

УДК 591:577

РАЗВИТИЕ АНТИПОДАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. И. А. Чабан, Е. М. Лазарева*, Н. В. Кононенко, В. Ю. Поляков*

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550 Москва,
ул. Тимирязевская, 42; факс(495)977-0947

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет 119992 Москва,
ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: lazareva-e@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.12.09 г.

Окончательный вариант получен 11.04.10 г.

В работе с помощью реконструкции серийных “полутонких” срезов детально прослежена динамика формирования антиподального комплекса пшеницы *Triticum aestivum* L. Полученные данные позволяют выделить три ключевых и строго последовательных этапа в развитии антиподального комплекса: этап пролиферации инициальных клеток, этап роста и функциональной дифференцировки антипод и этап их апоптотической гибели.

Впервые охарактеризованы особенности митотического деления антипод. Показано, что по структуре интерфазных ядер и митотических хромосом пролиферирующие антиподы не отличаются от клеток нуцеллуса, окружающих зародышевый мешок. Реконструкция строго ориентированных серийных срезов позволила установить, что антиподы делятся не синхронно. Методом цитофотометрического анализа определено содержание ДНК в дифференцированных клетках антиподального комплекса: в зрелом зародышевом мешке плоидность антипод варьирует от 8 до 32С. Установлено, что в антиподальном комплексе процессы пролиферации и эндоредупликации ДНК “разобщены” во времени: эндоредупликация ДНК в антиподах начинается только после окончания их пролиферации. Процесс эндоредупликации ДНК сопровождается тотальным ремоделированием хроматина, в результате в ядрах антипод формируются гигантские хромосомы. Конечным этапом развития антиподального комплекса является гибель клеток, связанная с включением программы апоптоза. Предложена модель структурной организации антиподального комплекса, основанная на принципе “ярусного” расположения клеток. Впервые обнаружена секреторная активность антипод, направленная в синцитий эндосперма. Анализ “усеченных” семяпочек с неразвившимся эндоспермом показал, что возможным индуктором, стимулирующим функциональную активность антипод и вызывающим включение их терминальной дифференцировки, является развивающийся эндосперм. Полученные данные обсуждаются в связи с гипотезой о функциональной роли антипод в развитии эндосперма и зародыша.

Ключевые слова: ранний эмбриогенез зародышевого мешка, антиподальный комплекс, растительные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из структурно-функциональных элементов сформированного женского гаметофита представителей семейства *Poaceae* является хорошо развитый и активно функционирующий антиподальный комплекс, располагающийся в халазальной части зародышевого мешка (Поддубная-Арнольди, 1976). Несмотря на длительную историю изучения, сведения о динамике формирования антиподального комплекса носят случайный и не систематический характер.

На основании ранних наблюдений сложилось мнение о том, что увеличение количества антипод происходит как до, так и после оплодотворения яйцеклетки и центральной клетки (Brink, Соорет,

1944; Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). В то же время показано, что характерной особенностью клеток антипод является особый тип дифференцировки, сопровождающийся эндоредупликацией генома и формированием в интерфазных ядрах гигантских (политенных) хромосом (Tscharmak-Woess, 1971; Ивановская, 1973; Zhimuev, 1996; Петрова и др., 1985; Лазарева, Ченцов, 2004; Чабан, 2008). Вместе эти данные указывают на возможную “сопряженность” в клетках высших растений процессов пролиферации, дифференцировки и эндоредупликации ДНК. Вопрос о том, когда заканчивается пролиферация антипод и начинается эндоредупликация их ядерной ДНК, и связаны ли эти процессы с оплодотворением яйцеклетки, до настоящего времени не решен. Отчасти, это объяс-

няется тем, что в литературе отсутствуют данные об особенностях митотического деления антиподальных клеток. Очевидно, что от количества делений инициальных клеток, от пространственной ориентации полюсов делений и от направленного роста клеток во многом зависит общая структура антиподального комплекса в развивающемся зародышевом мешке.

Другая мало изученная проблема – функциональная роль антиподального комплекса в раннем эмбриогенезе растений. Известно, что антиподы представляют собой транзиторную ткань, которая сохраняет жизнеспособность до тех пор, пока в цитоплазме эндосперма не начинается формирование клеток (Bhatnagar, Chandra, 1975; Engell, 1994; Diboll, 1966). На основании ряда косвенных данных высказываются предположения о том, что антиподальный комплекс является метаболическим центром абсорбции и преобразования питательных веществ, поступающих из тканей семяпочки, для последующего направленного транспорта в зародышевый мешок (Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). Возможно, так же, что в антиподах синтезируются ферменты, необходимые для лизиса примыкающих к антиподам клеток нуцеллуса (Engell, 1994).

Вместе, перечисленные данные показывают, что антиподальный комплекс злаков остается загадочной и мало изученной структурой зародышевого мешка.

Цель настоящей работы – подробное изучение этапов дифференцировки клеток антиподального комплекса пшеницы от начала их пролиферации до включения программы апоптотической гибели и получение данных о функциональном значении антиподального комплекса для эмбрионального развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовалась гексаплоидная пшеница *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) озимого сорта Московская 39.

Нормальные семязачатки на разных фазах развития и семязачатки, имеющие “усеченную” форму (рис. 12, а), извлекали из колоса и фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на 0.1 М ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) буфере Зоренсена, pH 7.3 с добавлением сахарозы (15 мг/мл). После фиксации из семязачатков изолировали семяпочки и выделяли зародышевые мешки, содержащие эндосперм, зародыш и антиподы (Петрова, 1970). Полученные образцы заключали в эпоксидную смолу (Эпон 812, Merck, Германия) по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы LKB–III (Швеция).

Для анализа структуры и пространственной ориентации клеток антиподального комплекса исполь-

зовали тотальные препараты зародышевых мешков и “полутонкие” (около 1–2 мкм) срезы семяпочек, ориентированные дорсовентрально и билатерально по отношению к бороздке семязачатка. Срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали 0.1% водным раствором метиленового синего (Merck, Германия) и заключали в Эпон 812 (Merck, Германия). Полученные препараты изучали в микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением, стандартным набором фильтров и объективом Neofluar $\times 100$. Изображения записывали с помощью камеры AxioCam HRm и обрабатывали в программе Adobe Photoshop 7.0.

Для цитофотометрического анализа семяпочки фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (в соотношении 3 : 1) в течение 3 часов. Целые семяпочки обрабатывали 5 N HCL в течение 40 минут при 22°C и окрашивали реактивом Шиффа (Merck, Германия). Затем на предметном стекле в капле 45% уксусной кислоты из семяпочек извлекали антиподальные клетки и готовили постоянные препараты. Содержание ДНК определяли в относительных единицах на цитофотометре SMP-20 (Opton, Германия) с объективом $\times 10$, окуляром $\times 10$ и зондом 0.63 мм. В качестве стандарта использовали ядра клеток нуцеллуса и эндосперма на стадии телофазы (2с и 3С соответственно) или метафазные пластинки делящихся клеток эндосперма (6С).

Для выявления антиподальных клеток, включивших программу апоптоза, тотальные препараты изолированных зародышевых мешков окрашивали по методу TUNEL (G3250; Promega, Madison, WI, США) (Otsuki et al., 2003). Фиксированные в 4% параформальдегиде (ISN, США) (при 4°C) зародышевые мешки, инкубировали с реагентом в течение 40 минут в темноте при комнатной температуре (22°C). Затем препараты отмывали от реагента и заключали в среду Vectashield (Vector laboratories, США), содержащую флуорохром DAPI и изучали в микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением, стандартным набором фильтров и объективом Neofluar $\times 100$. Изображения записывали камерой AxioCam HRm и обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Формирование антиподального комплекса в зародышевом мешке до оплодотворения семяпочки

1.1. Пролиферация антипод. Известно, что в ювенильной семяпочке пшеницы семиклеточный зародышевый мешок содержит три инициальные гаплоидные антиподальные клетки, которые располагаются полярно: одна клетка (базальная) примыкает к халазальной зоне нуцеллуса, а две другие занимают апикальное положение по отношению к базальной клетке (Батыгина, 1974). Анализ серий-

