecek R., Nowack M. K. Plant proteases during developmental programmed cell death //Journal of experimental botany. – 2019. – Т. 70. – №. 7. – С. 2097-2112.
40. Cannon W. A. A morphological study of the flower and embryo of the wild oat, *Avena fatua* L. – 1900.
41. Carniel K. Das Antherentapetum //Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1963. – Т. 110. – №. 2. – С. 145-176.
42. Carvalheira G. M. G. Plant polytene chromosomes //Genetics and Molecular Biology. – 2000. – Т. 23. – №. 4. – С. 1043-1050.
43. Carvalheira G., Guerra M. The polytene chromosomes of anther tapetum of some *Phaseolus* species //Cytologia. – 1994. – Т. 59. – №. 2. – С. 211-217.

44. Cass D. D., Jensen W. A. Fertilization in barley //American Journal of Botany. – 1970. – T. 57. – №. 1. – C. 62-70.
45. Chettoor A. M., Evans M. Correlation between a loss of auxin signaling and a loss of proliferation in maize antipodal cells //Frontiers in plant science. – 2015. – V. 6. – P. 187.
46. Chichkova, N. V., Tuzhikov, A. I., Taliansky, M., Vartapetian, A. B. Plant phytaspases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity //Physiologia Plantarum. – 2012. – T. 145. – №. 1. – C. 77-84.
47. Coulon, J. De. *Nardus stricta*. Etude Physiologique, atomique et embryologique. //Mémoires de la Société Vandoise des Sciences. – V. 1. – P. 245-332.
48. Cuadrado Á., Golczyk H., Jouve N. A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected //Chromosome Research. – 2009. – T. 17. – №. 6. – C. 755-762.
49. Cummins M. P. Development of the Integument and Germination of the Seed of *Eleusine indica* //Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1929. – P. 155-162.
50. Czapska-Dziewanowska D. Badania nad rozmnażaniem i różnicowaniem endospermy *Plantago atrata* var. *carpatica* //Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 1965. – T. 8. – №. 2.
51. D'Amato F. Role of polyploidy in reproductive organs and tissues //Embryology of angiosperms. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. – C. 519-566.
52. Daneva, A., Gao, Z., Van Durme, M., Nowack, M. K. Functions and regulation of programmed cell death in plant development //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2016. – T. 32. – №. 1. – C. 441-468.
53. Davies D. R., Cullis C. A. A simple plant polytene chromosome system, and its use for in situ hybridisation //Plant Molecular Biology. – 1982. – T. 1. – №. 4. – C. 301-304.
54. Davies, D. R., Brewster, V. 1975. Studies of seed development in *Pisum sativum*. II. Ribosomal RNA contents in reciprocal crosses. *Planta* (Ben.), 124, 303-309.
55. Diboll A. G. Fine structural development of the megagametophyte of *Zea mays* following fertilization //American Journal of Botany. – 1968. – V. 55. – №. 7. – P. 787-806.
56. Diboll A. G., Larson D. A. An electron microscopic study of the mature megagametophyte in *Zea mays* //American Journal of Botany. – 1966. – V. 53. – №. 4. – P. 391-402.
57. Domínguez F., Cejudo F. J. Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination //Frontiers in plant science. – 2014. – T. 5. – C. 366.
58. Dresselhaus T., 2006. Cell – cell communication during double fertilization // Current Opinion in Plant Biology. V. 9. P. 41–47.



