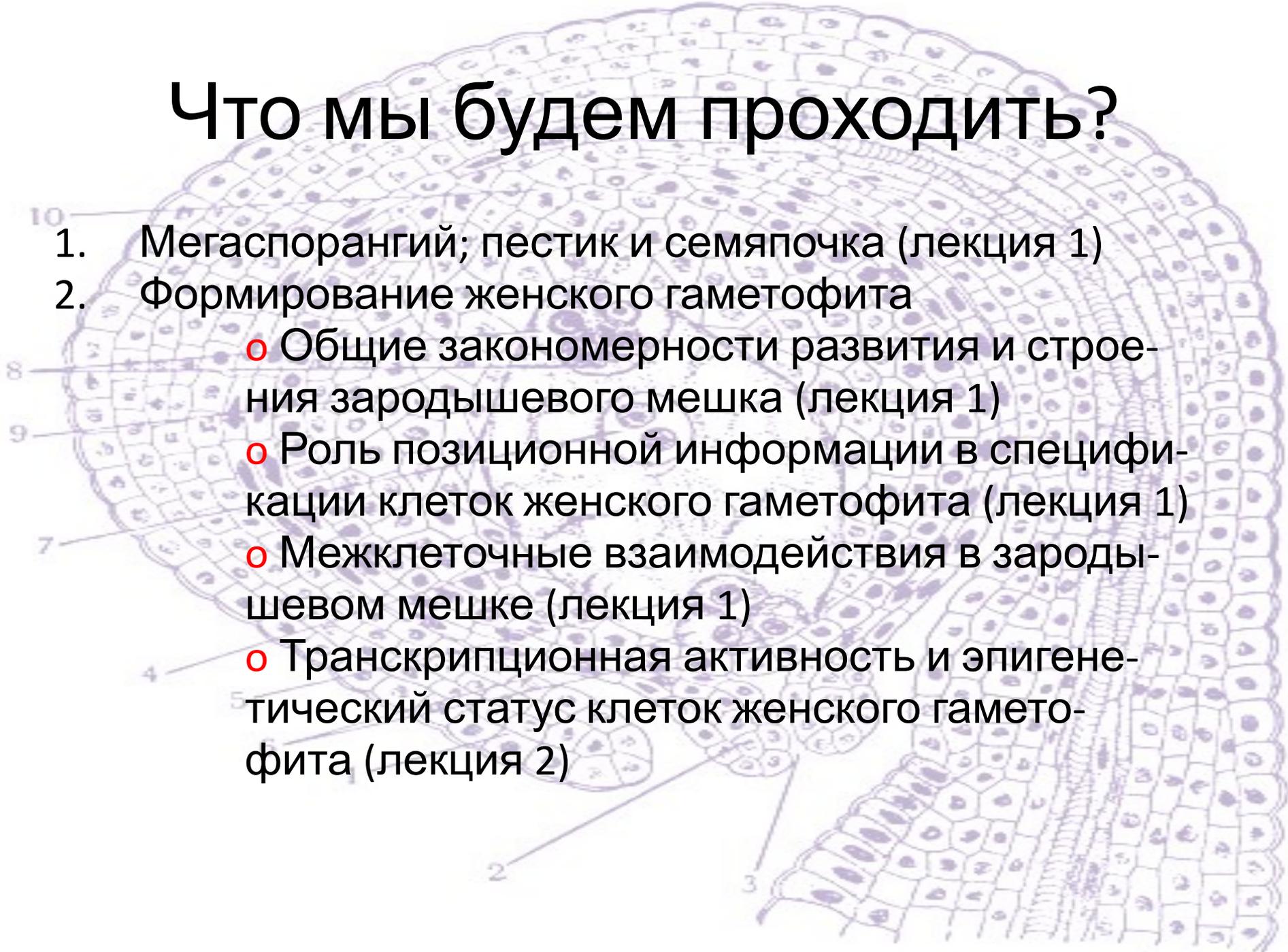


# Мегагаметофит

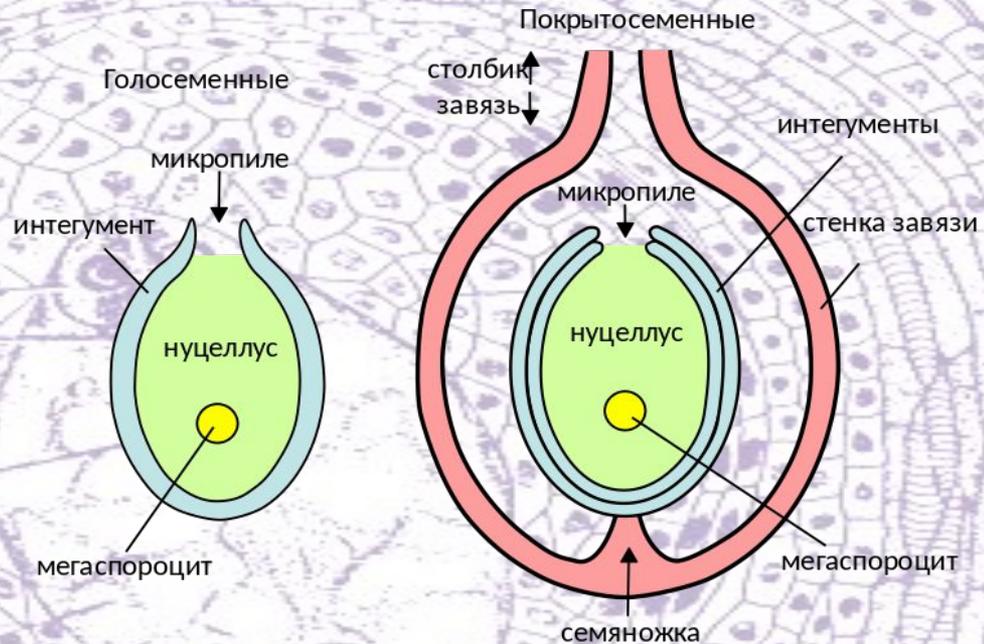
Лекция 1. О женском...



