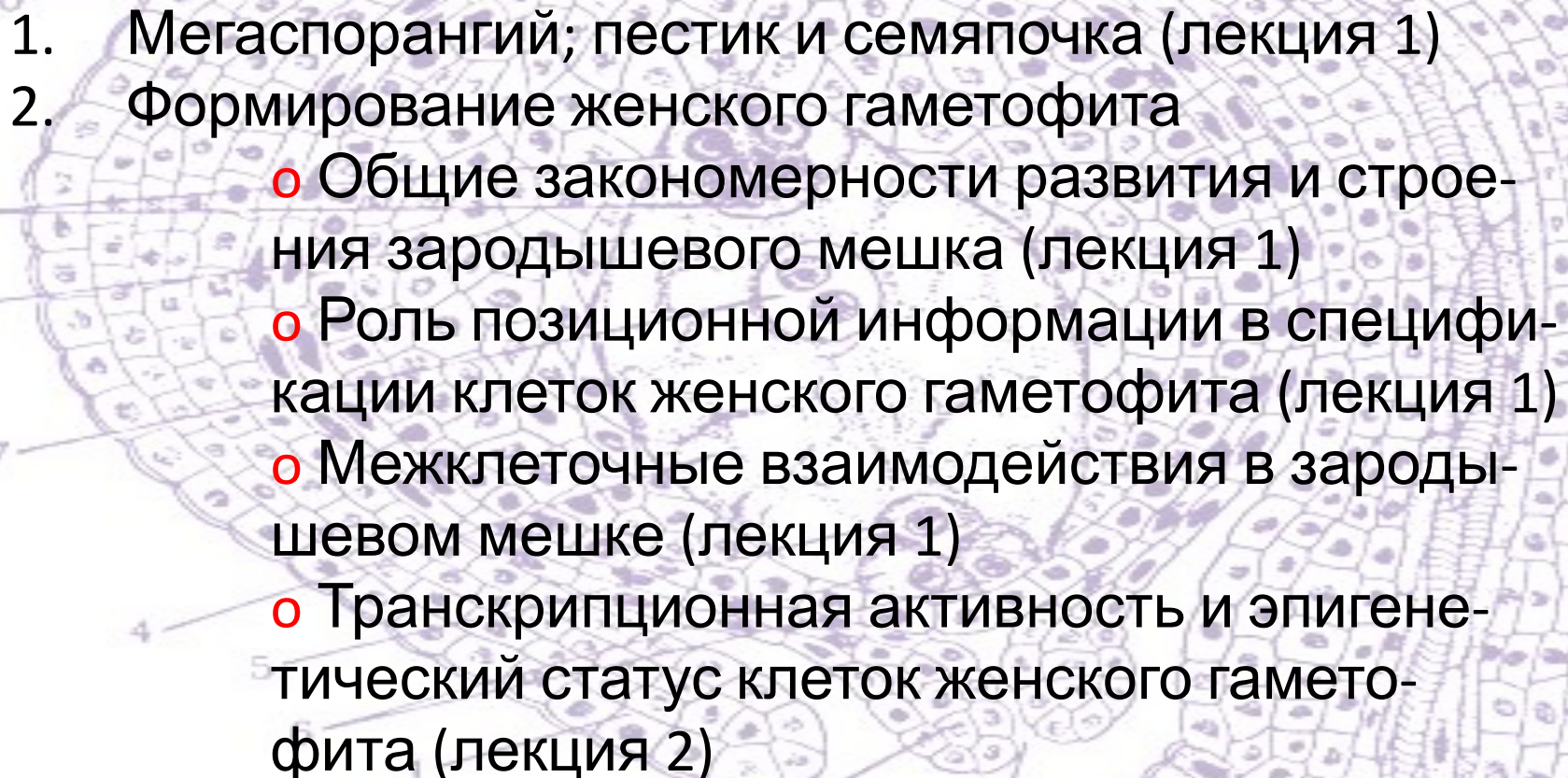


Мегагаметофит

Лекция 1. О женском...



Что мы будем проходить?

- 
1. Мегаспорангий; пестик и семязпочка (лекция 1)
 2. Формирование женского гаметофита
 - Общие закономерности развития и строения зародышевого мешка (лекция 1)
 - Роль позиционной информации в спецификации клеток женского гаметофита (лекция 1)
 - Межклеточные взаимодействия в зародышевом мешке (лекция 1)
 - Транскрипционная активность и эпигенетический статус клеток женского гаметофита (лекция 2)

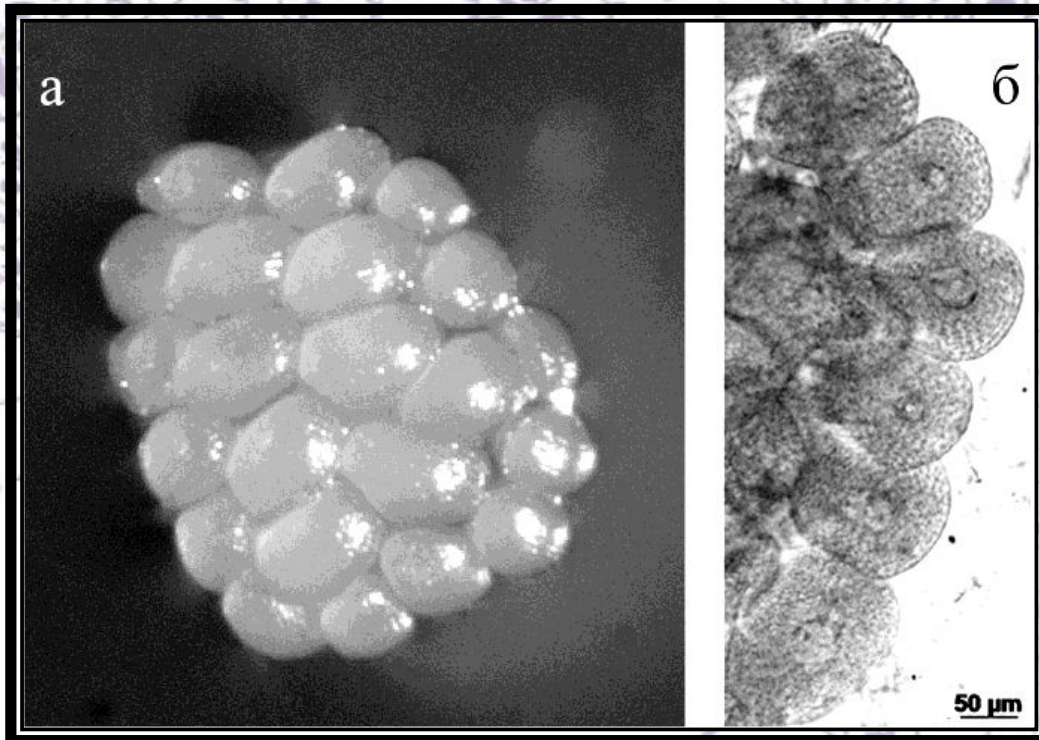
Мегаспорангий



- Женский гаметофит семенных растений развивается в мегаспорангии (**нуцеллусе**) семяпочки.
- Другое название для семяпочки – **семязачаток**.
- Нуцеллус снаружи окружен одним или двумя покровами - **интегументами**, которые закрывают его почти полностью, исключая маленькое отверстие – **микропиле**, через которое входит пыльцевая трубка.
- Внутри мегаспорангия проходит мейоз **мегаспороцита** (материнской клетки мегаспор) с образованием четырех **мегаспор**. У большинства растений выживает единственная мегаспора.
- Она дает начало женскому гаметофиту (**мегагаметофиту**), состоящему из нескольких, обычно семи, клеток.

Семяпочки

- Семяпочки покрытосеменных растений образуются в женском репродуктивном органе цветка – **гинецее** («пестике»), который, в свою очередь, состоит из одного или нескольких **плодолистиков**.