59. Engell K. Embryology of barley. IV. Ultrastructure of the antipodal cells of *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi before and after fertilization of the egg cell //Sexual plant reproduction. – 1994. – V. 7. – №. 6. – P. 333-346.
60. Escamez, S., André, D., Zhang, B., Bollhöner, B., Pesquet, E., Tuominen, H. METACASPASE9 modulates autophagy to confine cell death to the target cells during *Arabidopsis* vascular xylem differentiation //Biology Open. – 2016. – T. 5. – №. 2. – C. 122-129.
61. Fischer, A. Zur Kenntniss der embryo-sac entwicklung einiger Angiospermen. Jenaische Zeitschrift Bd. – 1880. – V. 14. P. 90-132.
62. Fujita S., Takamoto K. Synthesis of messenger RNA on the polytene chromosomes of dipteran salivary gland //Nature. – 1963. – T. 200. – №. 4905. – C. 494-495.
63. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Baehrecke, E. H. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 //Cell death and differentiation. – 2015. – V. 22. – №. 1. – P. 58.
64. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Annicchiarico-Petruzzelli, M. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 //Cell Death & Differentiation. –2018. – P. 1.
65. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Gottlieb, E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 //Cell death and differentiation. – 2012. – T. 19. – №. 1. – P. 107.
66. Golinski, J, T. J. Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Andreciums and des Gynaeciums der Graser. Bot. Cent. –1893. – V. 55. P. 1-17, 65-72, 129-1 5.
67. Guignard P. M. L. Recherches sur le sac embryonnaire des phanerogames angiospermes // Annales des Sciences Naturelles, Botanique. – 1882. – V. 13. – P. 136-199.
68. Hakansson A., 1957. Notes on the giant chromosomes of *Allium nutans* // Botaniska Notiser. V. 110. P. 196–200.
69. Hamamura Y., Nagahara S., Higashiyama T., 2012. Double fertilization on the move // Current Opinion in Plant Biology. V. 15. P. 70–77.
70. Hasitschka G. Bildung von Chromosomenbündeln nach Art der Speicheldrüsenchromosomen, spiralisierte Ruhekernechromosomen und andere Struktureigentümlichkeiten in den endopolyploiden Riesenkernen der Antipoden von *Papaver rhoeas* //Chromosoma. – 1956. – T. 8. – №. 1. – C. 87-113.

71. Hasitschka-Jenschke G. Vergleichende karyologische untersuchungen an antipoden //Chromosoma. – 1959. – T. 10. – №. 1. – C. 229-267.
72. Hasitschka-Jenschke G., 1961. Das Langenverhältnis der eu\_ und heterochromatischen Abschnitte riesenchro mosomenartiger Bildungen vergleichen mit dem der Prophase Chromosomen bei *Bryonia dioica* // Chromosoma. V. 12. P. 466–483.
73. Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death //Frontiers in plant science. – 2015. – T. 6. – C. 234.
74. Heydlauff J., Groß-Hardt R. Love is a battlefield: programmed cell death during fertilization //Journal of experimental botany. – 2014. – T. 65. – №. 5. – C. 1323-1330.
75. Hill R. J., Mott M. R., Steffensen D. M. The preparation of polytene chromosomes for localization of nucleic acid sequences, proteins, and chromatin conformation //International review of cytology. – 1987. – T. 108. – C. 61-118.
76. Hofius, D., Li, L., Hafrén, A., Coll, N. S. Autophagy as an emerging arena for plant–pathogen interactions //Current opinion in plant biology. – 2017. – V. 38. – P.117-123.
77. Hofmeister W. Neuere Beobachtungen über Embryobildung der Phanerogamen //Jahrb Wiss Bot. – 1858. – V. 1. – P. 82-188.
78. Hofmeister, W. Die Entste cung des embryo der Phanerogamen. //Leipzig. – 1849.
79. Hofmeister, W. Neue Beitrage zur Kenntnis der Embryobildung der Phanerogamen. II. Monokotyledonen. //Abh. Kon. Sochs. Ges. Wiss. – 1861. – V. 7. – P. 629-760. Taf. 1-25.
80. Hoshikawa K. Anthesis, fertilization and development of caryopsis //Science of the Rice Plant., Morphology. – 1993. – T. 1. – C. 354-376.
81. Hoshikawa, Observations on the Embryo Sac Containing Double Egg Apparatus in *Triticum aestivum* L //nucleus. – 1960. – V. 10. – P. 180.
82. Howell W. M., Black D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organize rregions with a protective colloidal developer: a 1-step method //Experientia. – 1980. –T. 36. – №. 8. – C. 1014-1015.
83. Huber A.G., 1984. Endosperm Morphogenesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.). P. 185.
84. Huss H. A. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Antipoden. – Universität Zürich, 1906. – T. 7.
85. Ivanovskaya E. V. Ontogenetic polyploidy in the tissues of cereal grain //Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. – 1968. – T. 4. – C. 507-516.
86. Jamrich M., Greenleaf A. L., Bautz E. K. Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – T. 74. – №. 5. – C. 2079-2083.