# 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)
- 

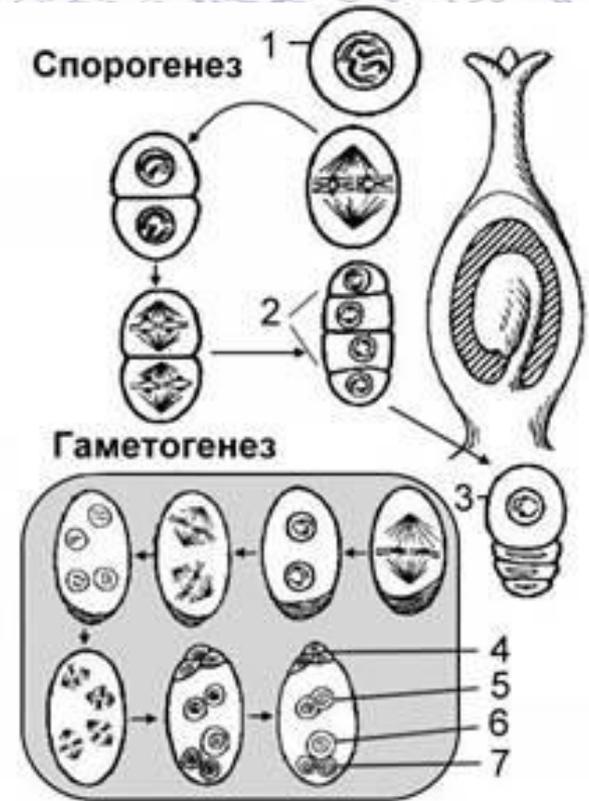
# Мегаспорангий



- 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

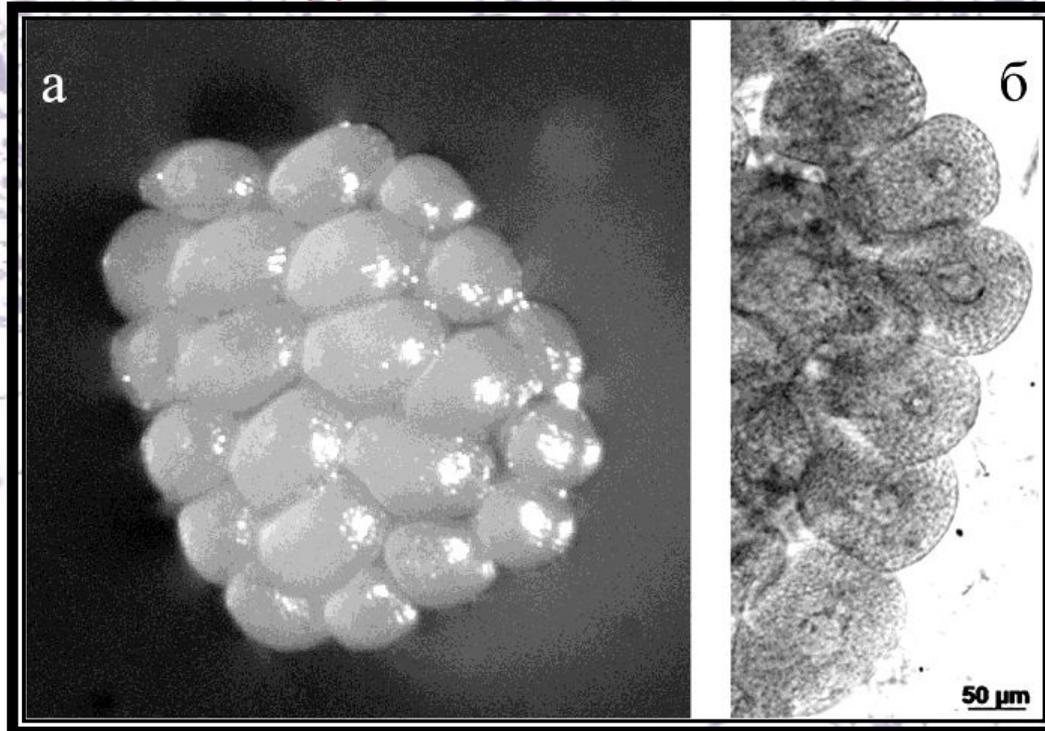
# Мегаспороцит

- 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

- Семязачаток, или семяпочка (лат. ovulum), — образование у семенных растений, из которого после оплодотворения развивается семя.
- Семяпочки покрытосеменных растений образуются в женском репродуктивном органе цветка – **гинецее** («пестике»), который, в свою очередь, состоит из одного или нескольких **плодолистиков**.



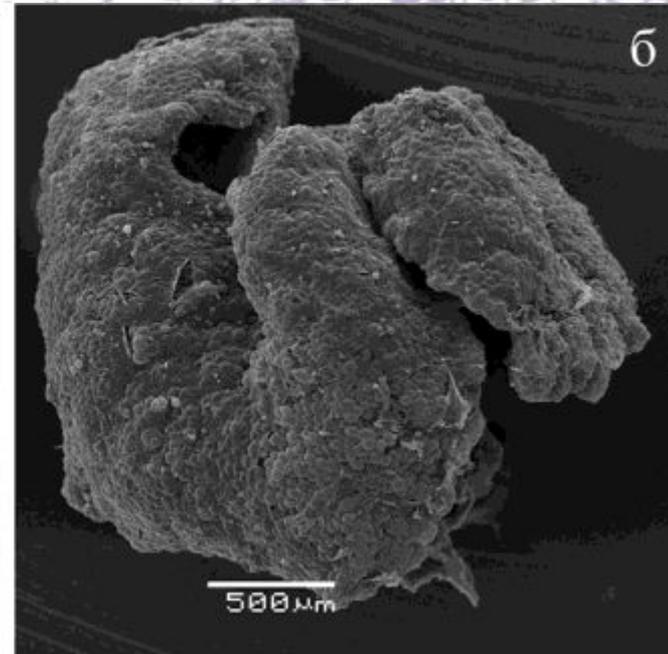
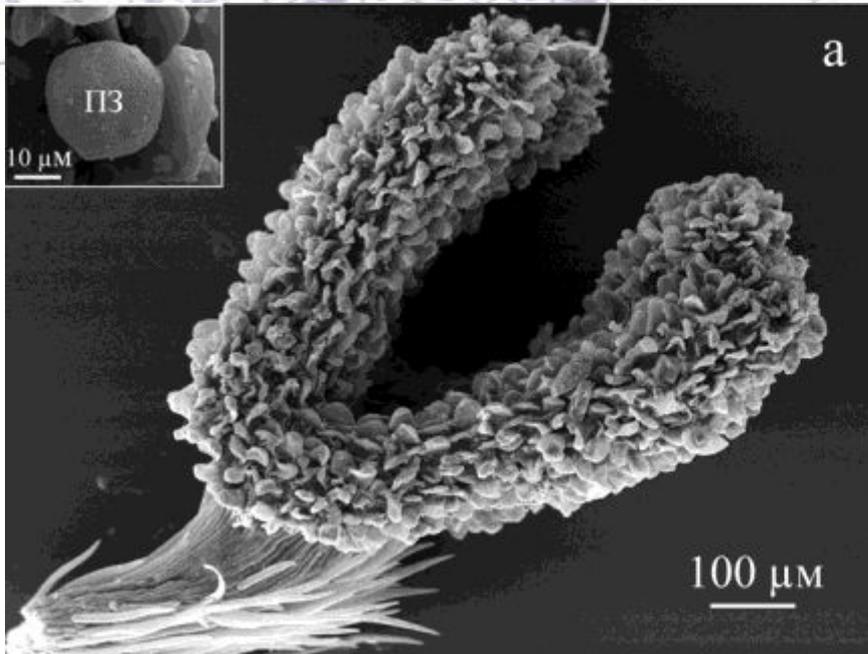
# Завязь и семяпочка