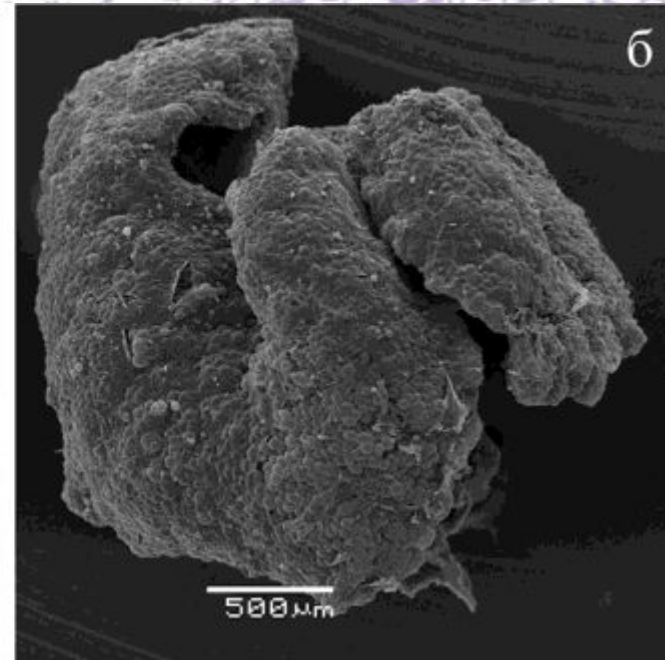
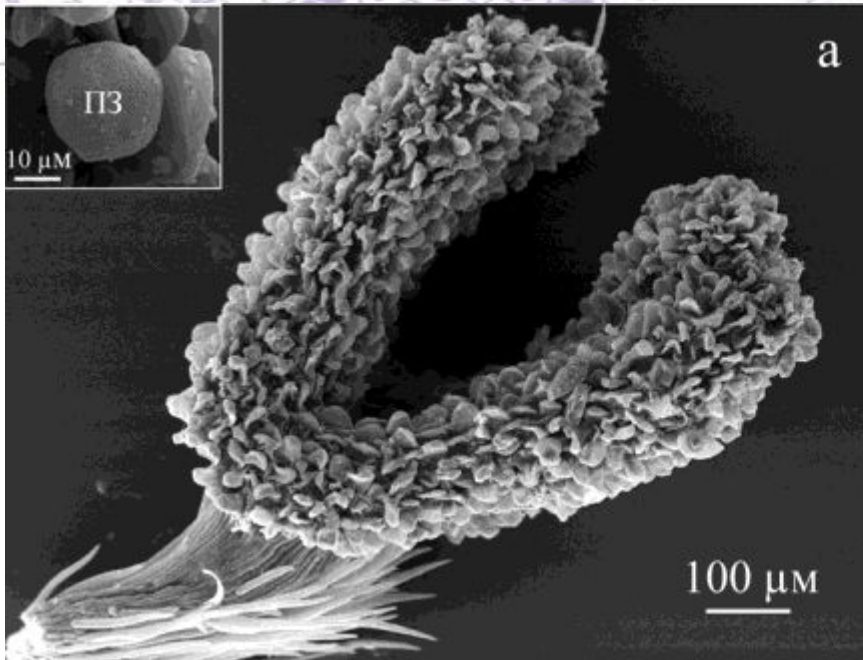
Завязь и семяпочка



- **Завязь** – нижняя часть пестика. На плацентах, расположенных внутри завязи, развиваются **семяпочки**.
- Они прикрепляются к плацентам с помощью **фуникулуса**. Место прикрепления называют **плацентой**.
- Семяпочка имеет полярную структуру. На **микропилярном** ее **конце** покровы (**интегументы**) не смыкаются, и образуется узкий канал, через который входит пыльцевая трубка. На противоположном **халазальном** **конце** семяпочки интегументы и нуцеллус соединяются с фуникулулусом.

Рыльце и столбик

- Рыльце – верхняя, рецептивная часть пестика – собирает пыльцу и обеспечивает ее гидратацию и прорастание.
- Средняя часть пестика – столбик с проводниковой тканью, в которой проходит путь пыльцевых трубок от рыльца к семязпочке.



Разновидности рылец

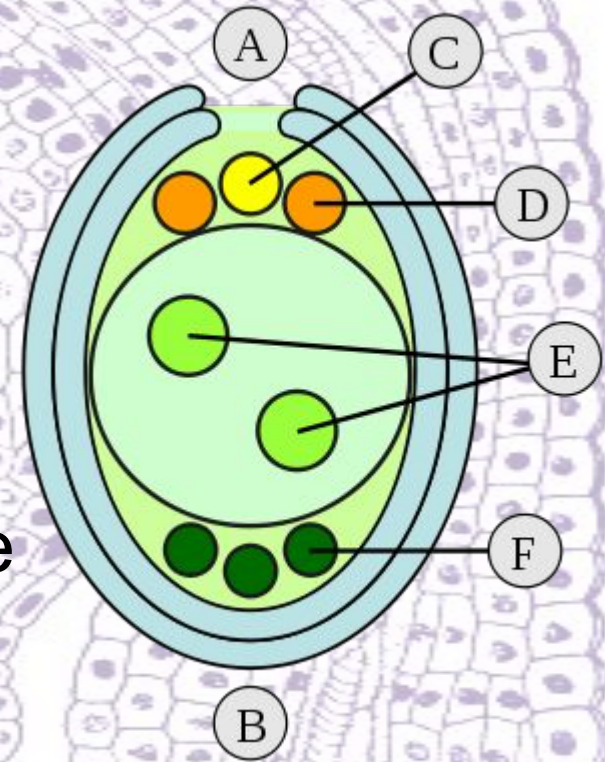
- Выделяют два главных типа рылец: **сухие** и **влажные**, в зависимости от наличия на их поверхности жидкого секрета.
- Сухое рыльце может выглядеть как гладкий купол (*Euphorbia*), но чаще оно покрыто одноклеточными или многоклеточными папиллами (Brassicaceae, Gramineae и Compositae). Пыльцевое зерно имеет примерно такие же размеры, как папилла, и прикрепляется к ней или к поверхности рыльца между папиллами.
- Влажное рыльце покрыто вязким экссудатом, в который погружается пылинка.



Клеточный состав мегагаметофита

Зародышевый мешок (женский гаметофит) включает следующие клетки:

- две синергиды и яйцеклетку в микропилярном конце (C, D)
- антиподы – в халазальном конце (F)
- большую часть зародышевого мешка занимает центральная клетка с двумя полярными ядрами (E)



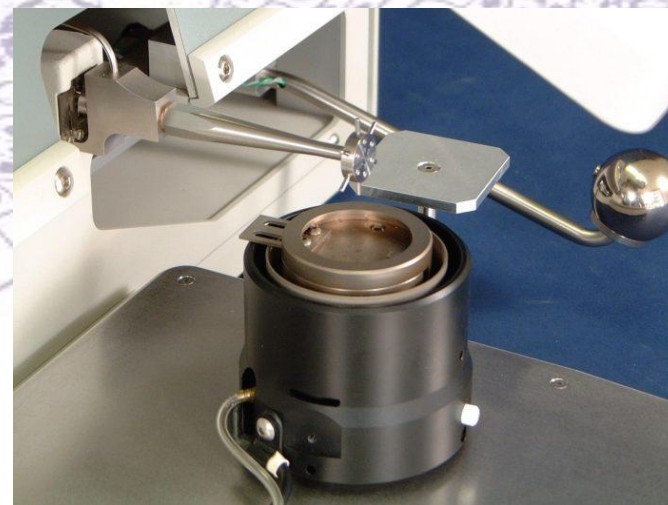
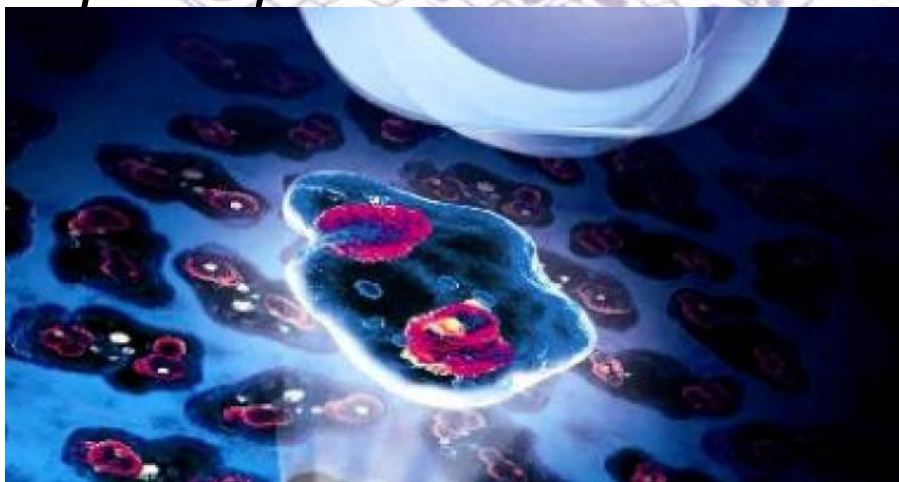
Как работать с мегагаметофитом?