87. Jensen, J. H. Studies on the morphology of wheat. //Wash. Agri. Exp. Sta. Bui. – 1918. – V. 150. P. 1-21
88. Joachimiak A. et al. Antipodals in *Phleum Boehmeri* Wib., development and structure //Acta Biol Cracov Ser Bot. – 1981. – T. 23. – C. 25-35.
89. Johri B. M., Ambegaokar K. B., Srivastava P. S. Comparative embryology of angiosperms vol. 1/2. – Springer Science & Business Media, 2013. – T. 1.
90. Jones T. J., Rost T. L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells //Botanical Gazette. – 1989. – T. 150. – №. 1. – C. 41-49.
91. Juliano J. B., Aldama M. J. Morphology of *Oryza sativa* //Linn. Philipp. Agric. – 1937. – T. 26.
92. Kacprzyk J., Daly C. T., McCabe P. F. The botanical dance of death: programmed cell death in plants //Advances in botanical research. – Academic Press, 2011. – T. 60. – C. 169-261.
93. Kazan K. The multitalented MEDIATOR25 //Frontiers in Plant Science. – 2017. – T. 8. – C. 999.
94. Khan, M. S., Akther, T., Ali, D. M., Hemalatha, S. An investigation on the role of salicylic acid alleviate the saline stress in rice crop (*Oryza sativa* (L)) //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – T. 18. – C. 101027.
95. Kiknadze I. I., Perov N. A., Chentsov Y. S. Electron microscopic studies on the polytene chromosomes of *Chironomus thummi* salivary glands //Chromosoma. – 1976. – T. 55. – №. 1. – C. 91-103.
96. Kim M., Delos Santos K., Moon N. S. Proper CycE–Cdk2 activity in endocycling tissues requires regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo by dE2F1b in *Drosophila* //Genetics. – 2021. – T. 217. – №. 1. – C. iyaa029.
97. Koernicke, M. Untersuchungen uber die Entstehung und Entwicklung der Sexualorgane von *Triticum*. //Verh. naturh. ver. preussichen Rheinlande. – 1896. – V. 53. – P. 149-185.
98. Kojima A., Nagato Y. Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum* //Sexual Plant Reproduction. – 1992. – T. 5. – №. 1. – C. 72-78.
99. Kolesnikova T. D., Goncharov F. P., Zhimulev I. F. Spatial-temporal organization of replication in polytene chromosomes of *Drosophila* //Хромосома 2018. – 2018. – C. 38-38.
100. Kono Y., Ohashi T. Histogenesis and polysaccharides at the early stages of development in rice kernels //Japanese Journal of Crop Science. – 1967. – T. 36. – №. 4. – C. 448-462.

101. Kosina, R., Krawczyk, J. (2016). Antipodal symmetry and asymmetry in the embryo sac of *Avena sativa* L. *Modern Phytomorphology*, 10, 13-15.
102. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, Zhivotovsky B., Blagosklonny M. V., Malorni W., Knight R. A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death //Cell death and differentiation. – 2005. – V.12. – №. 12. – P. 1463-1467. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 //Cell Death & Differentiation. – 2018. – T. 25. – №. 3. – C. 486-541.
103. Kumar G., Verma S. Presence of polytene nuclei with chromocenters unassociated with chromatin bundles in *Vigna unguiculata* //Chromosome Botany. – 2011. – T. 6. – №. 1. – C. 17-19.
104. Kuwada Y. A Cytological Study of *Oryza sativa* L With Plate VIII //Shokubutsugaku Zasshi. – 1910. – V. 24. – №. 287. – P. en267-en281.
105. Larkins B. A. et al. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication //Journal of Experimental Botany. – 2001. – T. 52. – №. 355. – C. 183-192.
106. Lilly M. A., Duronio R. J. New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle //Oncogene. – 2005. – T. 24. – №. 17. – C. 2765-2775.
107. Locascio A. et al. Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin //Frontiers in Plant Science. – 2014. – T. 5. – C. 412.
108. Lötscher P. K. Über den Bau und die Funktion der Antipoden in der Angiospermen-Samenanlage //Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung. – 1905. – V. 94. – P. 213-262.
109. Maeda E., Miyake H. Ultrastructure of antipodal cells of rice (*Oryza sativa*) after anthesis, as related to nutrient transport in embryo sac //Japanese Journal of Crop Science. – 1996. – V. 65. – №. 2. – P. 340-351.
110. Maeda E., Miyake H. Ultrastructure of antipodal cells of rice (*Oryza sativa*) before anthesis with special reference to concentric configuration of endoplasmic reticula //Japanese Journal of Crop Science. – 1997. – V. 66. – №. 3. – P. 488-496.
111. Maizel A. A view to a kill: markers for developmentally regulated cell death in plants //Plant Physiology. – 2015. – T. 169. – №. 4. – C. 2341-2341.
112. Makunin I. V. et al. The *Drosophila* suppressor of underreplication protein binds to late-replicating regions of polytene chromosomes //Genetics. – 2002. – T. 160. – №. 3. – C. 1023-1034.