- **Завязь** – нижняя часть пестика. Внутри завязи развиваются **семяпочки**.
- Они закреплены 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 фуникулуcom.

# 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

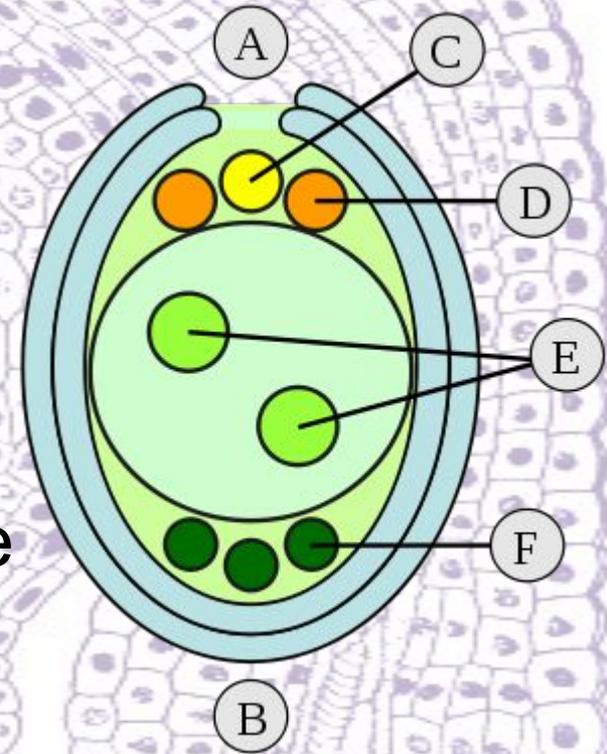
- Выделяют два главных типа рылец: **сухие** и **влажные**, в зависимости от наличия на их поверхности жидкого секрета.
- Сухое рыльце может выглядеть как гладкий купол (*Euphorbia*), но чаще оно покрыто одноклеточными или многоклеточными папиллами (Brassicaceae, Gramineae и Compositae). Пыльцевое зерно 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)