- Это объект, неудобный для экспериментальных исследований. Он труднодоступен, скрыт в толще тканей, тесно с ними связан, имеет малые размеры и короткое время жизни.
- Важным шагом стала разработка методов выделения зародышевых мешков:
 - 1) микроманипуляции, 2) ферментативная мац



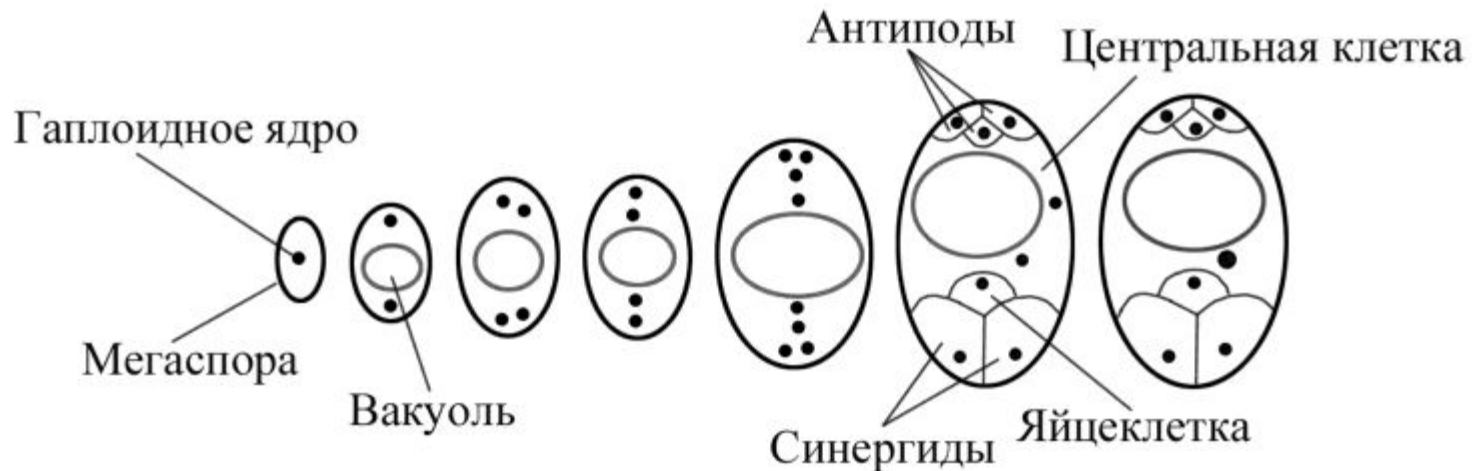
Лазерная микродиссекция

- Под микроскопом с помощью лазера вырезают нужную область, затем она отделяется от основного среза и переносится в накопительную емкость.
- Полученные образцы собираются на адгезивных пленках или посредством катапультирования под действием лазерного луча.
- Образец получается чистый, это реальная возможность выявления взаимосвязи между особенностями ультраструктуры образца, протеома и транскриптома.



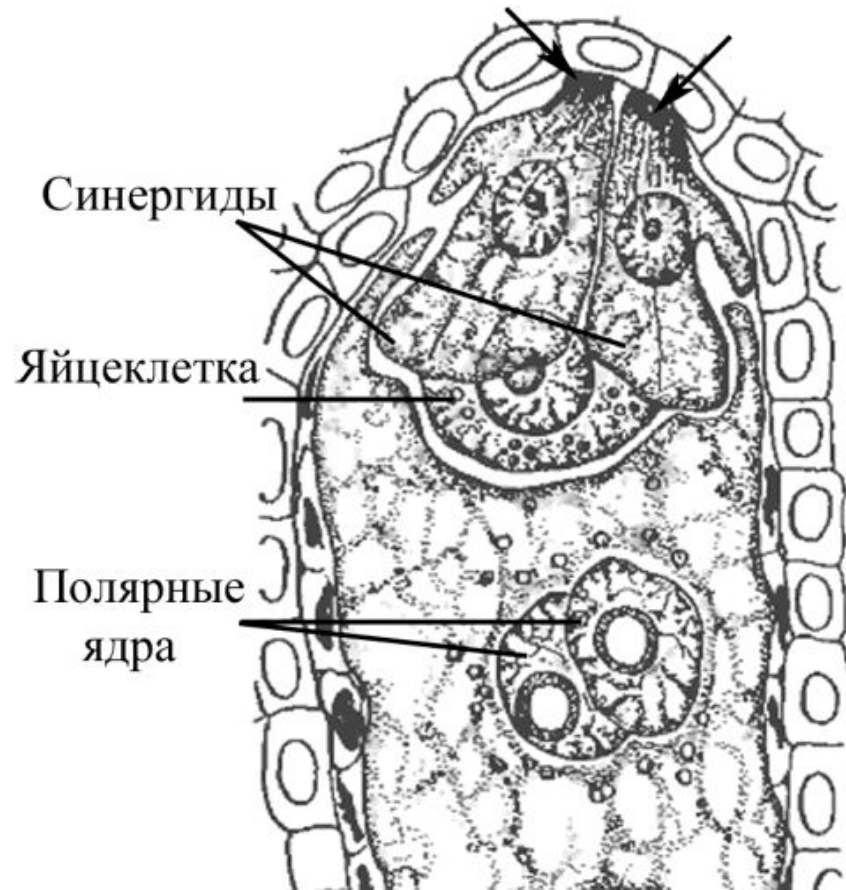
Развитие мегагаметофита

- Крупная функциональная мегаспора делится с образованием двухядерного ценоцита. Ядра в нем расходятся к противоположным полюсам клетки, в ее центре формируется крупная вакуоль.
- В результате второго митоза возникает четырехядерный ценоцит.
- После третьего митоза в восьмиядерном ценоците образуются клеточные перегородки. В ходе **целлюляризации** полярные ядра мигрируют в центр

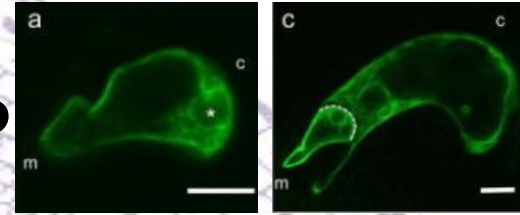


Женский гаметный модуль

- В результате целлюляризации зародышевого мешка возникает семиклеточная структура, объединяющая две гаметы, две синергиды и три антиподы.
- Трехклеточный комплекс из яйцеклетки и синергид составляет яйцевой аппарат.
- Женский гаметный модуль (FGU, female germ unit) включает яйцевой аппарат и центральную клетку и назван так по аналогии с мужским гаметным модулем

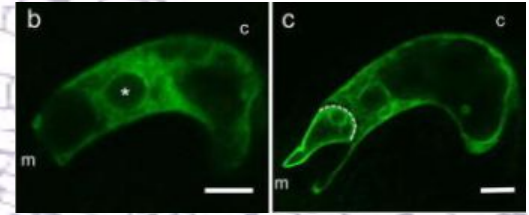


Яйцеклетка и синергидь



- Яйцеклетка и синергиды обычно имеют грушевидную форму и полярную структуру.
- Ядро яйцеклетки часто располагается в ее халазальной части, а вакуоль (или мелкие вакуоли) – ближе к микропиле или в центре. Для яйцеклетки злаков характерно центральное положение ядра.
- Типичная яйцеклетка – это **покоящаяся клетка**: в ней небольшое число полисом, диктиосом и везикул Гольджи, не сильно развит ЭПР, малое число крист в митохондриях.
- Полярность синергид обратная по отношению к яйцеклетке: ядро занимает центральную позицию, а вакуоль (вакуоли) смещены к халазальному концу.
- На микропилярном конце синергиды стенка сильно утолщенная и извитая, вместе с прилежащей к ней плазмалеммой она формирует уникальный **нитчатый аппарат**.
- По цитологическим признакам синергиды – это активно синтезирующие клетки.

Центральная клетка



- Центральная клетка сильно вакуолизирована и занимает большую его часть. Периферическая цитоплазма соединяется с перинуклеарным районом трансвакуолярными тяжами.
- Это цитоплазма метаболически активной клетки: много хорошо развитых митохондрий и диктиосом, пластид с крахмальными зёрнами и полисом. Эндоплазматический ретикулум образует обширную сеть.
- В ней накапливаются запасные вещества – крахмал, липиды, белки, количество которых достигает максимума непосредственно перед оплодотворением

Антиподы

- Антиподальный комплекс характеризуется большим видовым разнообразием.
- У *Arabidopsis* антиподы не обнаруживают признаков специализации, и принято считать, что их функции не установлены.
- Антиподы злаков пролиферируют: у кукурузы к моменту оплодотворения их число доходит до 40.
- Клеточная стенка антиподы может иметь инвагинации на халазальном конце, которые увеличивают площадь зоны ее контакта со спорофитом. Это позволяет предполагать участие антипод в поставке питательных веществ от спорофита к гаметофиту.
- Цитологическая структура антипод говорит о том, что функции антипод не ограничиваются поставкой веществ от спорофита к гаметофиту.
- Они могут выступать как активно синтезирующие и, возможно, регуляторные клетки.