113. Mammarella, N. D., Cheng, Z., Fu, Z. Q., Daudi, A., Bolwell, G. P., Dong, X., Ausubel, F. M. Apoplastic peroxidases are required for salicylic acid-mediated defense against *Pseudomonas syringae* //Phytochemistry. – 2015. – T. 112. – C. 110-121.
114. Marks G. E., Davies D. R. The cytology of cotyledon cells and the induction of giant polytene chromosomes in *Pisum sativum* //Protoplasma. – 1979. – T. 101. – №. 1. – C. 73-80.
115. Millerd A., Spencer D. Changes in RNA-synthesizing activity and template activity in nuclei from cotyledons of developing pea seeds //Functional Plant Biology. – 1974. – T. 1. – №. 3. – C. 331-341.
116. Minina, E. A., Filonova, L. H., Fukada, K., Savenkov, E. I., Gogvadze, V., Clapham, D., Sanchez-Vera V., Suarez M. F., Zhivotovsky B., Daniel G., Smertenko A., Bozhkov, P. V. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants //Journal of Cell Biology. – 2013. – T. 203. – №. 6. – C. 917-927.
117. Morozova E. M. Additional nuclear DNA in cells of embryo sacs of *Haemanthus albiflos* and *Ornithogalum caudatum* //Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences. – 2002. – T. 29. – №. 2. – C. 192-195.
118. Morrison J. W. Fertilization and postfertilization development in wheat //Canadian Journal of Botany. – 1955. – V. 33. – №. 2. – P. 168-176.
119. Mowery M. Development of the Pollen Grain and the Embryo Sac of *Agropyron repens* //Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1929. – V. 319-324.
120. Mu J, Chen L, Gu Y, Duan L, Han S, Li Y, Yan Y, Li X. Genome-wide identification of internal reference genes for normalization of gene expression values during endosperm development in wheat //Journal of Applied Genetics. – 2019. – T. 60. – №. 3. – C. 233-241
121. Nagl W. Differential DNA replication in plants: a critical review //Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. – 1979. – T. 95. – №. 4. – C. 283-314.
122. Nagl W. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies //Nature. – 1976. – T. 261. – №. 5561. – C. 614-615.
123. Nagl W. Polytene chromosomes of plants //International Review of Cytology. – 1981. – T. 73. – C. 21-53.
124. Nagl W. Replication: organization and replication of the eukaryotic chromosome //Progress in Botany/Fortschritte der Botanik. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1977. – C. 132-152.