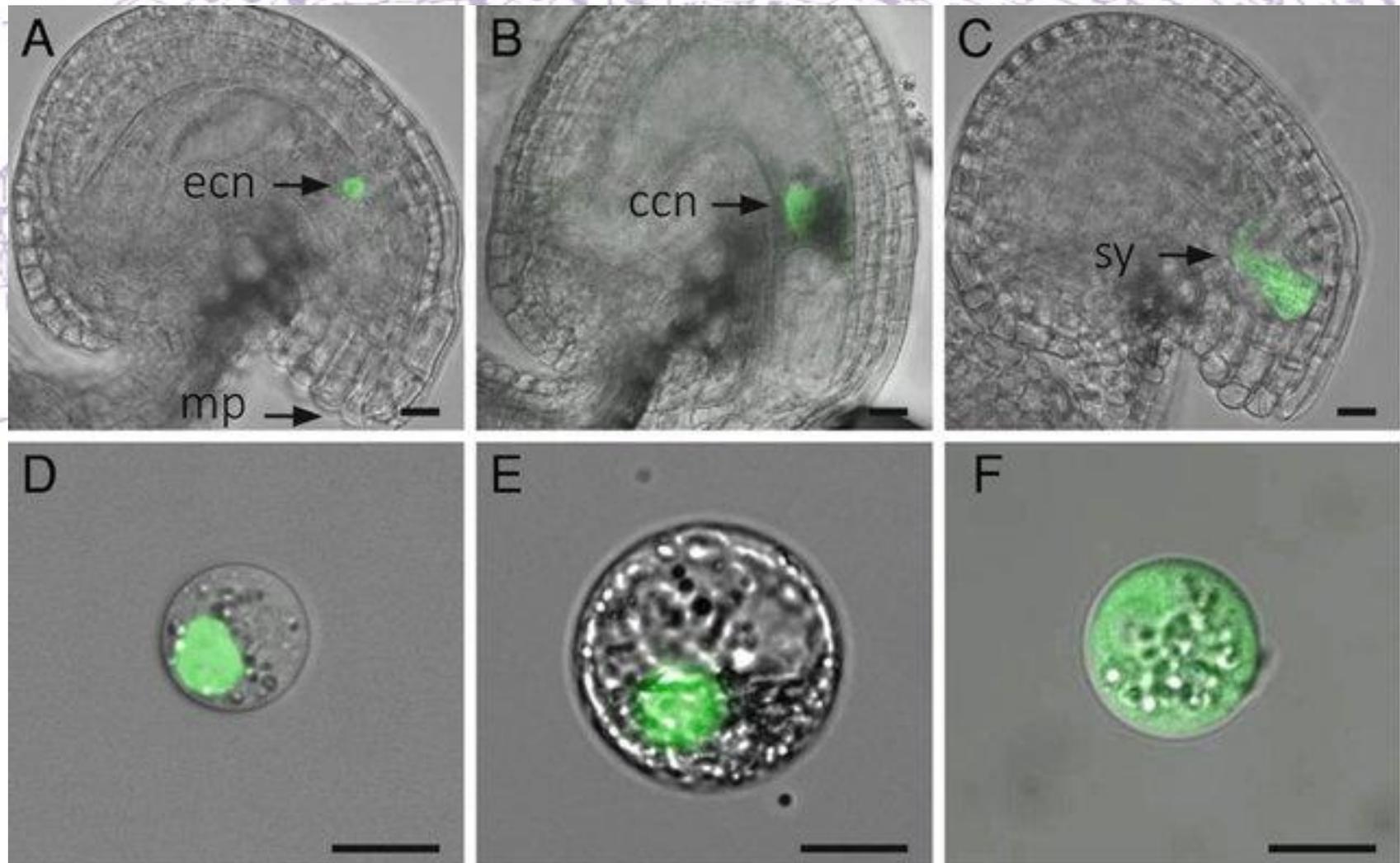


# Как работать с мегагаметофитом?

- 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 мацерация



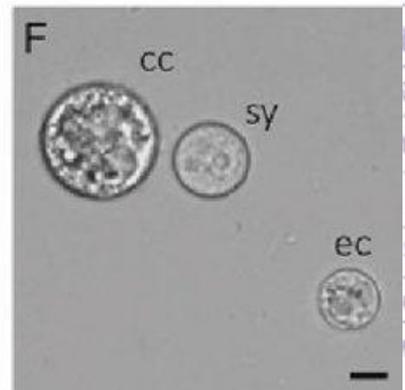
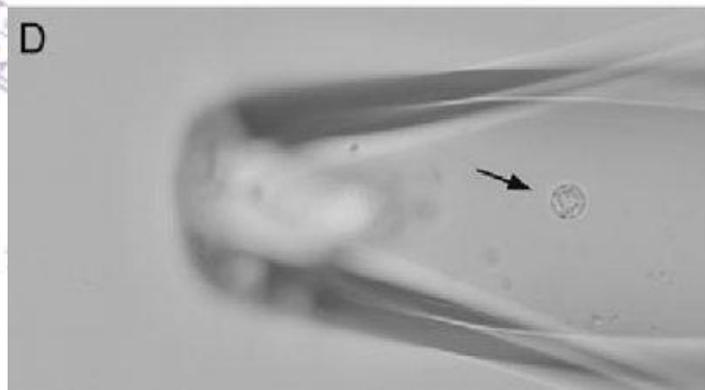
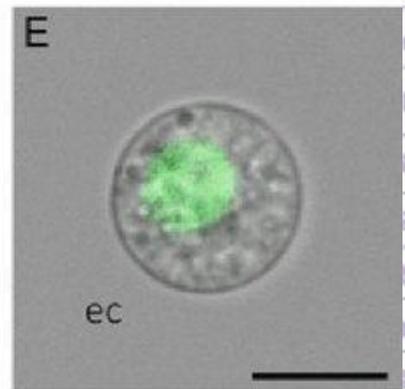
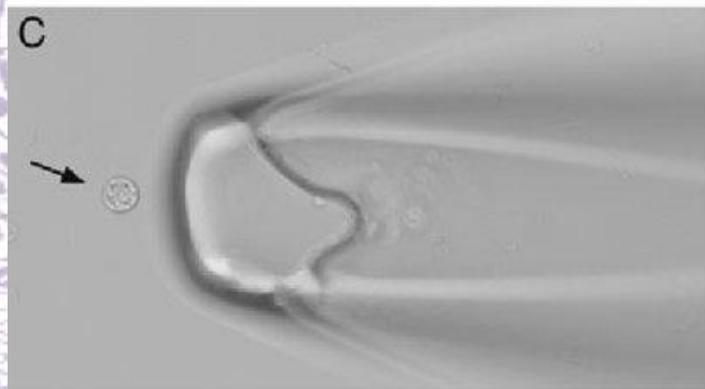
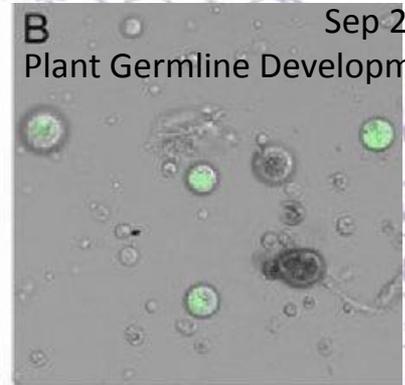
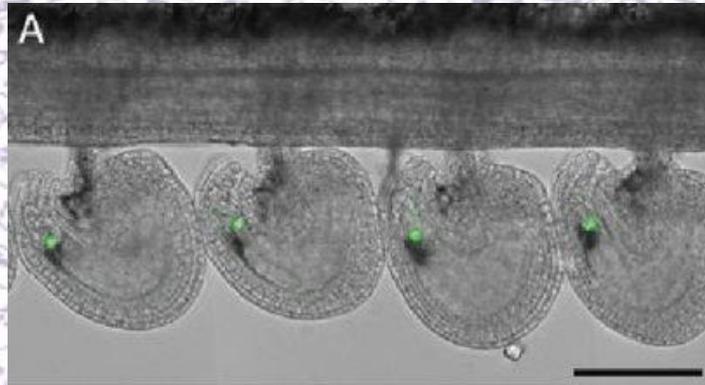
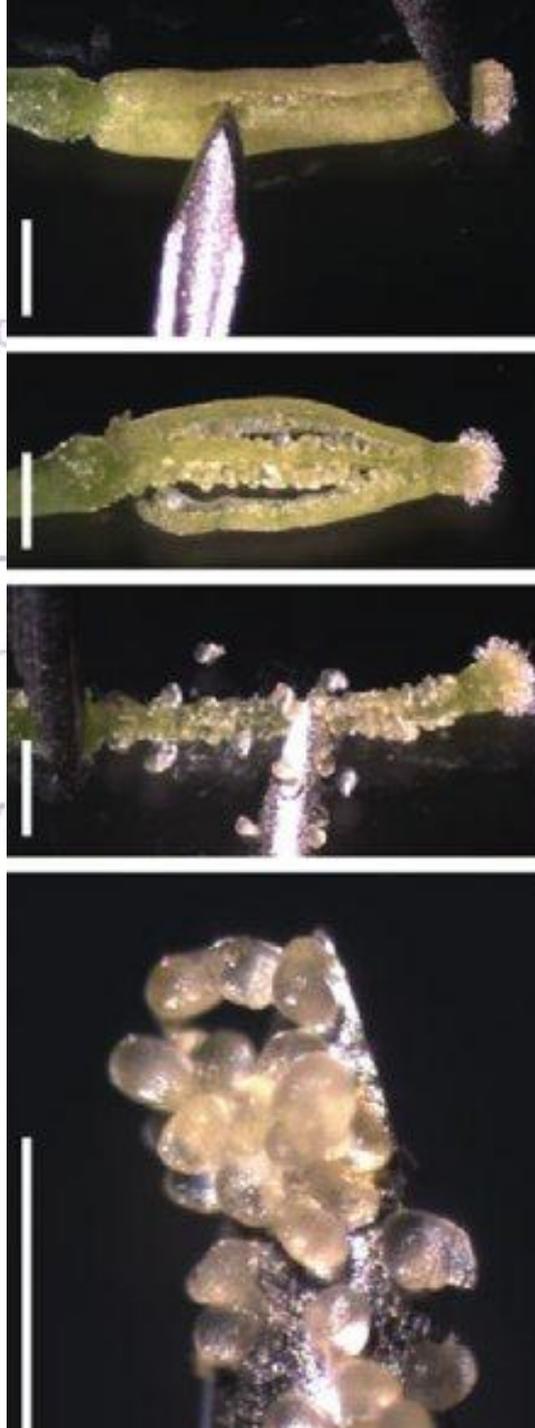
# Выделение гаплоидных клеток