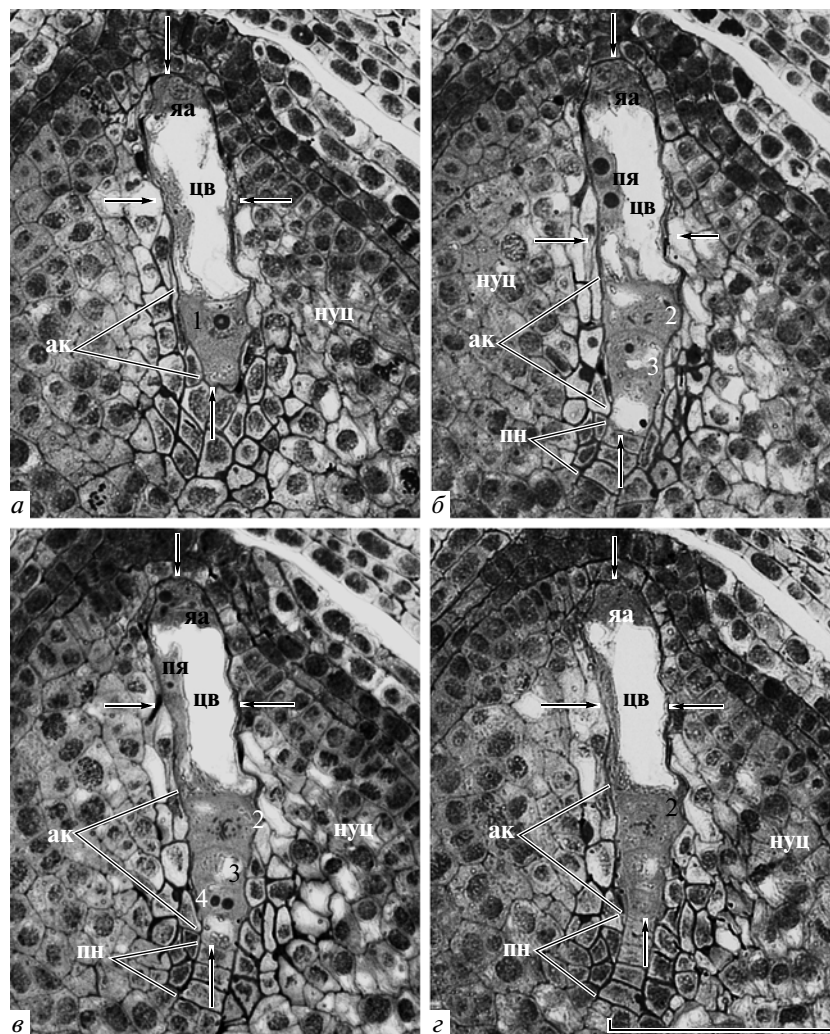


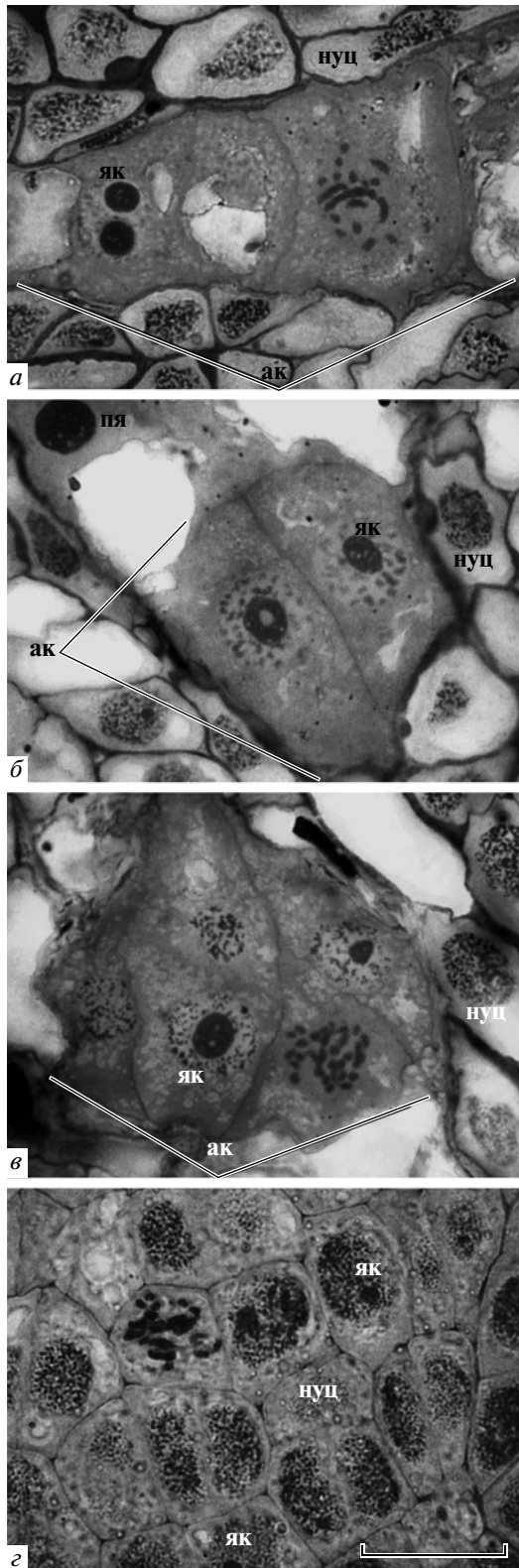
Рис. 1. Начальные этапы формирования антиподального комплекса зародышевого мешка (начало пролиферации до оплодотворения). Дорсовентральные сечения семязачатка.

a–г – серия срезов зародышевого мешка (стрелки) с антиподальными клетками, находящимися на различных стадиях клеточного цикла (антиподы обозначены цифрами 1, 2, 3, 4). Апикальная антипода 1 на стадии интерфазы (*a*); апикальная антипода 2 на стадии метафазы (*б, в, г*); антиподы 3 и 4 образовались в результате деления базальной инициальной клетки (*б, в*). Центральная вакуоль зародышевого мешка (цв), недифференцированный яйцевой аппарат (яа), полярные ядра зародышевого мешка (пя) и постамент, образованный клетками нуцеллуса (пн). Объектив Plan CN $\times 20/0.40$. Масштаб 100 мкм.

ных дорсовентральных срезов нескольких зародышевых мешков показал, что первой вступает в деление базальная клетка: на рис. 1 (*б, в*) видно, что базальная клетка антиподального комплекса завершила деление (стадия поздней телофазы, G1), в то время как одна из апикальных клеток находится на стадии метафазы, другая – в интерфазе. При этом ось деления базальной клетки ориентируется параллельно дорсовентральной плоскости зародышевого мешка. На всех последующих этапах развития антиподального комплекса делений базальной клетки не зарегистрировано, а митотические фигуры обнаруживаются только в апикальных клетках. При этом некоторые апикальные клетки могут делиться синхронно (рис. 2, *б*), однако, в целом, в ан-

типодальном комплексе преобладают асинхронные деления (рис. 2, *a, в*).

Общая структурная организация интерфазных ядер и митотических хромосом в клетках пролиферирующих антипод сходна с клетками нуцеллуса, окружающими зародышевый мешок. В обоих типах ткани интерфазные ядра содержат 1–2 ядрышка, хроматин представлен фибриллярными структурами – хромонемами (рис. 2, *г*). По характерной фибриллярной организации хроматина, интерфазные ядра антипод и нуцеллуса можно отнести к ядрам хромонемного типа (Kaufmann et al., 1960). Сравнительный анализ показал, что митотические хромосомы антипод по своей общей морфологии, размерам и плотности упаковки хроматина также не отличаются от хромосом клеток



нуцеллуса (рис. 2, а, в, г). Существенным отличием антипод являются большие размеры ядрышек, которые по объему в несколько раз превышают ядрышки клеток нуцеллуса (рис. 2, б, в).

Рис. 2. Асинхронность делений антиподальных клеток в начале пролиферации (до оплодотворения).

а — асинхронные деления антипод. Одна клетка на стадии метафазы, другая на стадии G1.

б — синхронные деления некоторых антипод (профаза) апикальной зоны комплекса.

в — асинхронные деления антипод в апикальной зоне комплекса на более поздней стадии пролиферации: 1 — интерфаза, 2, 3 — профаза, 4 — прометафаза.

г — интерфазные и делящиеся клетки нуцеллуса (нуц), окружающие зародышевый мешок. В ядрах клеток нуцеллуса ядрышки (як) существенно меньше (г), чем в ядрах антиподальных клеток (б). Митотические хромосомы нуцеллуса (г) по своей общей морфологии, размерам и плотности упаковки хроматина не отличаются от хромосом клеток антипод (а). Объектив UPlan FLN $\times 100/1.30$. Масштаб 20 мкм.

По мере пролиферации антипод антиподальный комплекс приобретает четко выраженную ярусную структуру (рис. 3). Реконструкция серийных срезов антиподального комплекса, ориентированных в поперечной и дорсовентральной плоскости семяпочки, позволила установить, что на заключительном этапе пролиферации базальный ярус, примыкающий к халазальной зоне нуцеллуса, содержит 1–2 клетки, средний около 8-ми. Ярус, граничащий непосредственно с центральной клеткой, содержит не менее 16 клеток (рис. 4, б). Таким образом, окончательное количество клеток в сформированном антиподальном комплексе зародышевого мешка пшеницы составляет 25–27. На этом этапе развития в клетках антиподального комплекса митозы не обнаруживаются, что свидетельствует о завершении пролиферативной активности антипод.

1.2. Дифференцировка антипод. Все последующие этапы развития антиподального комплекса в не оплодотворенной семяпочке связаны с дифференцировкой антипод, характерными признаками которой является прогрессивный рост клеток, сопровождающийся значительным увеличением размеров ядер.

В качестве отправной точки для анализа изменений, характеризующих этот процесс, была взята стадия зрелого зародышевого мешка, на которой происходит смещение его продольной оси, связанное с поворотом семяпочки на 90 градусов по направлению к микропиле (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). В результате, антиподальный комплекс располагается латерально по отношению к микропиллярной зоне (рис. 5, а). В таком зародышевом мешке антиподальный комплекс занимает примерно третью часть всего объема. На этом этапе крупные ядра антипод более чем в 2 раза превышают по диаметру диплоидные ядра клеток нуцеллуса (рис. 5, а). В их цитоплазме содержится несколько мелких вакуолей и одна большая вакуоль, как правило, обращенная в сторону центральной клетки (рис. 5, а).