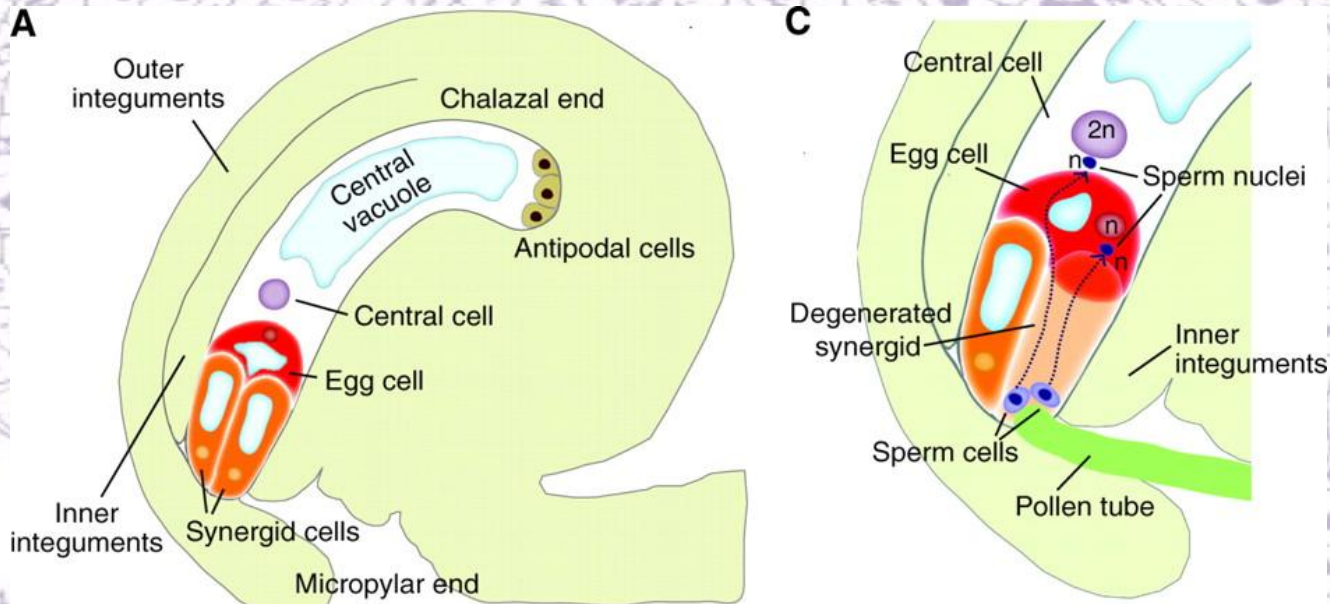


Готовьтесь, к вам гости!

- У большинства видов покрытосеменных растений женский гаметофит в основном формируется до опыления. Однако известны растения, у которых образование семяпочек начинается после опыления (*Phalaenopsis*).
- Опыление и рост пыльцевой трубки в репродуктивных тканях индуцируют в женском гаметофите комплекс изменений, подготавливающих оплодотворение.
- В частности, должна произойти синхронизация клеточных циклов мужского и женского гаметофитов. Яйцеклетка должна приходить к слиянию в той же фазе клеточного цикла, что и спермий (в зависимости от вида, в фазе G1 или G2).
- В этой связи возникает вопрос о движении яйцеклетки (и других клеток женского гаметофита) по клеточному циклу.

Спецификация клеток

- Разная судьба: 2 гаметы (ЯК, ЦК), 2 типа вспомогательных клеток (С, А)

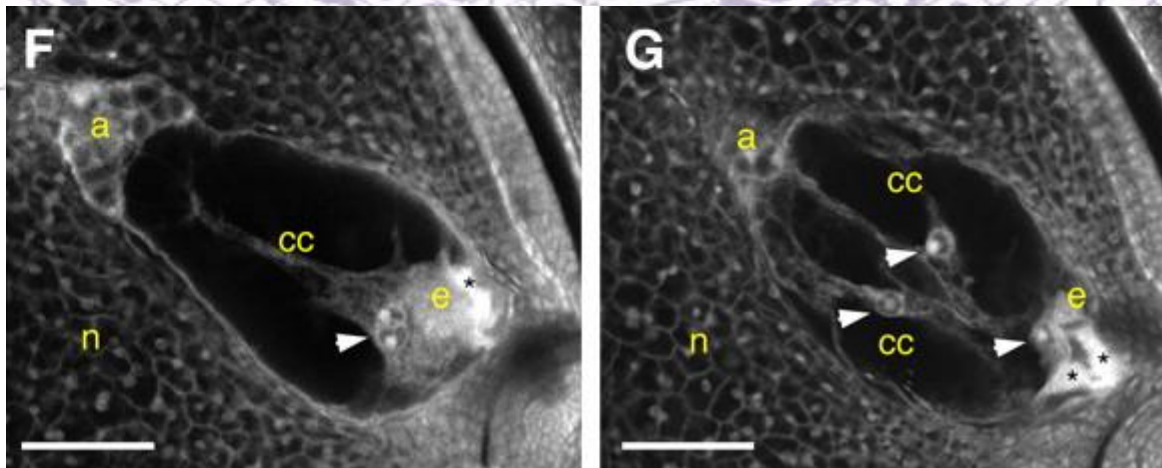


- Ориентация митозов и строго определенное расположение дочерних ядер играют ключевую роль в развитии женского гаметофита
- Как показал анализ мутантов, спецификация клеток зародышевого мешка зависит от их расположения относительно микропилярно-халазальной оси.

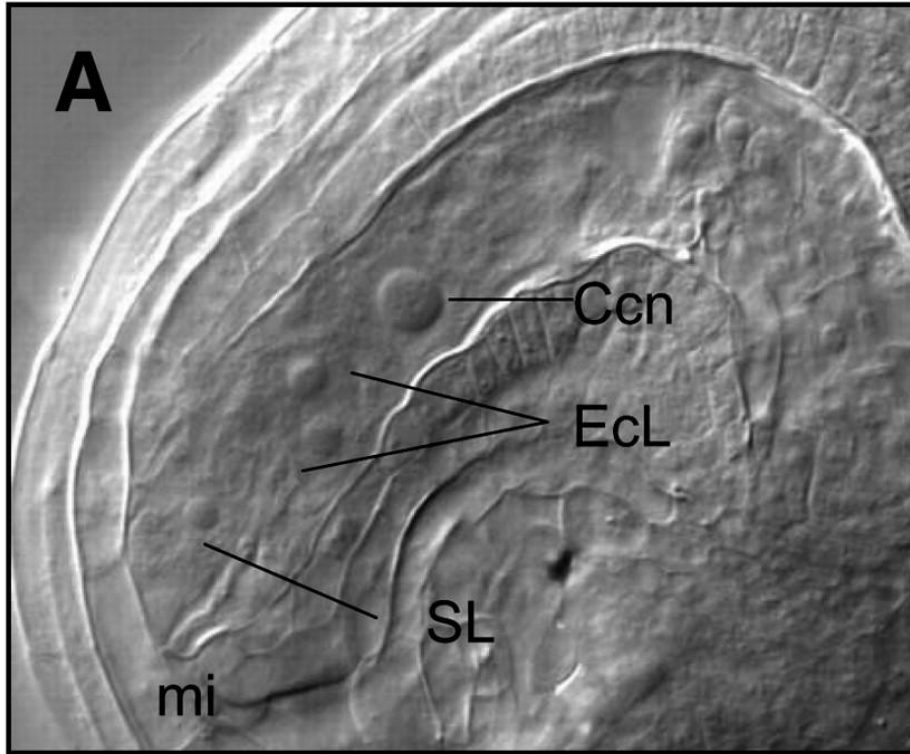
Мутанты по спецификации

- Мутант кукурузы с избыточной пролиферацией ядер (*ig1, indeterminate gametophyte1*)
- Мутант *Arabidopsis* с нарушением клеточного цикла (*rbr1, retinoblastomarelated1*)

У этих мутантов увеличено число яйцеклеток и центральных клеток. При этом спецификация каждой из этих клеток происходит в соответствии с ее положением относительно оси зародышевого мешка.