# Микроманипуляции

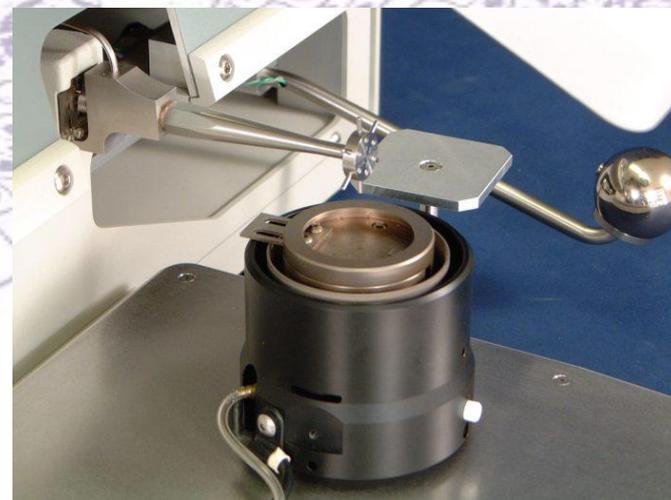
[Manual Isolation of Living Cells from the Arabidopsis thaliana Female Gametophyte by Micromanipulation](#)

Sep 2017  
Plant Germline Development



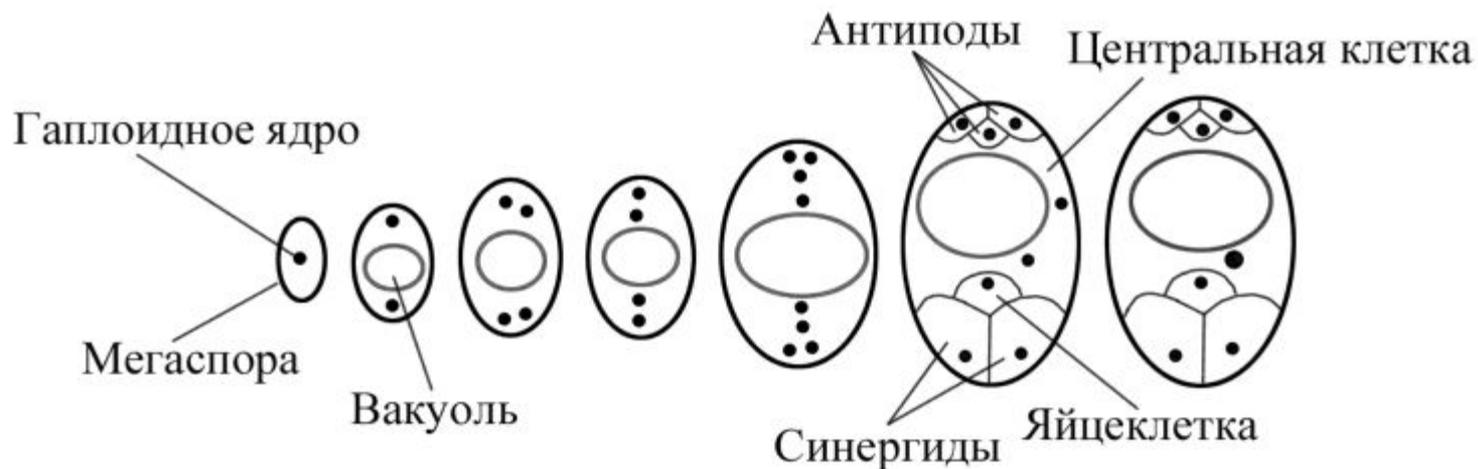
# Лазерная микродиссекция

- 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.