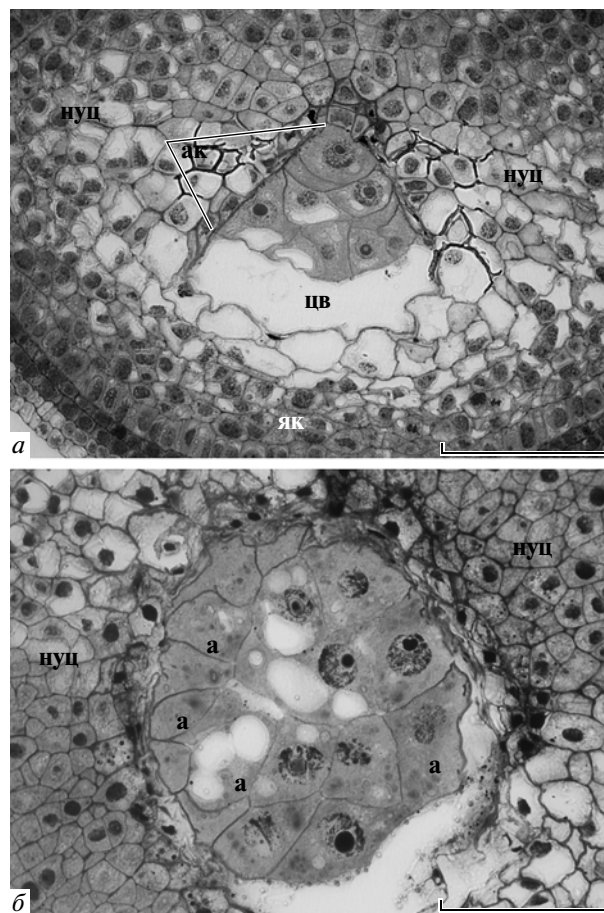
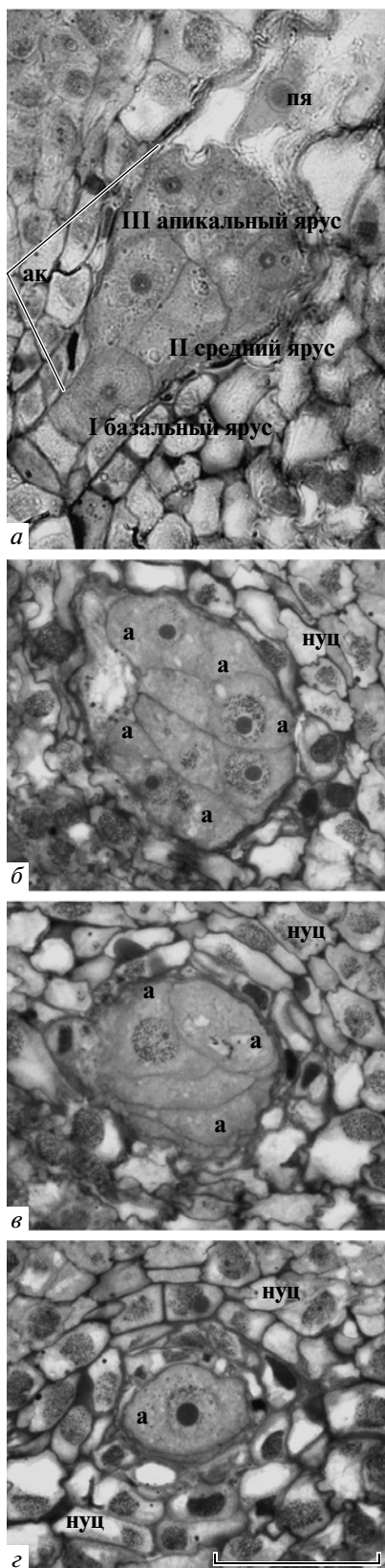


Рис. 4. Антиподальный комплекс зрелого, готового к оплодотворению зародышевого мешка (конец пролиферации, начало дифференцировки).

а – ярусное расположение клеток на продольном сечении антиподального комплекса.

б – поперечное сечение антиподального комплекса на уровне апикального яруса. На этом этапе апикальный ярус содержит не менее 16 клеток. Объектив Plan CN $\times 20/0.40$. Масштаб 100 мкм. Клетки нуцеллуса – нуц; антиподальный комплекс – ак; антипода – а; центральная вакуоль – цв.

Рис. 3. Ярусное расположение клеток в пролиферирующем антиподальном комплексе (до оплодотворения).

а – на дорсовентральном сечении зародышевого мешка в составе антиподального комплекса четко видны три яруса клеток: апикальный I, средний II и базальный III. Поперечные сечения антиподальных клеток апикального (*б*), среднего (*в*) и базального (*г*) ярусов комплекса. Антипода – а, клетки нуцеллуса – нуц, полярное ядро – пя. Объектив Plan CN $\times 40/0.65$. Масштаб 50 мкм.

Трехмерная реконструкция серий дорсовентральных и трансвентральных срезов семязпочки, позволила установить, что ярус, граничащий с центральной клеткой, содержит не менее 8 клеток, средний не менее 4-х, базальный ярус комплекса антипод, примыкающий к халазе, содержит 1 клетку.

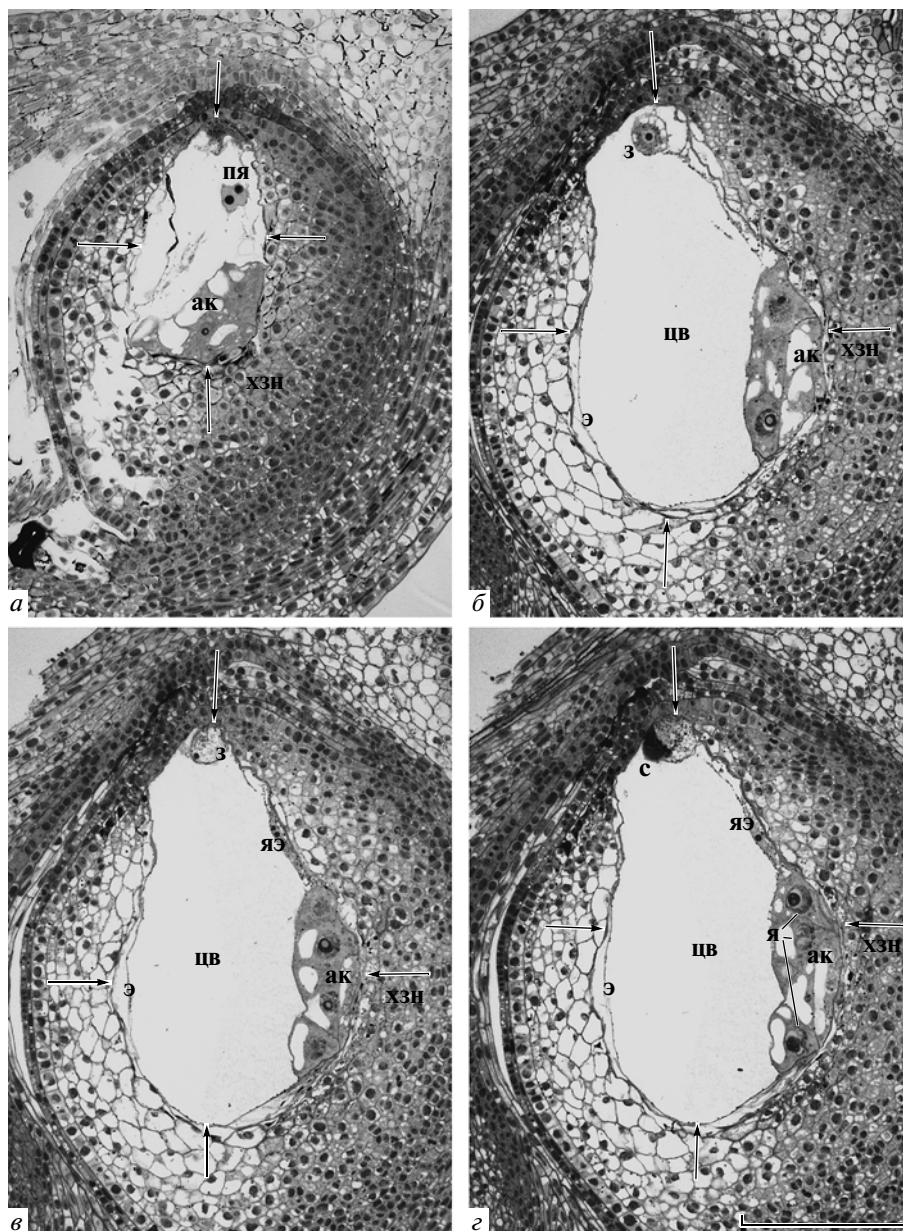


Рис. 5. Структура зародышевого мешка до и после оплодотворения. Дорсовентральные сечения семязпочек.
а – Положение антиподального комплекса в зрелом зародышевом мешке перед оплодотворением.
б–г – Положение антиподального комплекса в зародышевом мешке после оплодотворения. Антиподальный комплекс (**ак**) располагается латерально по отношению к продольной оси зародышевого мешка (стрелки) после завершения поворота семязпочки. Зигота – **з** (*а, в*); синергида – **с** (*б*); ядра эндосперма – **яэ** (*б, в, г*); эндосперм – **э**; халаза – **х**; ядра с гигантскими хромосомами – **я**; полярные ядра – **пя**; халазальная зона нуцеллуса – **хзн** (*а*). Объектив Plan CN $\times 20/0.40$. Масштаб 100 мкм.