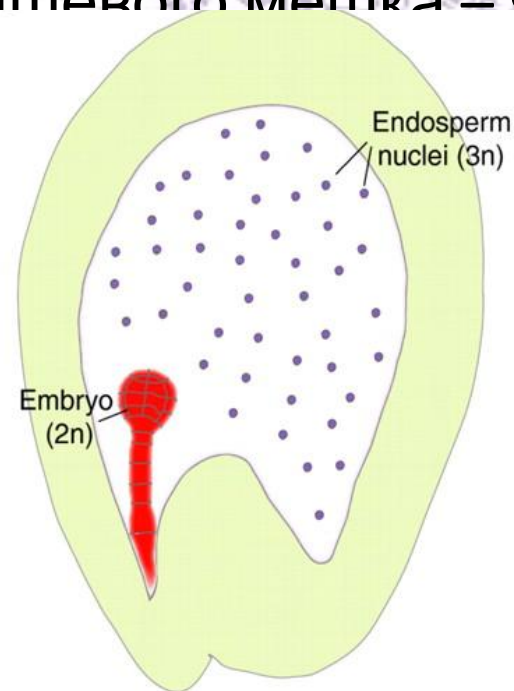
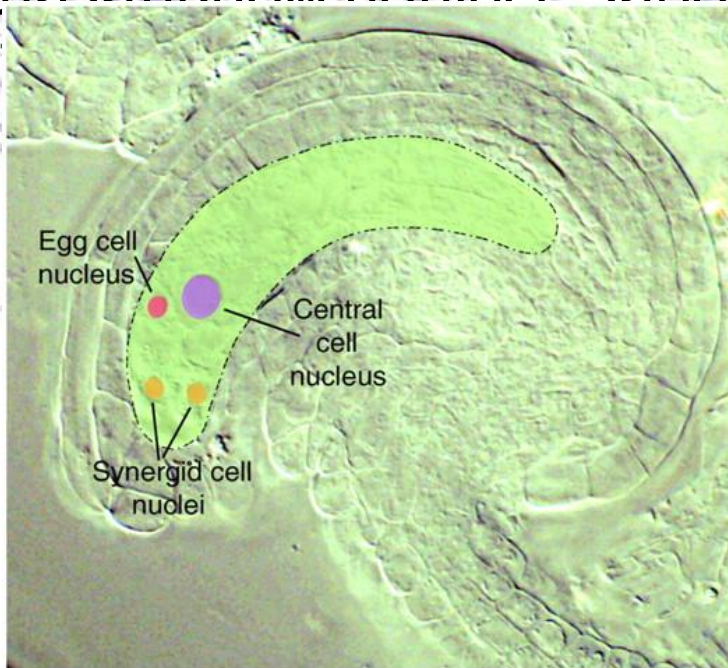
Мутанты по спецификации



- У мутанта *Arabidopsis eostre* число ядер в зародышевом мешке нормальное, но на четырехядерной стадии нарушается процесс миграции ядер.
- На позиции, в норме соответствующей ядру яйцеклетки, у мутанта располагаются два ядра. После целлюляризации образуются две яйцеклетки, способные участвовать в оплодотворении. При таком «двойном оплодотворении» образуется два зародыша, но нет эндосперма.

Итак, что же в норме?

- В ходе нормального развития зародышевого мешка ядра, ближайшие к микропиле, окажутся в **синергидах**.
- Следующая пара ядер – это **ядро яйцеклетки** и **одно из полярных ядер** центральной клетки.
- Далее, **второе полярное ядро** и, наконец, на хапазальном полюсе зародышевого мешка – ядра ан



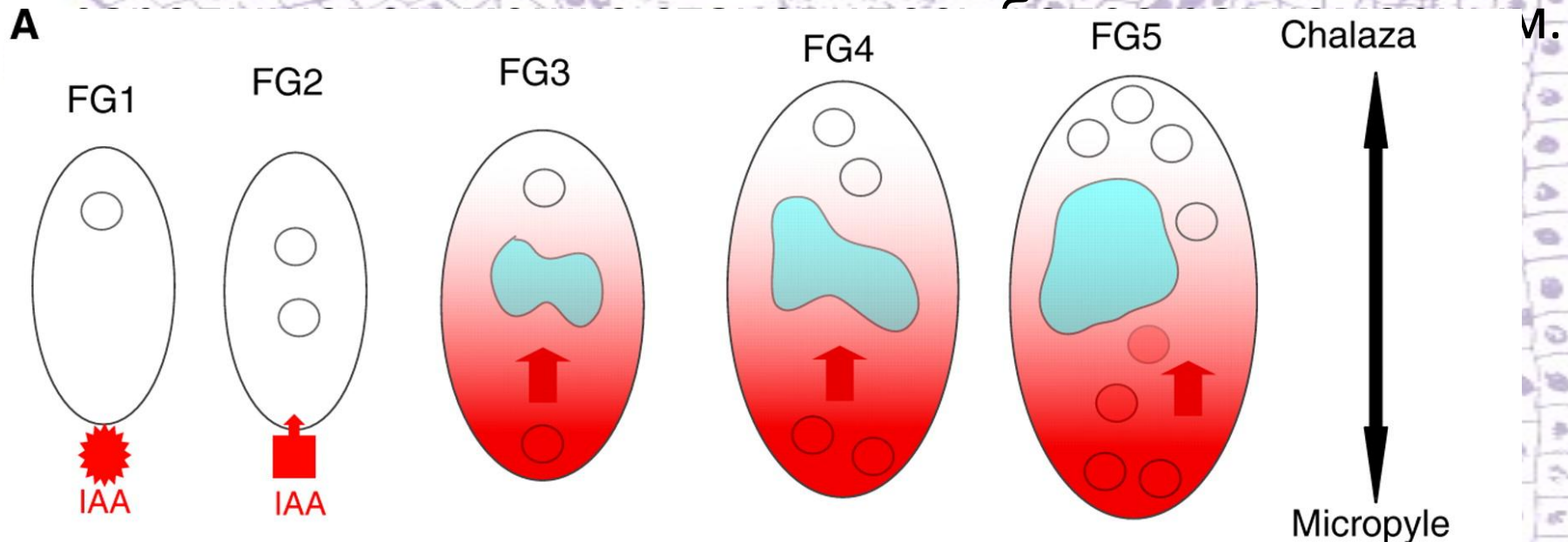
Позиционная информация

- Анализ мутантов показал ключевую роль *позиционной информации* в определении судьбы клеток женского гаметофита
- → между микропилярным и халазальным полюсами зародышевого мешка имеется градиент концентрации *морфогенного фактора*
- На роль МФ претендует ауксин!

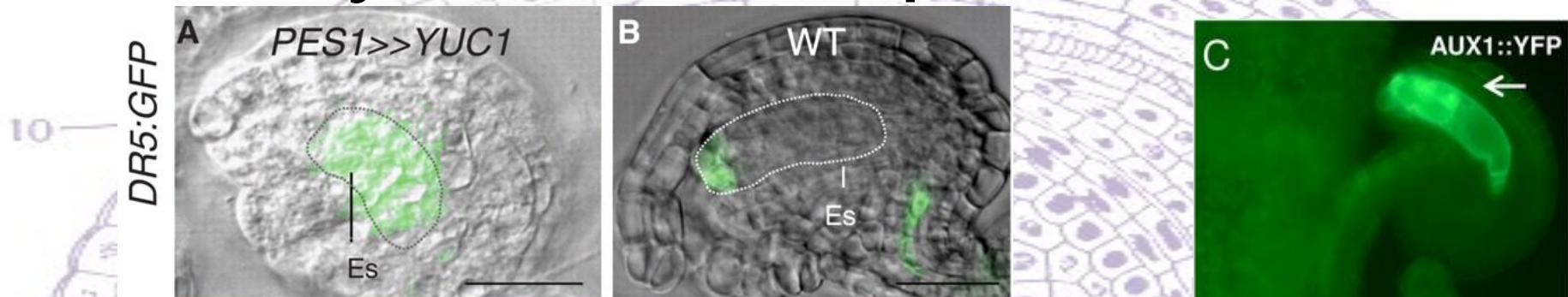


Позиционная информация и ауксин

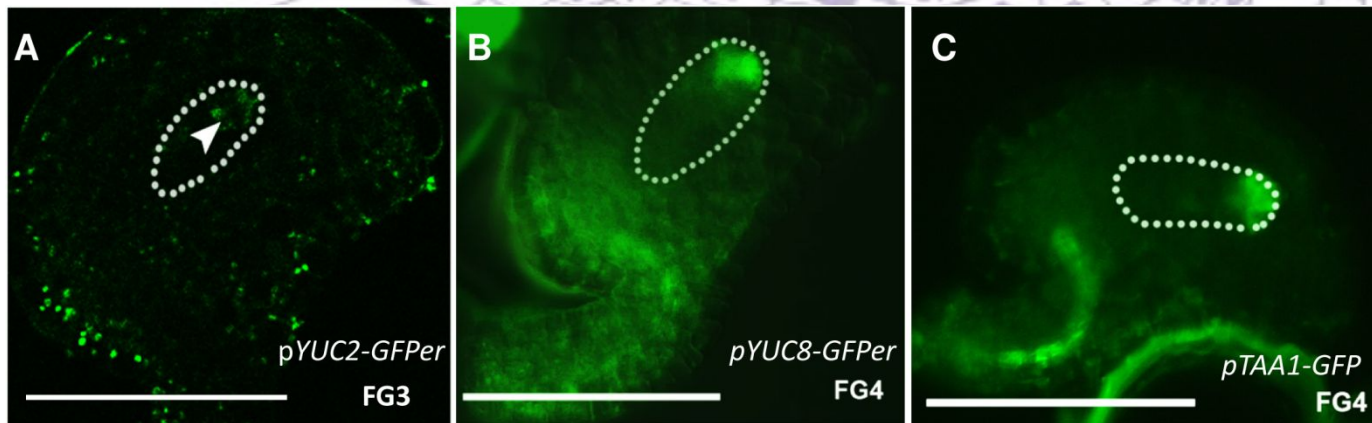
- До митозов ауксин в больших количествах присутствовал в нуцеллусе, но его не было в функциональной мегароспоре.
- В интервале стадий от 2 до 8 ядер ауксин все в больших количествах накапливался в микропиллярном конце зародышевого мешка, где должны сформироваться синергиды.
- После целлюляризации распределение ауксина в