125. Nagl W. Über Endopolyploidie, restitutionskernbildung und kernstrukturen im suspensor von angiospermen und einer gymnosperme //Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1962. – T. 109. – №. 4/5. – C. 431-494.
126. Nagl W., 1974. The *Phaseolus suspensor* and its polytene chromosomes // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. V. 73. P. 1–44
127. Nagl W., 1991. Two human DNA sequences (aromatase, telomere) detected in *Phaseolus* (Fabaceae) by respective blot and in situ hybridization // Polish Botanical Studies. V. 2. P. 159–164.
128. Nishikawa K. Giant chromosomes in antipodal cells of *Aegilops squarrosa* L //La Kromosomo. – 1954. – V. 20. – P. 724-727.
129. Nishimura M. Comparative morphology and development of *Poa pratensis*, *Phleum pratense* and *Setaria italica* //Jap. J. Bot. – 1922. – V. 1. – P. 55-85.
130. Odenbach W., 1965. Histologische und cytologische Untersuchungen der Entwicklungsvorgänge nach der Bestäubung von Gerste mit Roggen // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. V. 53. P. 1–52.
131. O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., Klee, H. J. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen //The Plant Journal. – 2001. – T. 25. – №. 3. – C. 315-323.
132. Olsen O. A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana* //The Plant Cell. – 2004. – T. 16. – №. suppl\_1. – C. S214-S227.
133. Olvera-Carrillo, Y., Van Bel, M., Van Hautegeem, T., Fendrych, M., Huysmans, M., Simaskova, M., van Durme M., Buscaill P., Rivas S., Coll N. S., Coppens F., Maere S., Nowack, M. K. A conserved core of programmed cell death indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants //Plant physiology. – 2015. – T. 169. – №. 4. – C. 2684-2699.
134. Osterwalder A. Beiträge zur Embryologie von *Aconitum napellus* L //Flora. – 1898. – T. 85. – №. 3. – C. 254-292.
135. Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death //Trends in plant science. – 2003. – T. 8. – №. 7. – C. 335-342.
136. Pagnussat, G. C., Alandete-Saez, M., Bowman, J. L., & Sundaresan, V. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte //Science. – 2009. – T. 324. – №. 5935. – C. 1684-1689.
137. Peng X., Sun M. X. The suspensor as a model system to study the mechanism of cell fate specification during early embryogenesis //Plant reproduction. – 2018. – T. 31. – №. 1. – C. 59-65.

138. Percival, J. The wheat plant. //London, Duckworth. 463 P. 1921.
139. Pritchard A. J., Hutton E. M. Anther and pollen development in male-sterile *Phaseolus atropurpureus* //Journal of Heredity. – 1972. – T. 63. – №. 5. – С. 280-282.
140. Radchuk V. V. et al. Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain //Plant physiology. – 2009. – T. 150. – №. 1. – С. 190-204.
141. Raghavan V. Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. – CUP Archive, 1986. – T. 17.
142. Reape T. J., McCabe P. F. Apoptotic-like programmed cell death in plants //New Phytologist. – 2008. – T. 180. – №. 1. – С. 13-26.
143. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy //The Journal of cell biology. – 1963. – T. 17. – №. 1. – С. 208.
144. Ronson C., Hynes M., Ramsay J., Sullivan//Brenner's Encyclopedia of Genetics. – Elsevier, 2013. – С. 598-600.
145. Sabelli P. A., Larkins B. A. The development of endosperm in grasses //Plant physiology. – 2009. – T. 149. – №. 1. – С. 14-26.
146. Scharpe A., Van Parijs. A study of the RNA associated with chromosomal proteins in chromatin from *Pisum sativum* L. embryos //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1974. – T. 353. – №. 1. – С. 45-62.
147. Schnarf K. Embryologie der angiospermen //Handbuch der Pflanzenanatomie II 2. – 1929.
148. Schnarf K. Kleine Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Angiospermen. VI. Über die Samenentwicklung einiger Gramineen //Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1926. – V. 75. – №. 4/6. – P. 105-113.
149. Schwartz M. B., Pankova T. E., Demakov S. A. ADF1 and BEAF-32 chromatin proteins affect nucleosome positioning and DNA decompaction in 61C7/C8 interband region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 2. – С. 154-159.
150. Semeshin V. F., Zhimulev I. F., Belyaeva E. S. Electron microscope autoradiographic study on transcriptional activity of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes //Chromosoma. – 1979. – T. 73. – №. 2. – С. 163-177.
151. Shadowski, A. E. Der Antipodals apparat bei Gramineen. //Flora – 1926. – V. 20 – № 4. P. 344-470.