Одной из возможных причин увеличения размеров цитоплазматического и ядерного компартов дифференцирующихся клеток антиподального комплекса, может быть возрастание их плоидности (Melaragno et al., 1993). Для проверки этого предположения с помощью метода цитофотометрии проведено измерение количества ДНК в ядрах индивидуальных антипод. Полученные данные показали, что в растущих антиподах количество ДНК примерно в 4 раза превышает гаплоидные значения

(табл. 1). Этот факт свидетельствует о том, что после окончания этапа пролиферации в ядрах антипод индуцируется процесс эндоредупликации ДНК. Этот процесс сопровождается ремоделированием структуры хроматина в клетках всех ярусов антиподального комплекса, что в конечном итоге приводит к формированию гигантских хромосом. Первые структуры, соответствующие обособленным хромосомам, появляются в интерфазных ядрах, когда количество ДНК возрастает до 4С.

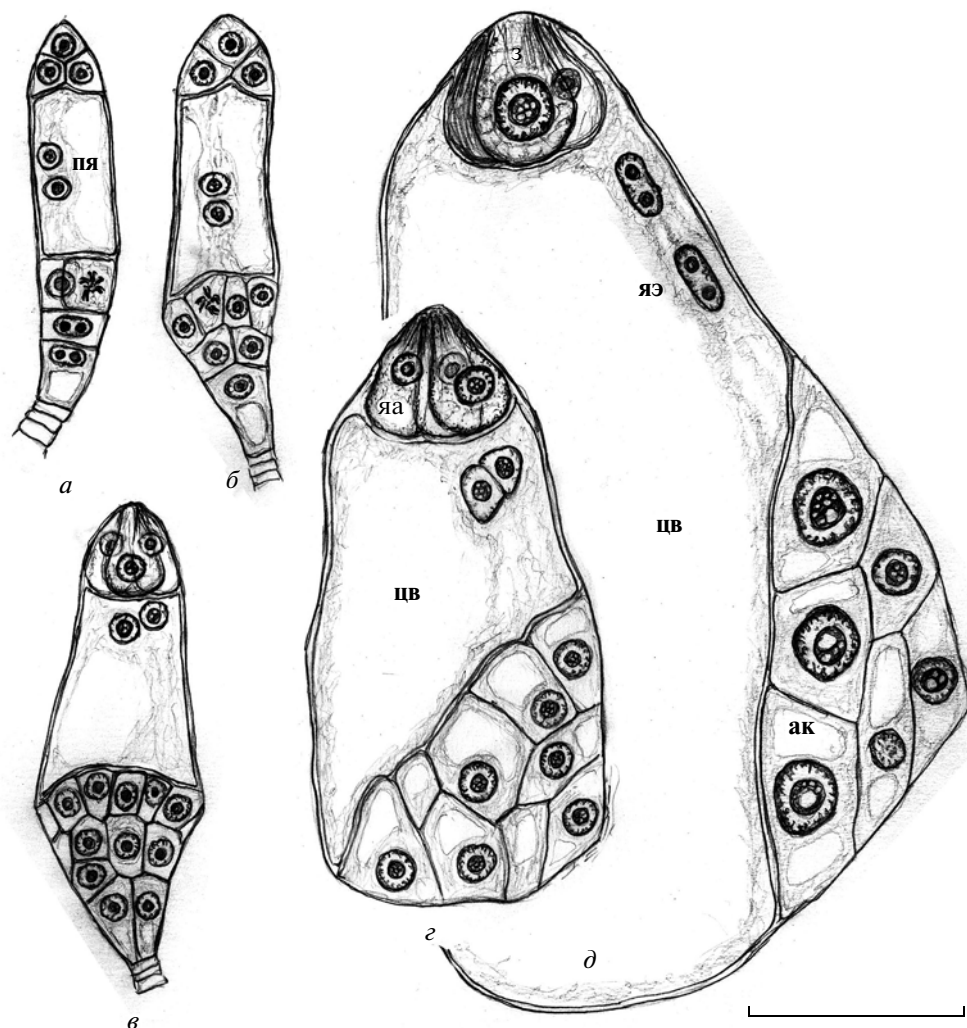


Рис. 6. Динамика развития антиподального комплекса (ак) от начала пролиферации антипод до оплодотворения зародышевого мешка и формирования зиготы. Схема основана на пространственной реконструкции серийных срезов семязачатков пшеницы.

a, б, в, г — зародышевые мешки до оплодотворения.

a — 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 — **яа**. Масштаб 100 мкм.

Обобщенная схема процесса формирования антиподального комплекса представлена на рисунке 6.

2. Развитие антиподального комплекса в зародышевом мешке после оплодотворения семязачатка

После оплодотворения яйцеклетки и центральной клетки зародышевого мешка антиподальный комплекс занимает свое окончательное положение,

латеральное по отношению к микропиллярной зоне и параллельно удлиняющейся халазе растущей семязачатка (рис. 5, б–г). В дальнейшем размеры антиподального комплекса увеличиваются за счет пропорционального роста объемов цитоплазмы и ядер антипод (рис. 7). Когда количество ДНК в ядрах антипод возрастает до 8С–16С, структуры, соответствующие обособленным гигантским хромосомам, значительно увеличиваются в размерах. В отличие от компактных метафазных хромосом, в которых на светооптическом уровне не удастся идентифициро-

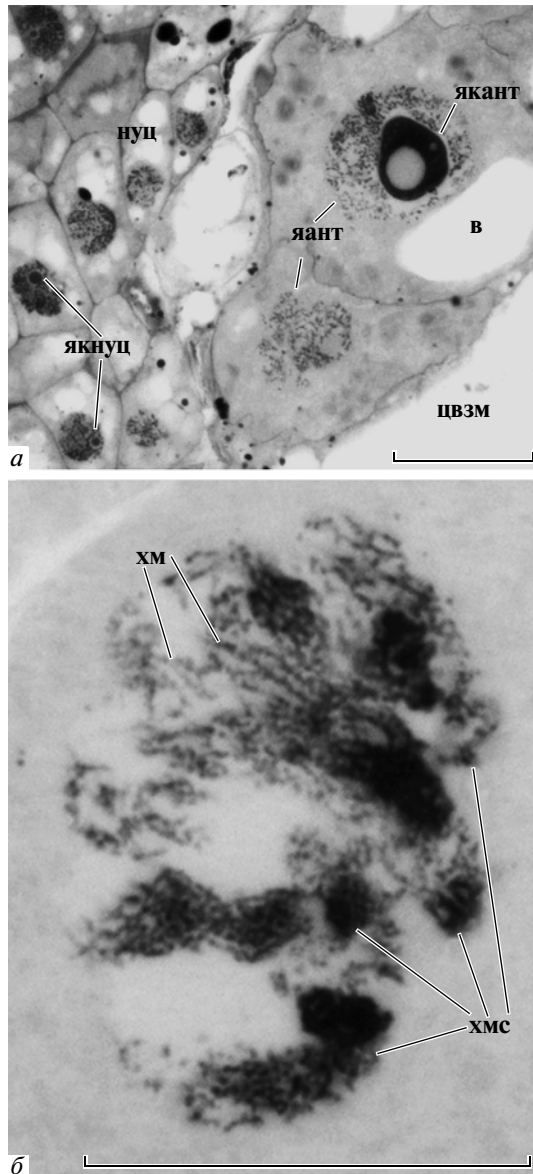


Рис. 7. Ядра антипод с гигантскими хромосомами.
а – на полутонком срезе семяпочки (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего) – фрагмент антиподального комплекса зародышевого мешка. Клетки нуцеллуса – нуц, ядрышки нуцеллуса – янкюц. Ядра (яант), ядрышко (яант) и вакуоли (в) антиподальных клеток. Центральная вакуоль зародышевого мешка – цвзм. Объектив Plan CN $\times 40/0.65$. Масштаб 50 мкм;
б – на срезе тотального препарата антиподального комплекса (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего). В составе гигантских хромосом выявляются “элементарные” фибриллярные структуры хроматина – хромонемы (хм, стрелки). Гигантские хромосомы – хмс (стрелки), янкюц – ядрышко и вакуоли (в) антиподальных клеток. Объектив UPlan FLN $\times 100/1.30$. Масштаб 20 мкм.

вать составляющие их структурные элементы, гигантские хромосомы упакованы менее компактно. На срезах антиподального комплекса (рис. 7) в составе гигантских хромосом четко выявляются протяженные фибриллярные структуры, соответств-

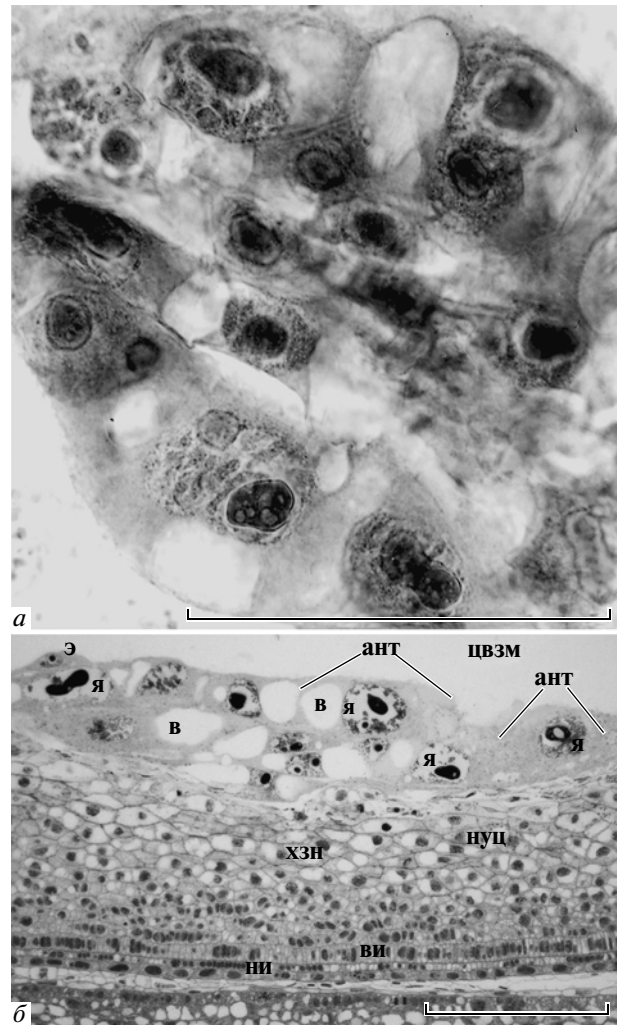


Рис. 8. Гетерогенность клеток в активно функционирующем антиподальном комплексе.