Ауксиновый градиент

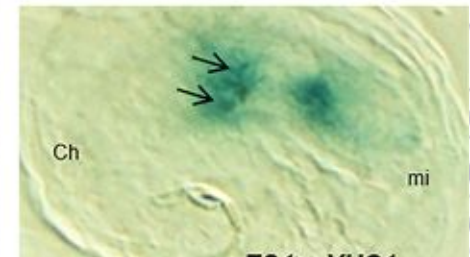
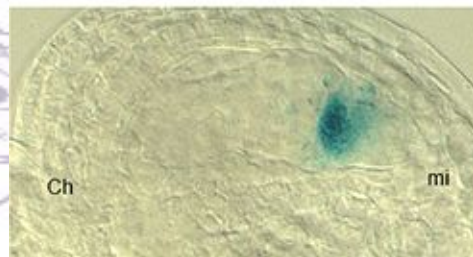
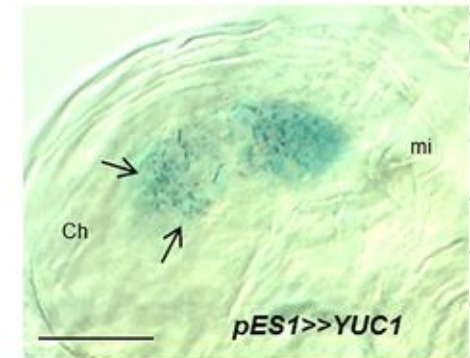
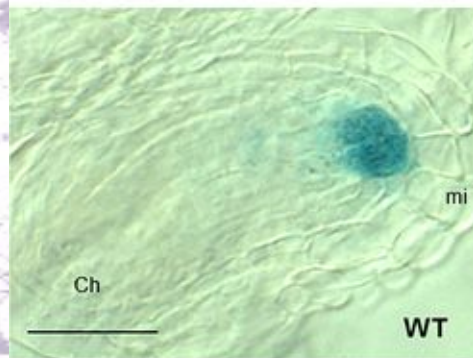
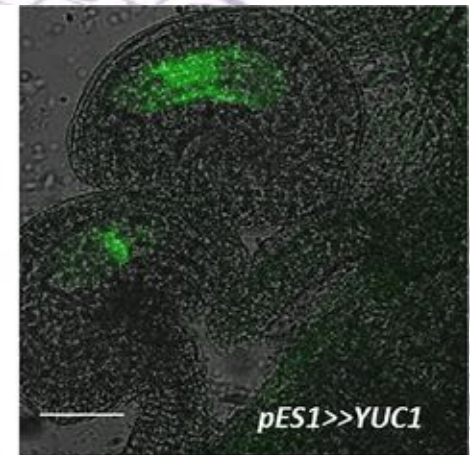
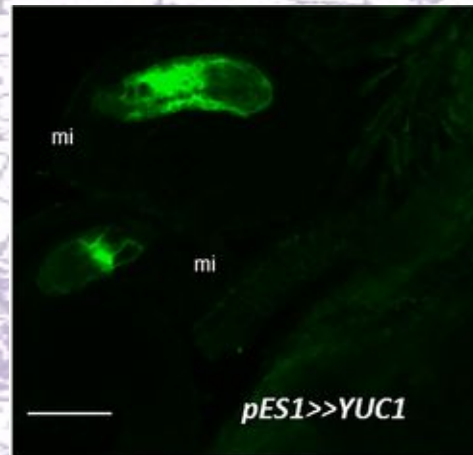


- Ауксиновый градиент был обнаружен в нормальных зародышевых мешках
- Гетерогенный синтез ауксина
- Полярное распределение переносчиков ауксина
- При нарушении градиента спецификация ЗМ проходила аномально



Мутанты

- У мутантов с избыточным биосинтезом ауксина (оверэкспрессия гена *YUC1*) расположение ядер в зародышевом мешке было правильным, но нарушалась спецификация клеток, а именно: маркеры, специфичные для синергид и яйцеклетки выявлялись и в других клетках зародышевого мешка

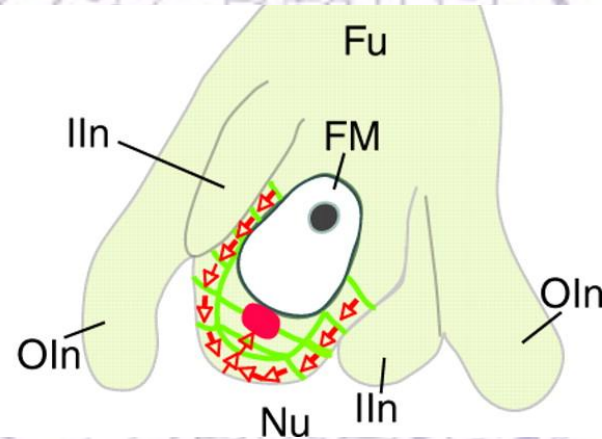
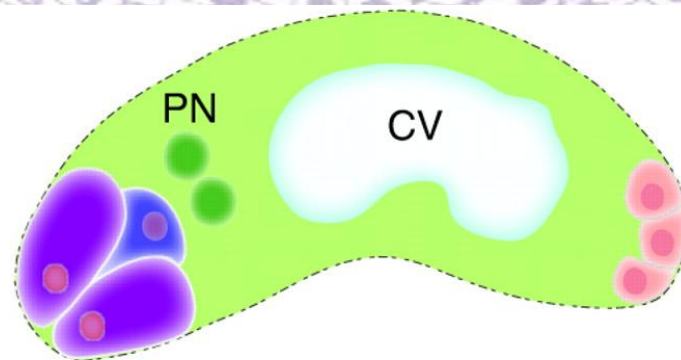
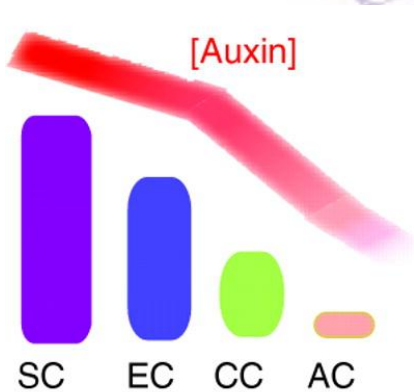


Parikh AK, Krol IV, Alandete-Saez M, Simon M, Neff C, et al. (2015) Auxin Import and Local Auxin Biosynthesis Are Required for Mitotic Divisions, Cell Expansion and Cell Specification during Female Gametophyte Development in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 10(5): e0126164. doi:10.1371/journal.pone.0126164

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=info:doi/10.1371/journal.pone.0126164>

Мутанты

- При выключении ауксин-зависимых транскрипционных факторов синергиды в ЗМ не появлялись, концентрация ауксина «дотягивала» только до ЯК.
- В модель вписали локальный «источник ауксина», к которому гормон стекается с двух сторон

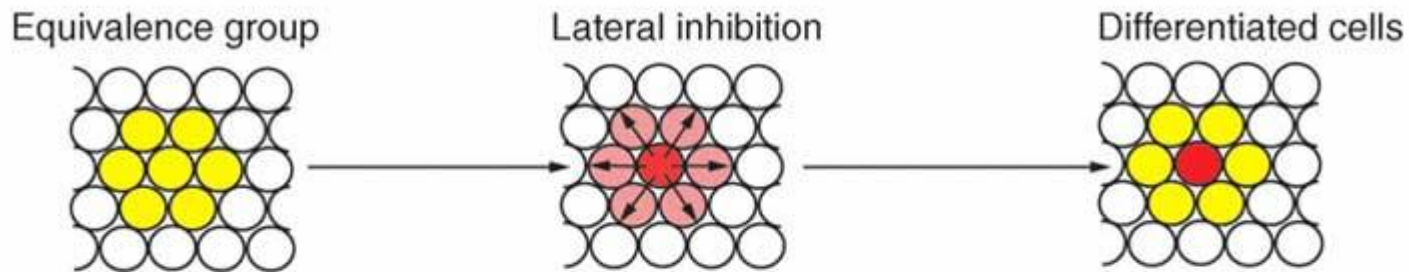


Межклеточные взаимодействия в зародышевом мешке

- Обнаружены три гена, контролирующие судьбу клеток женского гаметофита после целлюляризации: *LACHESIS (LIS)*, *GAMETOPHYTIC FACTOR1/CLOTNO (GFA1/CLO)* и *ATROPUS (ATO)*.
- Они нужны для того, чтобы в зародышевом мешке было всего две гаметы – яйцеклетка и центральная клетка – и не больше.
- Мутации в этих генах приводят к нарушениям идентичности клеток зародышевого мешка после того, как произошла их правильная спецификация.
- У мутантов *lis*, *gfa1/clo* и *ato* клетки, специализированные как синергиды, экспрессировали маркеры, специфичные для яйцеклетки, а антиподальные клетки экспрессировали маркеры центральной клетки.
- На основе этих данных было постулировано участие механизма **латерального ингибирования** в определении судьбы клеток зародышевого мешка.