152. Shang X. M., Wang W. C. DNA amplification, chromatin variations, and polytene chromosomes in differentiating cells of common bread wheat in vitro and roots of regenerated plants in vivo //Genome. – 1991. – T. 34. – №. 5. – C. 799-809.
153. Shimada, T., Takagi, J., Ichino, T., Shirakawa, M., Hara-Nishimura, I. Plant vacuoles //Annu Rev Plant Biol. – 2018. – T. 69. – №. 1. – C. 123-145.
154. Sidorenko, D. S., Sidorenko, I. A., Zykova, T. Y., Goncharov, F. P., Larsson, J., Zhimulev, I. F. Molecular and genetic organization of bands and interbands in the dot chromosome of *Drosophila melanogaster* //Chromosoma. – 2019. – T. 128. – №. 2. – C. 97-117.
155. Smith L. W., CHANG F. A. Y. A. N. Aminotriazole metabolism in *Cirsium arvense* L. scop. and *Pisum sativum* L. //Weed Research. – 1973. – T. 13. – №. 4. – C. 339-350.
156. Stephens, J. C. and Quinby, J. C. Anthesis, pollination and fertilization in *Sorghum*. //Journal of Agricultural Research. – 1934. – V. 49. – P. 123.
157. Stormo B. M., Fox D. T. Polyteny: still a giant player in chromosome research //Chromosome Research. – 2017. – T. 25. – №. 3. – C. 201-214.
158. Stover E. L. The Embryo Sac of *Eragrostis Cilianensis* (All.) Link: A New Type Embryo Sac and a Summary of Grass Embryo Sac Investigations. – 1937.
159. Sueldo D. J., van der Hoorn R. A. L. Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? //The FEBS Journal. – 2017. – T. 284. – №. 10. – C. 1577-1585.
160. Szabo, Q., Jost, D., Chang, J. M., Cattoni, D. I., Papadopoulos, G. L., Bonev, B., Cavalli, G. TADs are 3D structural units of higher-order chromosome organization in *Drosophila* //Science advances. – 2018. – T. 4. – №. 2. – C. eaar8082.
161. Tannert, P. Entwicklung und Bau der Blute and Brucht von *Avena sativa* L. //Zurich. – 1905.
162. Terada S. Embryological studies in *Oryza sativa* L //Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan. – 1928. – V. 19. – №. 4. – P. 245-260.
163. Therman E., Murashige T. Polytene chromosomes in cultured pea roots (*Pisum, Fabaceae*) //Plant systematics and evolution. – 1984. – T. 148. – №. 1. – C. 25-33.
164. Tschermak-Woess E., 1956. Notizen über die Riesenkerne und Riesenchromosomen in dem Antipoden von *Aconitum* // Chromosoma. V. 8. P. 114–134.
165. Tschermak-Woess E., Enzenberg-Kunz U., 1965. Die Struktur der hochendopolyploiden Kerne im Endosperm von *Zea mays*, das auffallende Verhalten im Nucleolen und ihr Endopolyploidiegrad // Planta. V. 64. P. 149–169.



166. Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E., Bozhkov, P. V. Metacaspases //Cell Death & Differentiation. – 2011. – T. 18. – №. 8. – C. 1279-1288.
167. Tuominen, H., Overmyer, K., Keinänen, M., Kollist, H., Kangasjärvi, J. Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis* //The Plant Journal. – 2004. – T. 39. – №. 1. – C. 59-69.
168. Turała K. Endopolyploidie im Endosperm von *Echinocystis lobata* //Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1966. – T. 113. – №. 2. – C. 235-244.
169. Turała-Szybowska K., Wędzony M. Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus subgenus* *Batrachium* //Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 1981. – T. 50. – №. 1-2. – C. 161-163.
170. Üstün S., Hafren A., Hofius D. Autophagy as a mediator of life and death in plants //Current opinion in plant biology. – 2017. – V. 40. – P. 122-130.
171. Valandro F. et al. Programmed cell death (PCD) control in plants: New insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome //Plant Science. – 2020. – T. 299. – C. 110603.
172. Van Doorn W. G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals //Journal of experimental botany. – 2011. – T. 62. – №. 14. – C. 4749-4761.
173. Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A. J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhitovskiy B., Bozhkov, P. Morphological classification of plant cell deaths //Cell Death & Differentiation. – 2011. – T. 18. – №. 8. – C. 1241-1246.
174. Vartapetian, A. B., Tuzhikov, A. I., Chichkova, N. V., Taliansky, M., Wolpert, T. J. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases //Cell Death & Differentiation. – 2011. – T. 18. – №. 8. – C. 1289-1297.
175. Vercammen, D., Van De Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Inzé D., Van Breusegem F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279. – №. 44. – C. 45329-45336.
176. Wang P., Mugume Y., Bassham D. C. New advances in autophagy in plants: regulation, selectivity and function //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2017.
177. Wang, J., Li, Y., Lo, S. W., Hillmer, S., Sun, S. S., Robinson, D. G., Jiang, L. Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies //Plant Physiology. – 2007. – T. 143. – №. 4. – C. 1628-1639.