а – антиподальный комплекс на тотальном препарате зародышевого мешка (вид со стороны базального яруса). Объектив Plan CN $\times 40/0.65$. Масштаб 50 мкм.
б – антиподальный комплекс на дорсовентральном срединном срезе семяпочки. В апикальном ярусе, примыкающем к эндосперму, видны крупные клетки с гигантскими ядрами (я), клетки базального яруса, примыкающие к халазальной зоне нуцеллуса (хзн), содержат мелкие ядра. Клетки нуцеллуса – нуц, клетки наружного (ни) и внутреннего (ви) интегументов, антиподы – ант, вакуоли в цитоплазме антипод – в. Объектив Plan CN $\times 40/0.65$. Масштаб 50 мкм.

ующие хромонемам интерфазных ядер. На этой стадии развития сильно увеличиваются размеры ядрышек. В тоже время скорость роста индивидуальных клеток антиподального комплекса не одинакова, о чем свидетельствует сильно выраженная гетерогенность клеток и ядер по их размерам. Особенно четко эти различия выявляются на тотальных препаратах зародышевого мешка (рис. 8). Реконструкция серийных дорсовентральных и поперечных сечений семяпочки показывает, что наибольш-

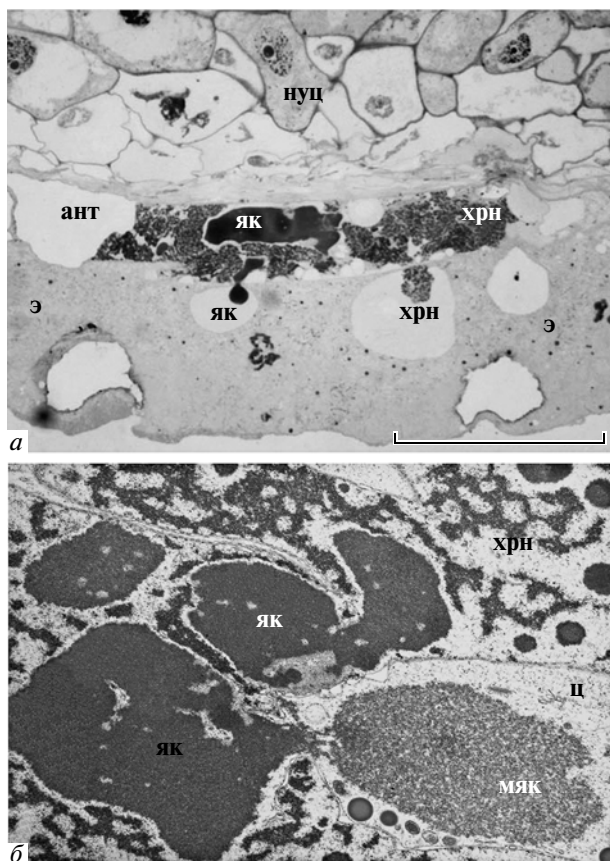


Рис. 9. Секреторная активность антипод.

а – экструзия участков хроматина (хрн) и материала ядрышка (як) из ядра антиподы (ант) в вакуоли нуклеарного эндосперма на дорсовентральном срезе семязачатка (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего). Клетки нуцеллуса – нуц. Объектив UPlan FLN $\times 100/1.30$. Масштаб 20 мкм.

б – выход части материала ядрышка (мяк) в цитоплазму (ц) антиподы, (электронная микрофотография фрагмента антиподальной клетки, $\times 5000$).

ших размеров достигают антиподы в апикальном ярусе, который контактирует с эндоспермом. Клетки базального и среднего ярусов отличаются более мелкими ядрами (рис. 8, *а*, *б*). Такое соотношение размеров ядер и клеток сохраняется на всем протяжении дальнейшего развития антиподального комплекса.

В зародышевых мешках с хорошо развитым эндоспермом наблюдается удлинение антипод параллельно бороздке. В таких вытянутых антиподах большую долю объема клетки занимают одна или две крупные вакуоли.

На этом этапе развития зародышевого мешка на ультраструктурном уровне выявляются случаи выхода части гранулярного компонента ядрышка в цитоплазму антиподы (рис. 9, *б*). В то же время можно наблюдать картины, свидетельствующие о секреторной функции антипод: крупные вакуоли

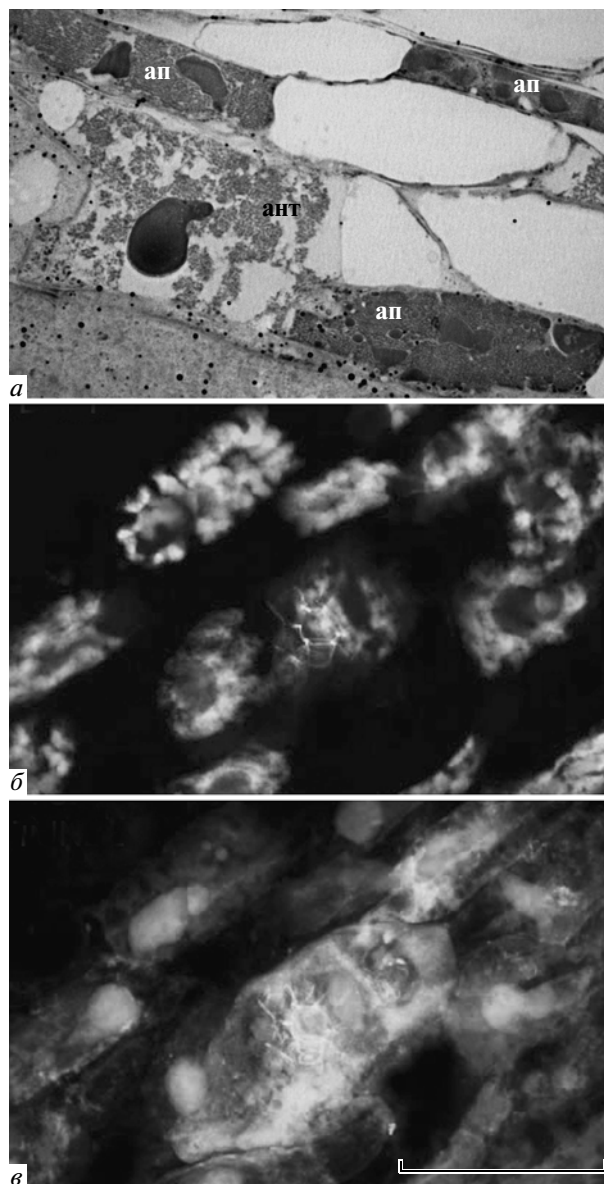


Рис. 10. Клетки антиподального комплекса на этапе апоптотической гибели.

а – клетки антиподального комплекса (срез тотального препарата): ап – антиподы с конденсированным хроматином и фрагментированными ядрышками и антипода с диффузным хроматином (*а*).

б – ядра антипод на тотальном препарате изолированного зародышевого мешка, окрашенные флуорохромом Dapi.

в – те же ядра после окрашивания по методу TUNEL. Окрашивание гигантских хромосом и зон ядрышек некоторых клеток свидетельствует о наличии в этих структурах фрагментированной ДНК. Объектив UPlan FLN $\times 100/1.30$. Масштаб 20 мкм.

синцития эндосперма содержат фрагменты ядрышка и хроматина, экструзированные из прилежащих к нему антиподальных клеток (рис. 9, *а*).