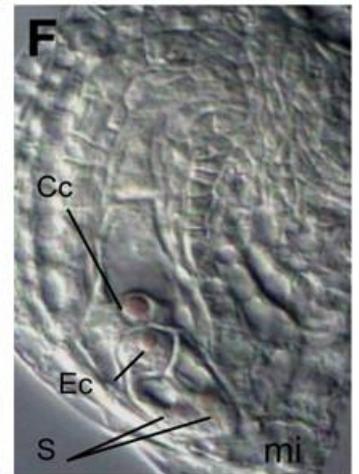
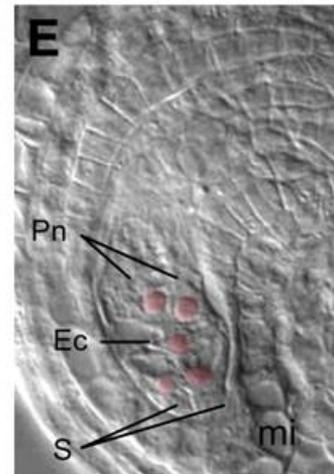
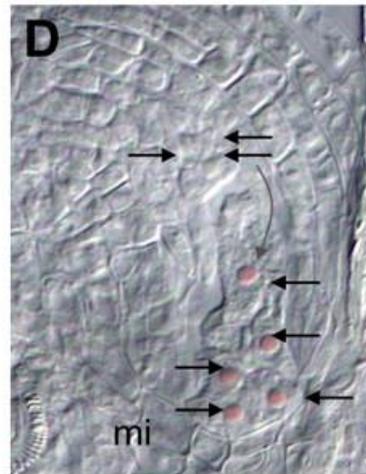
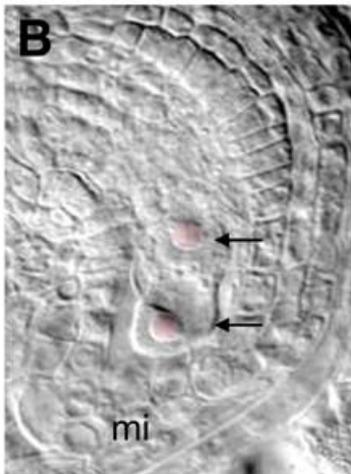
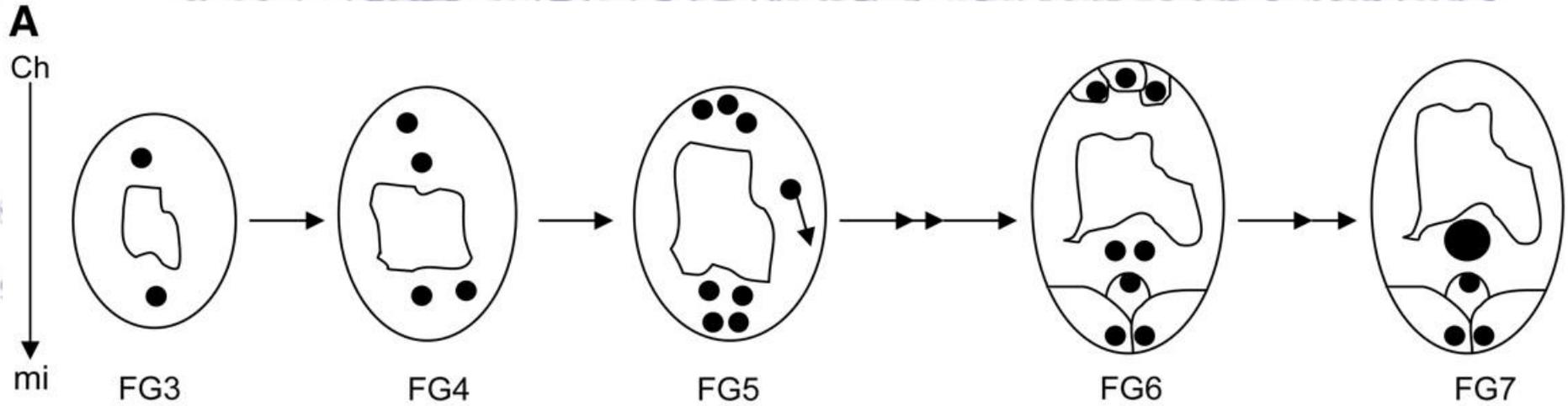


# Развитие мегаспорофита

- 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 женского гаметофита и сливаются.

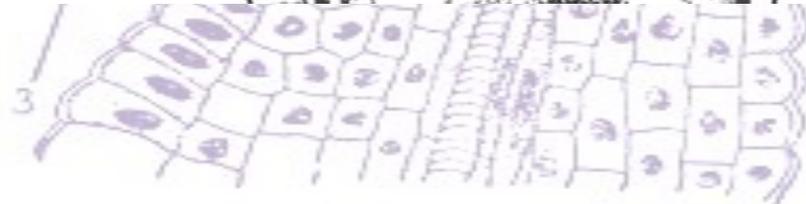
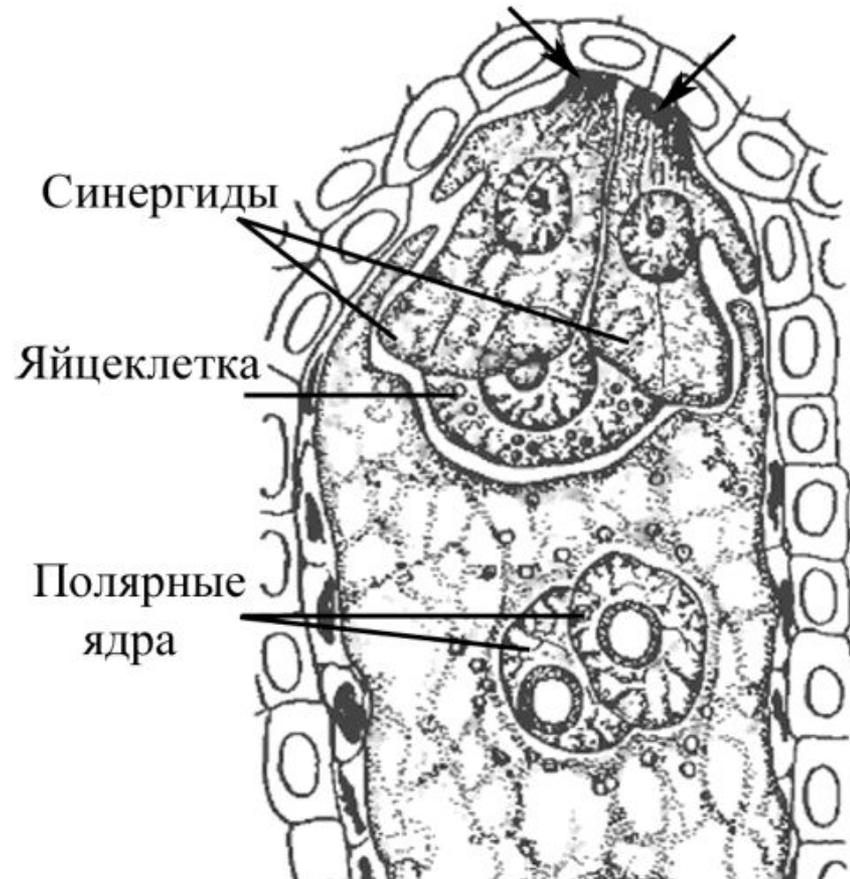