Латеральное ингибирование

- такой тип межклеточных взаимодействий, в ходе которого клетка, судьба которой определилась, не позволяет соседним клеткам определить свою судьбу таким же



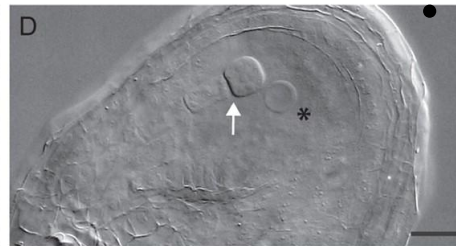
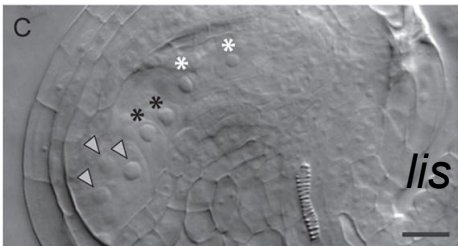
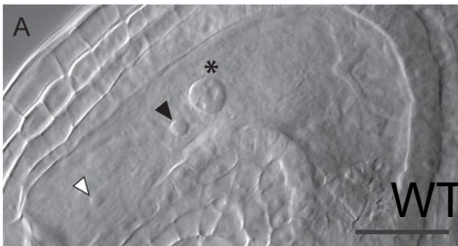
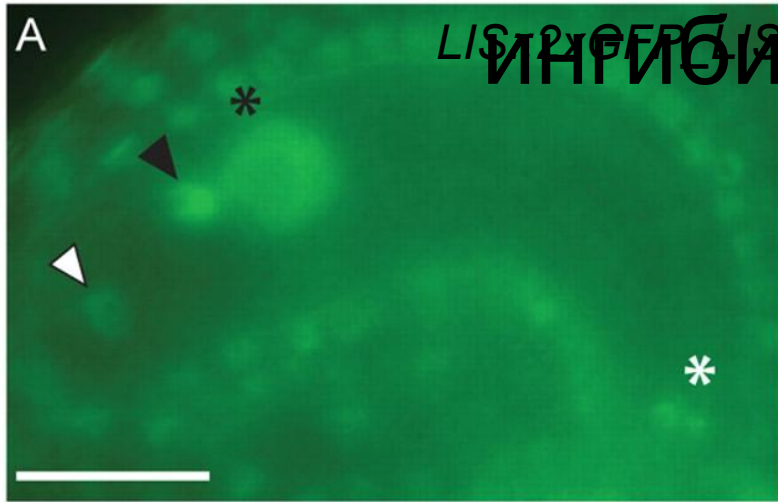
- после первичной спецификации клеток зародышевого мешка яйцеклетка и центральная клетка удерживают синергиды и антиподы от превращения в гаметы.

Мутант по латеральному ингибированию

Белок LIS в норме локализован только в гаметах: яйцеклетке и центральной клетке.

- Женский гаметофит *lis* имеет увеличенные и неполяризованные ядра синергид, неотличимые от яйцеклетки. Полярные ядра не сливаются. Эндосперм после оплодотворения не развивается.

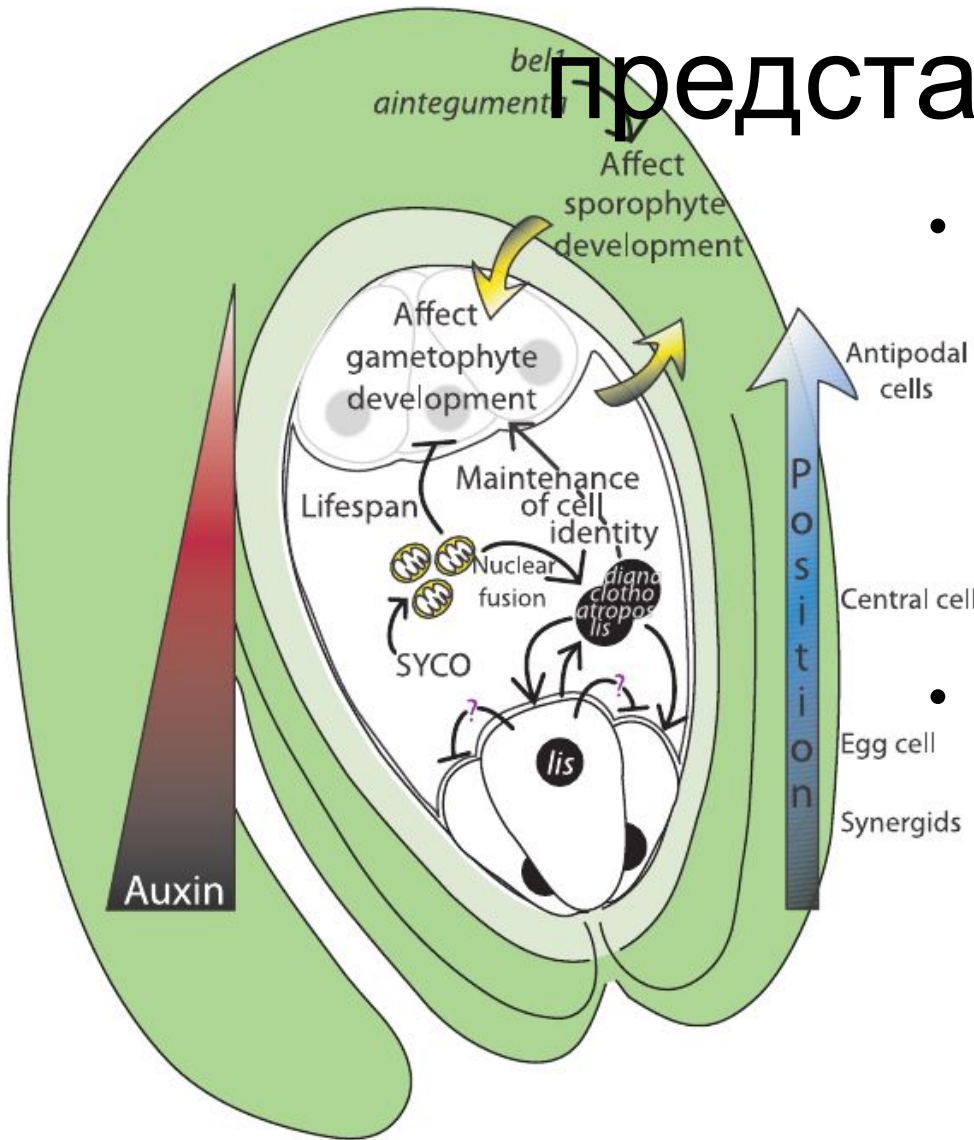
LIS-зависимый сигналинг можно рассматривать как защитный механизм, который запрещает развитие питающей ткани в отсутствие функциональной яйцеклетки.