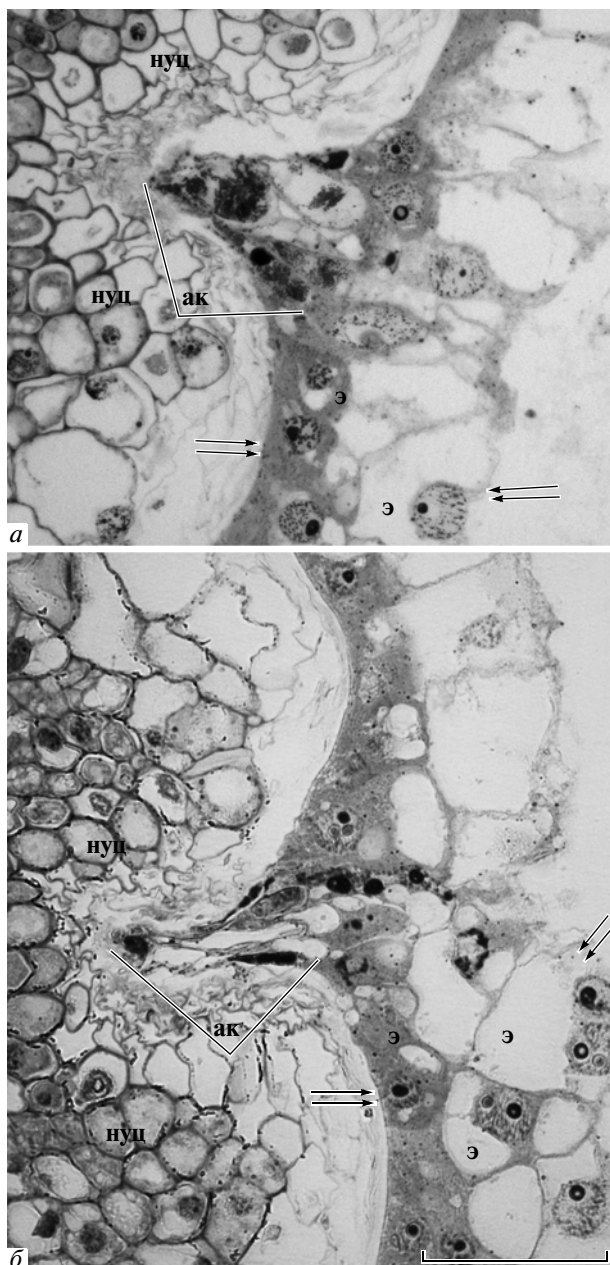


Рис. 11. Завершающие стадии онтогенеза антиподального комплекса (ак) на поперечных срезах семязачатков с многослойным эндоспермом.

а – фаза зародышевого мешка с двухслойным эндоспермом (э, двойные стрелки).

б – фаза зародышевого мешка с трехслойным эндоспермом (э, двойные стрелки). Функционирующие и апоптотические антиподы располагаются внутри углубления, сформированного халазальной зоной нуцеллуса (нуц). Объектив Plan CN $\times 20/0.40$. Масштаб 100 мкм.

На последующей стадии развития зародышевого мешка, которая характеризуется переходом эндосперма в клеточную фазу, наблюдается сильная гетерогенность клеток антипод по содержанию ДНК. По данным цитофотометрии ploidyность большин-

ства клеток антиподального комплекса в этот период составляет от 10 до 16С, некоторые наиболее крупные клетки, которые располагаются в апикальном ярусе, достигают ploidyности в 32С (рис. 13, *а–г*). Результаты цитофотометрического анализа антипод, изолированных из зародышевого мешка, показали, что наблюдается положительная корреляция между площадью ядер и их ploidyностью (рис. 14). Это может означать, что, не все клетки комплекса прошли одинаковое количество раундов эндоредупликации ДНК. Альтернативное предположение – в части клеток реплицируется не вся геномная ДНК, а только некоторые локусы хромосом.

Завершающий этап дифференцировки антиподальных клеток характеризуется конденсацией хроматина, распадом ядрышек, нарушением целостности ядерной оболочки и выходом части хроматина и материала ядрышек в цитоплазму (рис. 9, *а, б*; рис. 10, *а*). По общей морфологии ядер можно заключить, что в таких клетках включается программа апоптоза. Это предположение подтверждается окрашиванием сегментированной ДНК по методу TUNEL (рис. 10, *б, в*).

По мере вытягивания и роста семени клетки халазальной зоны нуцеллуса, примыкающие к проводящему пучку, образуют углубление, в которое постепенно втягиваются апоптотические антиподы. На поперечном срезе это углубление имеет вид подковы, в котором расположены клетки антиподального комплекса (рис. 11).

Таким образом, процесс деструкции антипод обычно растянут во времени до тех пор, пока вся полость зародышевого мешка не заполнится клетками. На поперечных срезах в период двухъярусного клеточного эндосперма можно видеть как интактные, так и отмирающие клетки антиподального комплекса (рис. 11, *б*).

3. Строение АК в семяпочках с не развившимся эндоспермом

Наряду с нормально развивающимися семяпочками были проанализированы встречающиеся в колосе пшеницы “усеченные” семяпочки (рис. 12, *а*). Оказалось, что в этих не развившихся семяпочках содержится округлый расширенный зародышевый мешок, лишенный эндосперма, но с развитым антиподальным комплексом, содержащий около 25 клеток. Как и в нормальных семяпочках, антиподальный комплекс “усеченных” семяпочек имеет ярусное строение (рис. 12, *б*). Антиподальные клетки апикального яруса этих семяпочек крупнее апикальных клеток нормально развивающегося зародышевого мешка (периода до оплодотворения), имеют округлую форму и содержат крупные ядра с массивными ядрышками и гигантскими хромосомами (рис. 12, *а*). Другой отличительной особен-

Содержание ДНК в ядрах антипод в онтогенезе

Содержание ДНК в ядрах антипод	% ядер к моменту оплодотворения	% ядер после оплодотворения	% ядер активной фазы	% ядер с первыми признаками апоптоза
до 4С	100%			
до 10С		84%	43%	19%
более 10С		16%	57%	81%

ностью этих клеток является наличие в их цитоплазме значительного количества вакуолей, самые мелкие из которых располагаются вокруг ядра, вблизи ядерной оболочки и у мембран больших вакуолей (рис. 12, в). Два базальных яруса состоят из меньших по размеру и сильно уплощенных клеток (рис. 12, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе детально прослежена динамика формирования антиподального комплекса пшеницы *Triticum aestivum* L. Полученные данные позволяют выделить три ключевых и строго последовательных этапа в развитии антиподального комплекса: этап пролиферации инициальных клеток, этап роста и функциональной дифференцировки антипод и этап их апоптотической гибели.

В этом процессе наименее изученным остается этап пролиферации антипод. По данным ранних работ, у многих растений число антипод, первоначально равное трем, увеличивается путем митотических делений (Поддубная-Арнольди, 1976), однако до настоящего времени особенности делений антипод остаются не документированными. Результаты полученные в нашей работе убедительно показывают, что антиподы зародышевого мешка пшеницы делятся путем типичного митоза, их деления асинхронны, а вектор пролиферации направлен от базальных к апикальным клеткам антиподального

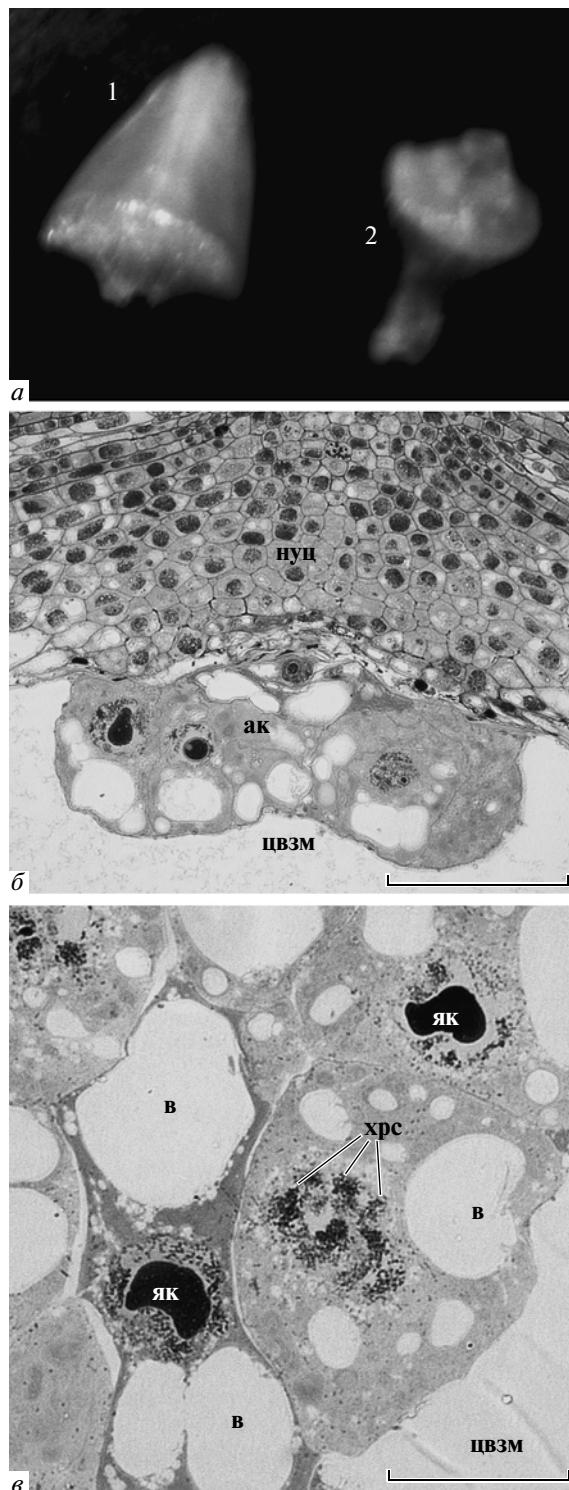


Рис. 12. Структурная организация антиподального комплекса в “усеченных” семяпочках (с неразвившимся эндоспермом).

а – Нормальные (1) и “усеченные” семяпочки (2), изолированные из одного колоса пшеницы.