# Как это выглядит



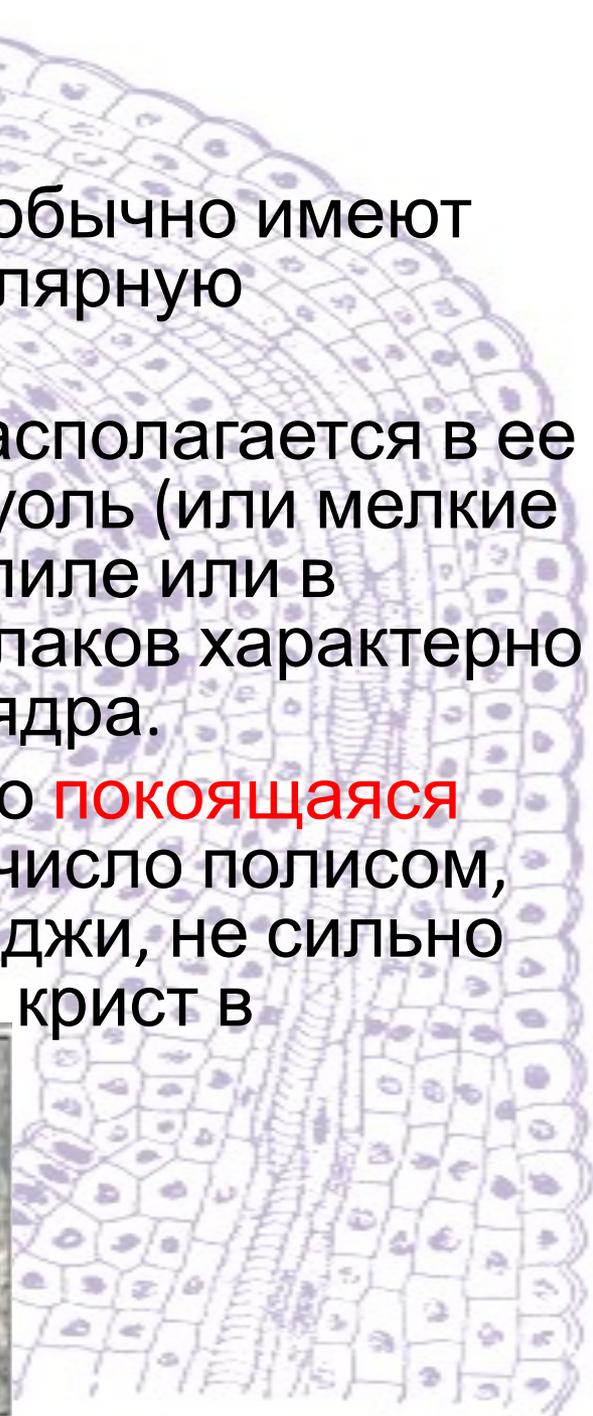
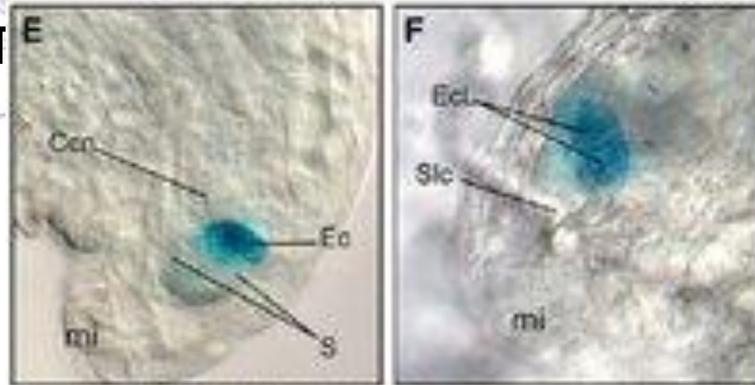
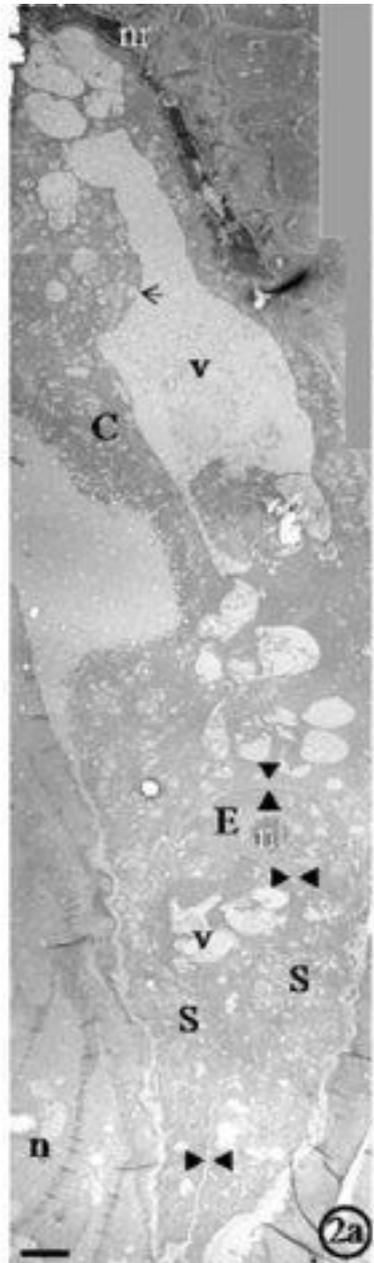
# Женский гаметный модуль

- 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 (MGU)

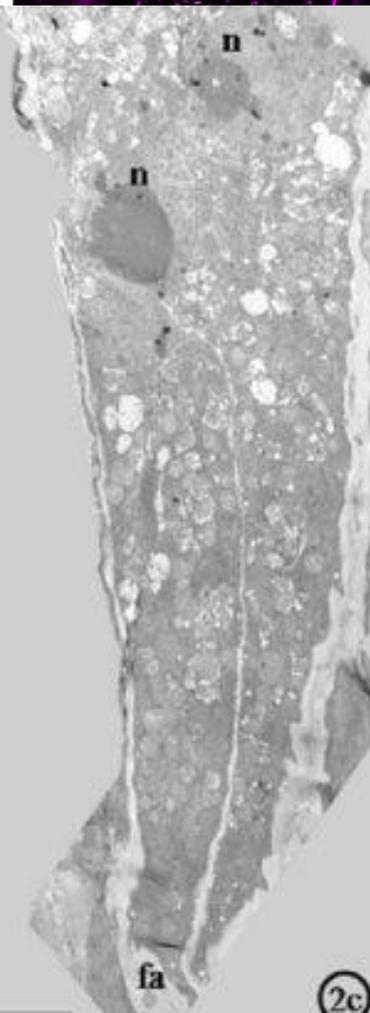
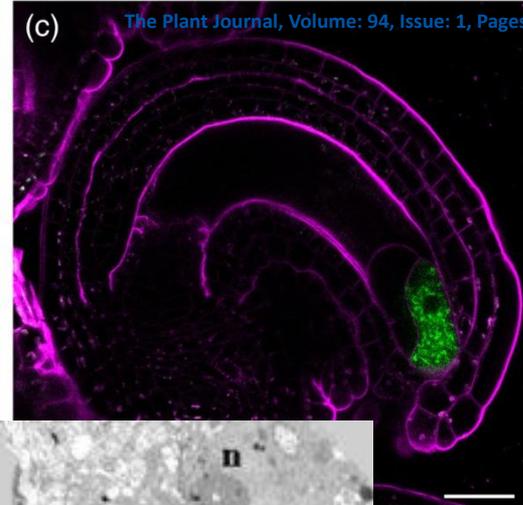