178. Weatherwax P. Gametogenesis and fecundation in *Zea mays* as the basis of xenia and heredity in the endosperm //Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1919. – V. 46. – №. 3. – P. 73-90.
179. Weatherwax P. Persistence of the antipodal tissue in the development of the seed of maize //Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1926. – P. 381-384.
180. Wedzony M. Endopolyploidy and structure of nuclei in the antipodals and synergids of *Ranunculus baudotii* Godr //Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 1982. – T. 24.
181. Wegel, E., Pilling, E., Calder, G., Drea, S., Doonan, J., Dolan, L., Shaw, P. Three-dimensional modelling of wheat endosperm development //New Phytologist. – 2005. – T. 168. – №. 1. – C. 253-262.
182. Wei-cheng Z., Wen-mei Y., Cheng-hou L. The structural changes during the degeneration process of antipodal complex and its function to endosperm formation in wheat caryopsis //Journal of Integrative Plant Biology. – 1988. – V. 30. – №. 5.
183. Westermaier M. Zur Embryologie der Phanerogamen insbesondere uber die sogenannten Antipoden //Nova acta Leop. Carol Akad. Naturf. – T. 46. – C. 1-39.
184. Wu, J. J., Peng, X. B., Li, W. W., He, R., Xin, H. P., Sun, M. X. Mitochondrial GCD1 dysfunction reveals reciprocal cell-to-cell signaling during the maturation of *Arabidopsis* female gametes //Developmental cell. – 2012. – T. 23. – №. 5. – C. 1043-1058.
185. Yashimsky H., 1937. Zur Zytologie der Riesen-Antipodenkerne // Planta. V. 26. P. 608– 613.
186. You R., Jensen W. A. Ultrastructural observations of the mature megagametophyte and the fertilization in wheat (*Triticum aestivum*) //Canadian Journal of Botany. – 1985. – V. 63. – №. 2. – P. 163-178.7
187. Zamyatnin A. A. Plant proteases involved in regulated cell death //Biochemistry (Moscow). – 2015. – T. 80. – №. 13. – C. 1701-1715.
188. Zhimulëv I. F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation //Advances in genetics. – 1997. – T. 37. – C. 1-555.
189. Zhimulev I. F., Koryakov D. E. Polytene chromosomes //eLS. – 2009.
190. Zhuang, X., Chung, K. P., Cui, Y., Lin, W., Gao C., Kang, B. H., Jiang, L. ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114. – №. 3. – P.E426-E435.

## 10. БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю – кандидату биологических наук **Лазаревой Елене Михайловне**, которая на протяжении всего срока выполнения данной работы оказывала неоценимую помощь и обучала необходимым навыкам научной деятельности.

Также хочу выразить благодарность:

**Чабан Инне Анатольевне** – за долгое и плодотворное сотрудничество по исследованию онтогенеза антиподальных клеток,

**Игорю Игоревичу Кирееву** – за помощь в освоении статистических методов и методов обработки изображений и обсуждение результатов,

**Василию Васильевичу Ашапкину** – за помощь в проведении РТ-ПЦР,

**Евгению Валерьевичу Шевалю** – за сотрудничество в процессе написания обзорной статьи,

Моему рецензенту – **Галине Евгеньевне Онищенко**, за объективные и глубокие замечания по проделанной работе,

**Елене Александровне Смирновой** – за замечания по проделанной работе,

**Владимиру Николаевичу Игонину**, сотруднику ТСХА им. Тимирязева за предоставление растительного материала для исследования,

**Евгению Павловичу Казакову** - за долгое и плодотворное сотрудничество и обсуждение результатов,

**Моим коллегам** с кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Елене Николаевне Калистратовой** – за помощь в подготовке документации, необходимой для защиты диссертации.