б – Поперечное сечение развитого антиподального комплекса в “усеченных” семяпочках. Апикальный ярус представлен крупными клетками, средний и базальный ярусы состоят из мелких уплощенных клеток. Антиподальный комплекс – ак; клетки нуцеллуса – нуц; центральная вакуоль зародышевого мешка – цвзм. Эндосперма нет. Объектив Plan CN $\times 20/0.40$. Масштаб 100 мкм.

в – Срез тотального препарата антиподального комплекса. В ядрах клеток апикального яруса гигантские хромосомы декомпактизованы (хрс, стрелки), в цитоплазме многочисленные мелкие вакуоли локализованы вокруг ядер и крупных вакуолей, что отражает высокую функциональную активность антиподальных клеток. Объектив Plan CN $\times 40/0.65$. Масштаб 50 мкм.

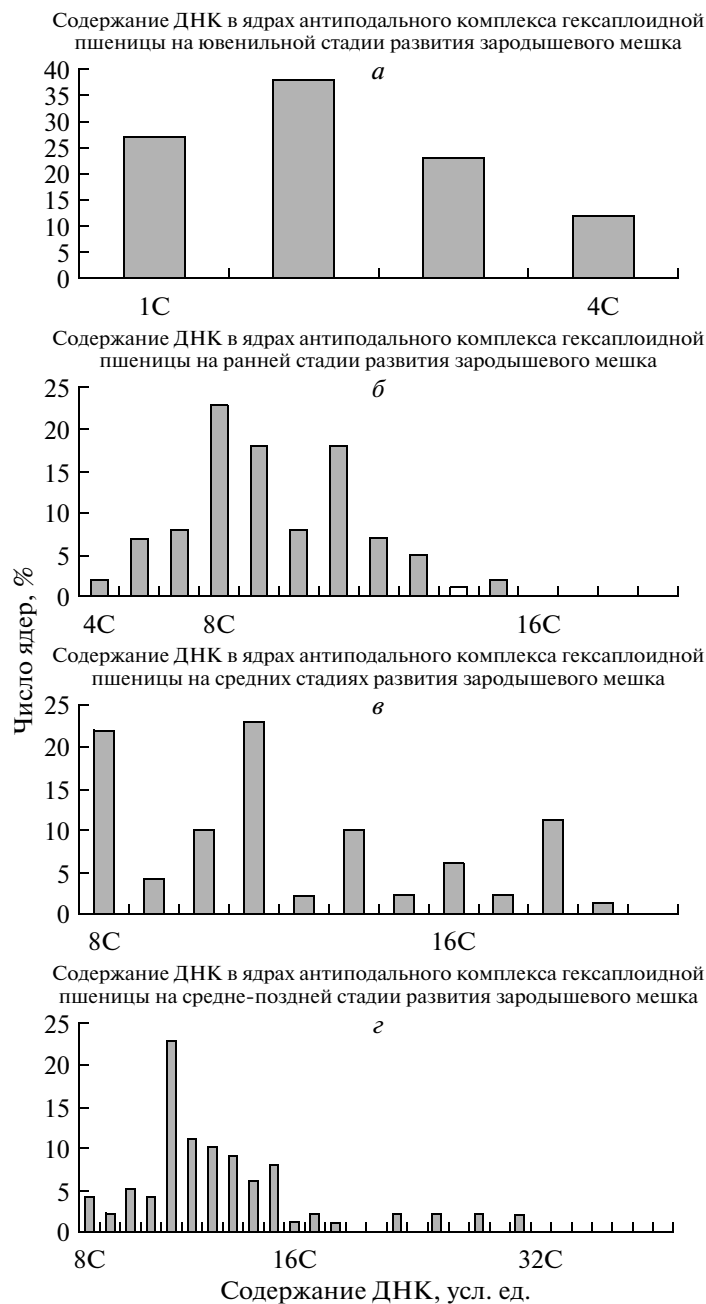


Рис. 13. Гистограммы распределения содержания ДНК (в отн. ед.) в ядрах антиподальных клеток на разных этапах развития зародышевого мешка.

а – содержание ДНК в ядрах антипод до оплодотворения (ювенильная стадия); *б* – после оплодотворения; *в* – в самой активной фазе; *г* – к моменту апоптотической гибели.

комплекса. По общей организации хроматина, по размерам и структуре митотических хромосом, на этом этапе развития антиподы не отличаются от клеток нуцеллуса, окружающих зародышевый мешок. В то же время, наличие в пролиферирующих антиподах anomalно крупных ядрышек может свидетельствовать о высоком уровне экспрессии генов, кодирующих синтез рибосомной РНК (Traas et al., 1998).

В конечном итоге, именно пролиферация антипод приводит к формированию дефинитивной структуры антиподального комплекса. Обобщенная схема, суммирующая данные по ранним этапам развития антиподального комплекса от начала стадии пролиферации антипод до формирования зиготы и первых ядер эндосперма, представлена на рис. 6. Анализ дорсовентральных и поперечных сечений зародышевого мешка показал, что структура

антиподального комплекса закладывается уже на начальных этапах пролиферации инициальных клеток (рис. 6, а, б). В связи с тем, что ось первого деления базальной клетки ориентируется параллельно дорсовентральной плоскости зародышевого мешка, в антиподальном комплексе формируются 3 яруса клеток, — одна дочерняя клетка остается базальной, другая занимает срединное положение, а две не разделившиеся инициальные клетки располагаются в апикальном ярусе (рис. 6, а). Наиболее четко три яруса клеток выявляются на стадии, предшествующей оплодотворению: нижний (базальный) ярус комплекса, примыкающий к халазальной зоне нуцеллуса, содержит одну или две клетки, средний около восьми, а ярус, граничащий непосредственно с центральной клеткой, содержит не менее 16 клеток (рис. 6, в). Таким образом, суммарное количество клеток в комплексе может достигать 25–27, что хорошо соответствует ранним наблюдениям (Батыгина, 1974). Окончательное количество антиподальных клеток в индивидуальных семязпочках обычно немного варьирует, что может быть обусловлено асинхронностью делений при формировании антиподального комплекса. Перечисленные данные позволяют сделать два важных вывода. Во-первых, в отличие от базальной клетки, ось деления которой располагается в дорсовентральной плоскости, оси делений клеток среднего и апикального ярусов должны быть ориентированы только латерально. При любой другой ориентации делений упорядоченность архитектуры антиподального комплекса не может сохраняться на всех этапах его развития. Во-вторых (в случае, если одинаковым пролиферативным потенциалом обладают все инициальные антиподы), каждая клетка среднего и апикального ярусов проходит три цикла митотических делений.

К моменту окончания делений количество ДНК в клетках антиподального комплекса не превышает гаплоидных значений, что свидетельствует об отсутствии в пролиферирующих антиподах процесса эндоредупликации ДНК. Увеличение количества ДНК в ядрах антипод начинается только после полного окончания пролиферации и по времени предшествует оплодотворению. Известно, что эндоредупликация ДНК, приводящая к формированию полиплоидных соматических клеток — явление, широко распространенное в мире растений (Melagano et al., 1993; Tominaga R. et al., 2008). Однако только в некоторых специализированных клетках, к которым можно отнести антиподы, этот процесс характеризуется особым типом дифференцировки, связанным с формированием обособленных гигантских хромосом (Поддубная-Арнольди, 1976). В антиподальном комплексе пшеницы процесс формирования гигантских хромосом, сопровождающийся прогрессивным увеличением размеров клеток и ядер, становится заметным только после оплодотворения зародышевого мешка. На этом эта-

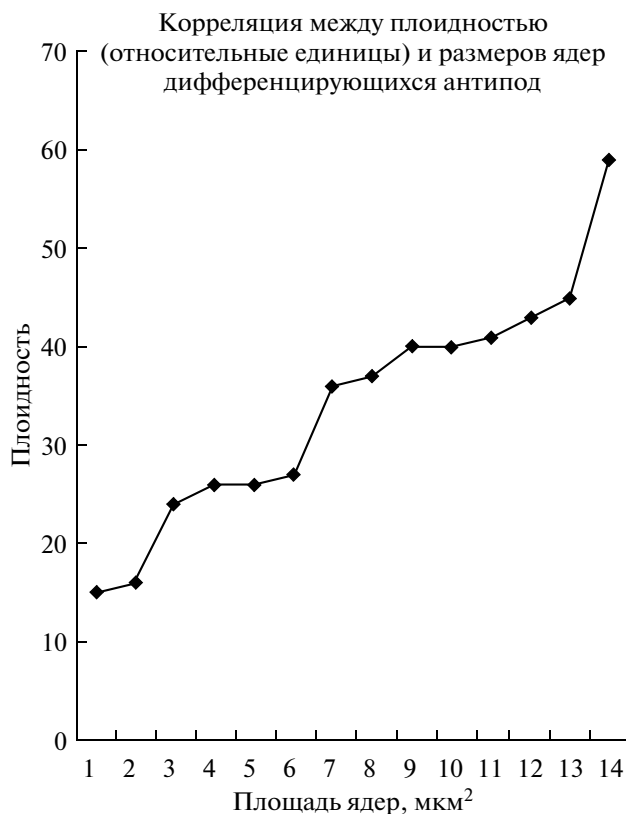


Рис. 14. Корреляция между плоидностью ядер антиподальных клеток и их площадью.

пе развития ярусы комплекса содержат клетки, близкие по размеру, в то время как размеры клеток в составе индивидуальных ярусов различаются: клетки апикального яруса значительно крупнее, чем клетки базального и среднего ярусов. При этом гигантские хромосомы выявляются в ядрах всех без исключения клеток антиподального комплекса. Основываясь на данных цитофотометрии можно утверждать, что крупные клетки апикальных ярусов обладают более высокой плоидностью и, следовательно, повышенным уровнем метаболической активности по сравнению с клетками базальных ярусов.