Ronny Völz et al. Development 2012;139:498-502

Как это себе

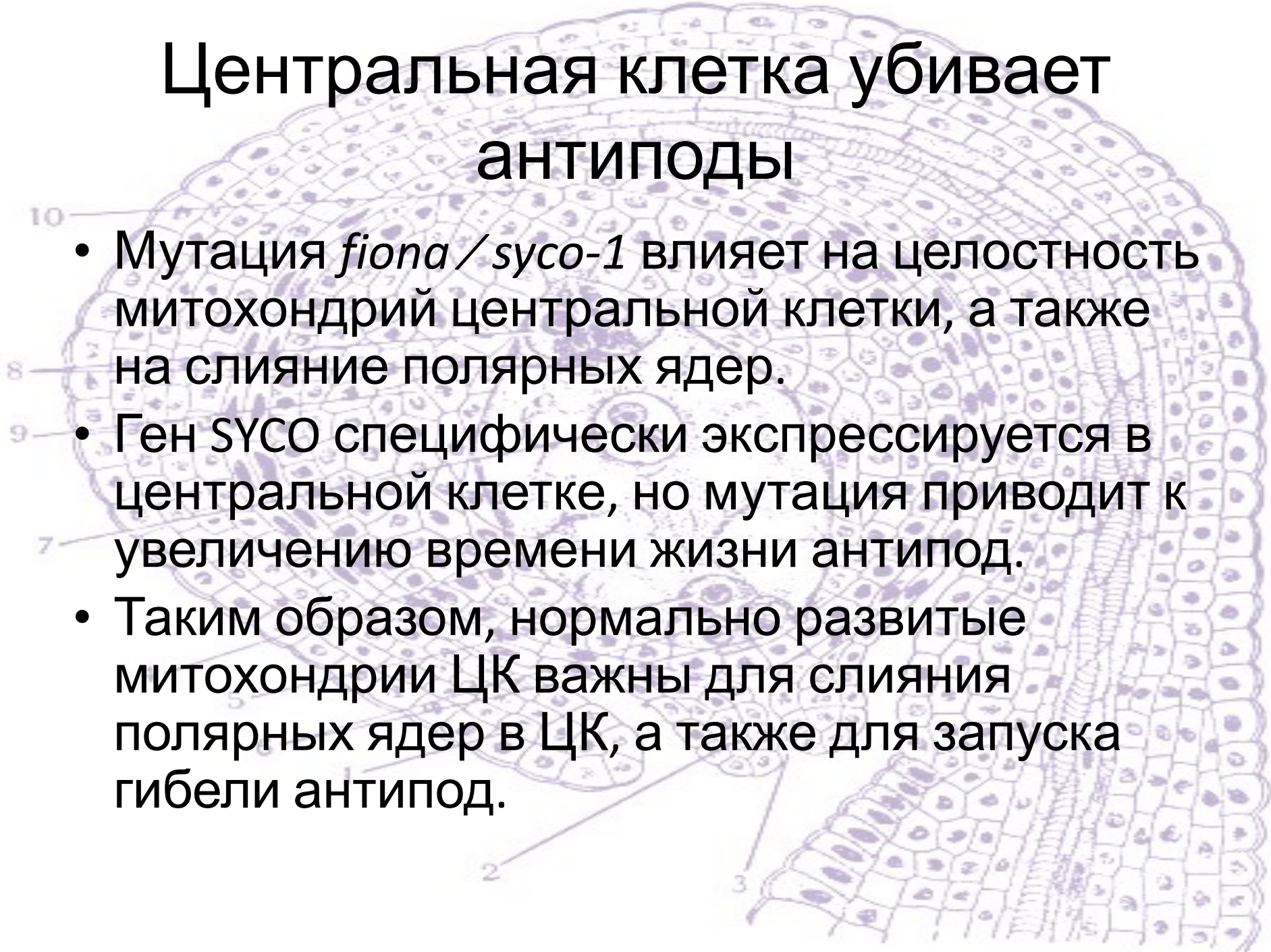
представляют?



- Гены, ответственные за латеральное ингибирование, являются компонентами сплайсосомы, их взаимодействие приводит к локализации комплекса в ядре.
- Поскольку они экспрессируются в гаметах, сплайсосома, по-видимому, участвует в процессинге специфичных генов, напрямую или косвенно производящих сигнал для окружающих «негаметных» клеток.

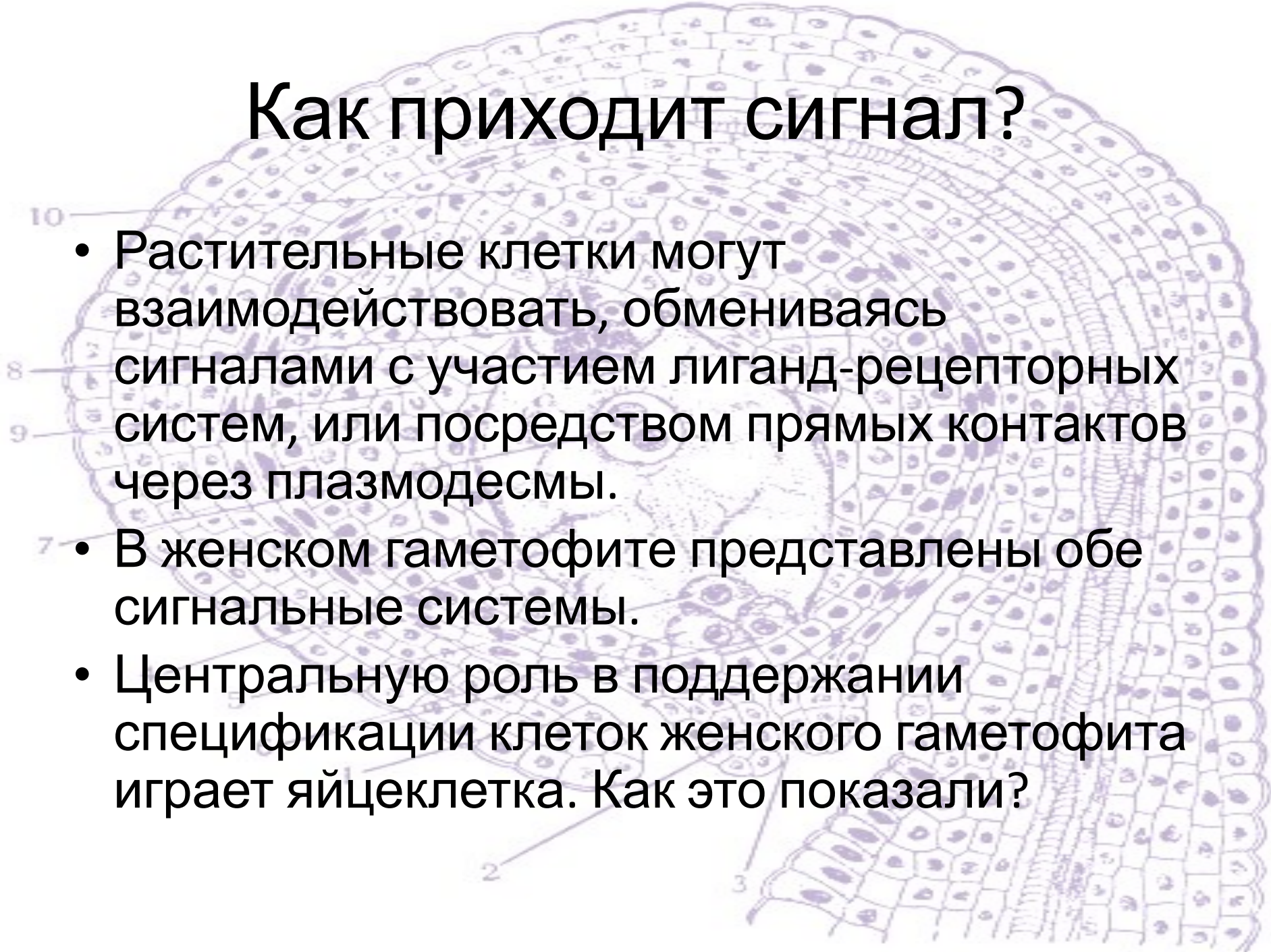
Центральная клетка убивает антиподы

- Мутация *fiona / syco-1* влияет на целостность митохондрий центральной клетки, а также на слияние полярных ядер.
- Ген *SYCO* специфически экспрессируется в центральной клетке, но мутация приводит к увеличению времени жизни антипод.
- Таким образом, нормально развитые митохондрии ЦК важны для слияния полярных ядер в ЦК, а также для запуска гибели антипод.



Как приходит сигнал?

- Растительные клетки могут взаимодействовать, обмениваясь сигналами с участием лиганд-рецепторных систем, или посредством прямых контактов через плазмодесмы.
- В женском гаметофите представлены обе сигнальные системы.
- Центральную роль в поддержании спецификации клеток женского гаметофита играет яйцеклетка. Как это показали?



Главная – яйцеклетка

- Это наглядно показали эксперименты, в которых с помощью РНК-интерференции избирательно снижали число транскриптов гена *LIS* в тех или иных клетках зародышевого мешка.
- Если мишенью были синергиды, центральная клетка или антиподы, это не сказывалось на развитии зародышевого мешка.
- Однако воздействие на яйцеклетку вызывало существенные нарушения морфологии женского гаметофита и снижало его

Что за сигнал? Возможно,

пептиды

- Химическая природа сигналов, продуцируемых яйцеклеткой и центральной клеткой *Arabidopsis*, неизвестна.
- Однако при исследовании женского гаметофита кукурузы был идентифицирован секреторный пептид ZmEAL1, который продуцирует только яйцеклетка.
- Этот пептид упаковывается в везикулы и отправляется в халазальный конец зародышевого мешка, где он предотвращает превращение антипод в центральные клетки.
- Каким образом антиподы воспринимают и трансдуцируют эти сигналы, неизвестно. Важно подчеркнуть, что яйцеклетка