Эндоредупликация ДНК и формирование гигантских хромосом свидетельствуют о включении в антиподах генетически детерминированного процесса, направленного на повышение уровня экспрессии генов на определенной стадии развития зародышевого мешка. Наличие в “усеченных” семязпочках с не развившимся эндоспермом полностью сформированного антиподального комплекса, показывает, что реализация этого процесса не зависит от программы, контролирующей развитие зародышевого мешка после оплодотворения. С другой стороны, завершающий этап этой программы, а именно, апоптотическая гибель клеток и утилизация синтезированных в антиподах продуктов, возможен

только после оплодотворения. На это указывают данные, по которым в семяпочках с не развившимся эндоспермом частично или полностью блокируется терминальная дифференцировка антипод. По нашим наблюдениям и по некоторым данным литературы (Engel, 1994; Li-Hua, Rui-Lin You, 2004) антиподы начинают гибнуть апоптогически в тот период, когда происходит формирование клеточного эндосперма. Заканчивается этот процесс, когда эндосперм полностью сформирован. В клетках антиподального комплекса “усеченных” семяпочек программа апоптогической гибели не включается или сильно задерживается: “усеченные” семяпочки были собраны для микроскопического анализа в то время, когда в нормальных семяпочках того же колоса антиподальный комплекс полностью дегенерировал. Таким образом, из полученных данных по сравнительному анализу антиподального комплекса в нормальных и “усеченных” семяпочках следует, что эндополиплоидизация генома и формирование гигантских хромосом является необходимым, но не достаточным условием для нормального функционирования антипод.

Важно подчеркнуть, что существенным отличием “усеченных” семяпочек от нормальных является отсутствие клеток эндосперма, вероятнее всего, по причине не состоявшегося оплодотворения центральной клетки. На этом основании можно предположить, что возможным индуктором терминальной фазы дифференцировки антипод является именно развивающийся эндосперм. В рамках этой гипотезы, основным назначением антиподального комплекса зародышевых мешков пшеницы и других злаков, является обеспечение нормального функционирования эндосперма на нуклеарной стадии его развития. Не случайно многие исследователи считают этот этап в развитии семени злаков наиболее критическим, поскольку неоднократно отмечалось, что при аномалиях в развитии антипод или их ранней деградации у гибридов наблюдаются нарушения в формировании эндосперма, что обычно приводит к шуплости семян (Ригин и Орлова, 1974).

Вопрос о том, в чем конкретно состоит функциональная роль клеток антиподального комплекса остается открытым. Возможно, клетки базальных ярусов комплекса с хорошо развитой вакуолярной системой, находящиеся в контакте с халазальной зоной нуцеллуса и в непосредственной близости к проводящей системе семязачатка, выполняют осморегулирующую и своего рода “буферную” функцию, контролируя поступление воды, минеральных веществ и метаболитов из материнских тканей в эндосперм. Именно в этой пограничной зоне у разных злаков наблюдаются инвагинации клеточных стенок антипод, что значительно увеличивает поверхность контакта и облегчает абсорбцию транспортируемых продуктов (Engell, 1994). Другое (но не альтернативное) предположение — клетки антиподального комплекса выполняют сек-

реторную функцию. Известно, что в клетках, ядра которых содержат гигантские политенные хромосомы (как, например, клетки слюнных желез некоторых *Diptera*), синтезируется большое количество белков, необходимых для ключевых стадий развития личинки (Zhimulev, 1996; Коряков, Жимулев, 2009). Рассуждая по аналогии, можно предположить, что в клетках антиподального комплекса пшеницы экспрессируются гены, кодирующие необходимые для развития эндосперма факторы (белки), которые утилизируются эндоспермом. В качестве аргумента можно привести полученные в работе данные, показывающие транспорт фрагментов ядерного материала из клеток антипод в эндосперм (рис. 9, а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206с.
- Ивановская Е.В. Функциональная морфология политенных хромосом антипод пшеницы // Цитология. 1973. Т. 15. № 12. С. 1445–1452.
- Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. Новосибирск. Изд-во СО РАН, 2009. 258 с.
- Лазарева Е.М., Ченцов Ю.С. Особенности локализации фибрилларина, белка с мол. массой 53 кДа и AgNOR-белков в гигантских ядрах клеток антипод пшеницы // Цитология. 2004. Т. 46. № 2. С. 125–135.
- Петрова Т.Ф. Метод приготовления тотальных эмбриологических препаратов эндосперма // Ботан. журн. 1970. Т. 55. №. 11. С. 1662 – 1665.
- Петрова Т.Ф., Соловьянова О.Б., Ченцов Ю.С. Ультраструктура гигантских хромосом в антиподах ячменя // Цитология. 1985. Т. 27. № 5. С. 499–502.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитозембриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. М.: Наука, 1976. 507с.
- Ригин Б.В., Орлова И.Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. Л.: Колос, 1974. 206с.
- Чабан И.А. Генезис антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы // XII съезд РБО. Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Материалы всероссийской конференции. 2008. Петрозаводск. С. 302–306.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Ред. Т.Б. Батыгина. С. Петербург: Мир и семья. 1994. Т. 1. 508 с.
- Cionini P.G., Cavallini A., Baroncelli S., Lercari B., D'Amato F. Diploidy and chromosome endoreduplication in the development of epidermal cell lines in the first foliage leaf durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Protoplasma. 1983. V. 118. P. 156–162.
- Bhatnagar S.P., Chandra S. Reproductive biology of *Triticum*. 111 // Phytomorphology. V. 25. № 4. P. 471–477.
- Brink R.A., Cooper D.C. The antipodal in relation to abnormal endosperm behavior in *Hordeum jubatum* × *Secale cereale* hybrid seeds // Genetics. 1944. V. 29. № 4. P. 291–340.
- Diboll A.G., Larson D.A. Fine structural development of the megagametophyte of *Zea mays* following fertilization // Am. J. Bot. 1966. V. 55. № 7. P. 787–806.

- Engell K.* Embryology of barley. 1V. Ultrastructure of the antipodal cells of *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi before and after fertilization of the egg cell // *Sex Plant Reprod.* 1994. V. 7. P. 333–348.
- Kaufmann B.P., Gay H., McDonald M.R.* Organizational patterns within chromosomes // *Int. Rev. Cytol.* 1960. V. 9. P. 77–127.
- Li-Hua An and Rui-Lin You.* Studies on nuclear degeneration during programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum* // *Sex Plant Reprod.* 2004. V. 17. P. 195–201.
- Melaragno J.E., Mehrotra B., Coleman A.W.* Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 1661–1668.
- Otsuki Y., Li Z.L., Shibata V.F.* Apoptotic detection methods: from morphology to gene // *J. Prog. Histochem. Cytol.* 2003. V. 38. P. 275–339.
- Tominaga R., Iwata M., Sano R., Inoue K., Okada K., Wada T.* *Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation // *Development.* 2008. V.135. P. 1335–1345.
- Traas J., Hülskamp M., Gendreau E., Höfte H.* Endoreduplication and development: rule without dividing? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. V. 1. P. 498–503.
- You R., Jensen W.A.* Ultrastructural observation of the mature megagametophyte and fertilisation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Can. J. Bot.* 1985. V. 63. № 2. P. 163–178.
- Zhimulev I.F.* Morphology and structure of polytene chromosomes // *Advances in Genetics.* 1996. V. 34. P. 1–359.

Antipodal Complex Development in the Embryo Sac of Wheat

I. A. Chaban^a, E. M. Lazareva^b, N. V. Kononenko^a, and V. Yu. Polyakov^b

^a All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550 Russia

^b Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: lazareva-e@yandex.ru

Abstract—Dynamics of an antipodal complex formation in wheat (*Triticum aestivum* L.) has been observed in detail using a reconstruction of serial semifine sections. Three consecutive crucial stages have been identified in the development of the antipodal complex: (1) proliferation of initial cells, (2) growth and functional differentiation of antipodal cells, and (3) cell apoptosis. Specific features of the mitotic division of antipodal cells have been characterized. It has been shown that the structure of interphase nuclei and mitotic chromosomes of proliferating antipodal cells is similar to that of nucellar cells surrounding the embryo sac. According to the reconstruction of appropriately oriented serial sections, the division of antipodal cells is asynchronous. DNA content in differentiated antipodal cells has been determined by a cytophotometric analysis; in the case of a mature embryo sac, the ploidy of antipodal cells varied from 8 to 32C. Proliferation and DNA endoreduplication processes in the antipodal complex proceed at different time; the second process starts only after the termination of the first one. DNA endoreduplication is accompanied by total chromatin remodeling; as a result, giant chromosomes are formed in the nuclei of antipodal cells. The final stage of the antipodal complex development is programmed cell death or apoptosis. A model for the structural organization of an antipodal complex has been proposed based on the layer arrangement of cells. The secretory activity of antipodal cells directed towards the endosperm syncytium has been detected for the first time. The analysis of “truncated” ovules with an undeveloped endosperm has shown that developing endosperm can be a possible inductor, which stimulates the functional activity of antipodal cells and triggers their terminal differentiation. The obtained results evidence the functional role of antipodal cells in the development of the endosperm and embryo.

Keywords: early embryogenesis of the embryo sac, antipodal complex, plant cells