# Яйцеклетка

- 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 мит

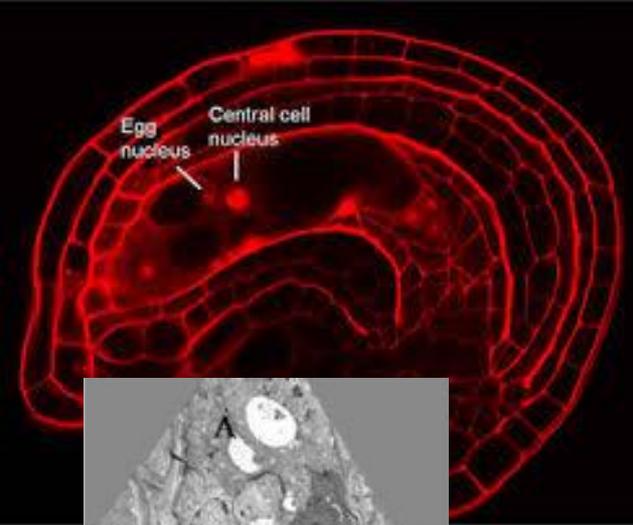


(c)



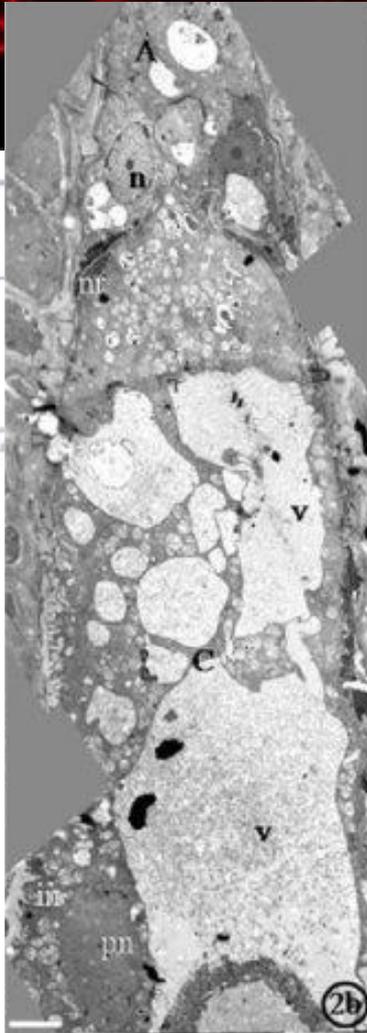
# Синергиды

- Полярность синергид обратная по отношению к яйцеклетке: ядро занимает центральную позицию, а вакуоль (вакуоли) смещены к халазальному концу.
- На микропиллярном 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.



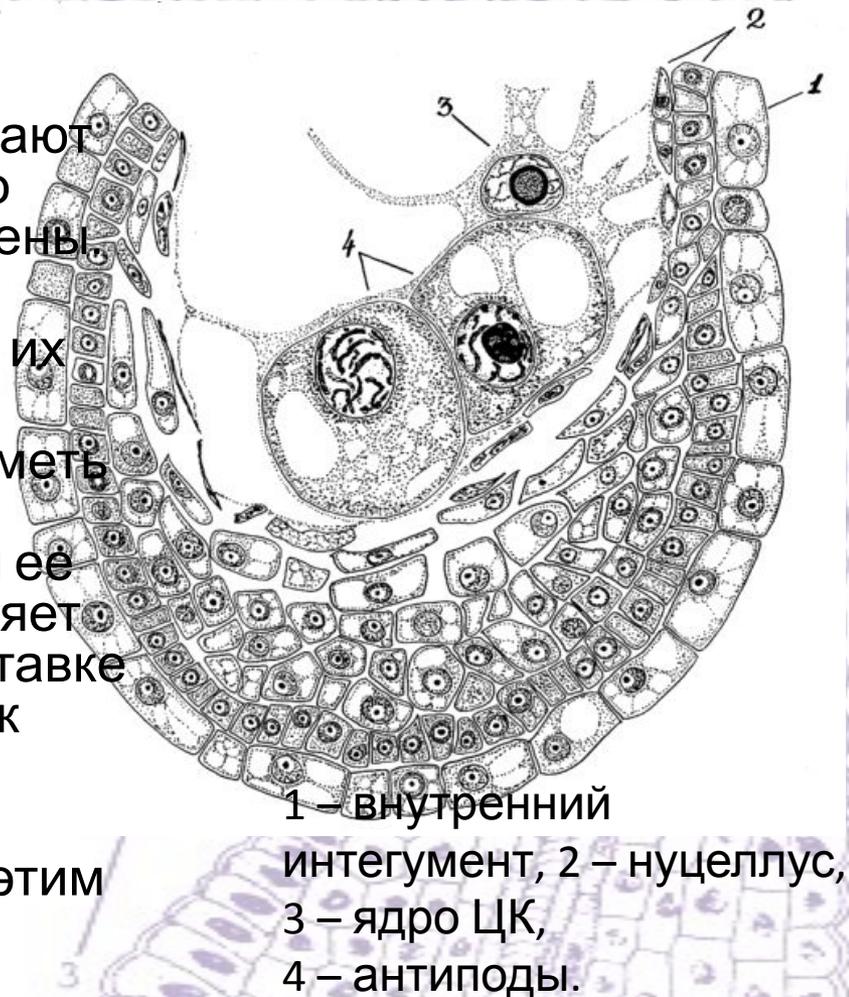
# Центральная клетка

- Центральная клетка сильно вакуолизирована и занимает большую часть ЗМ. 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

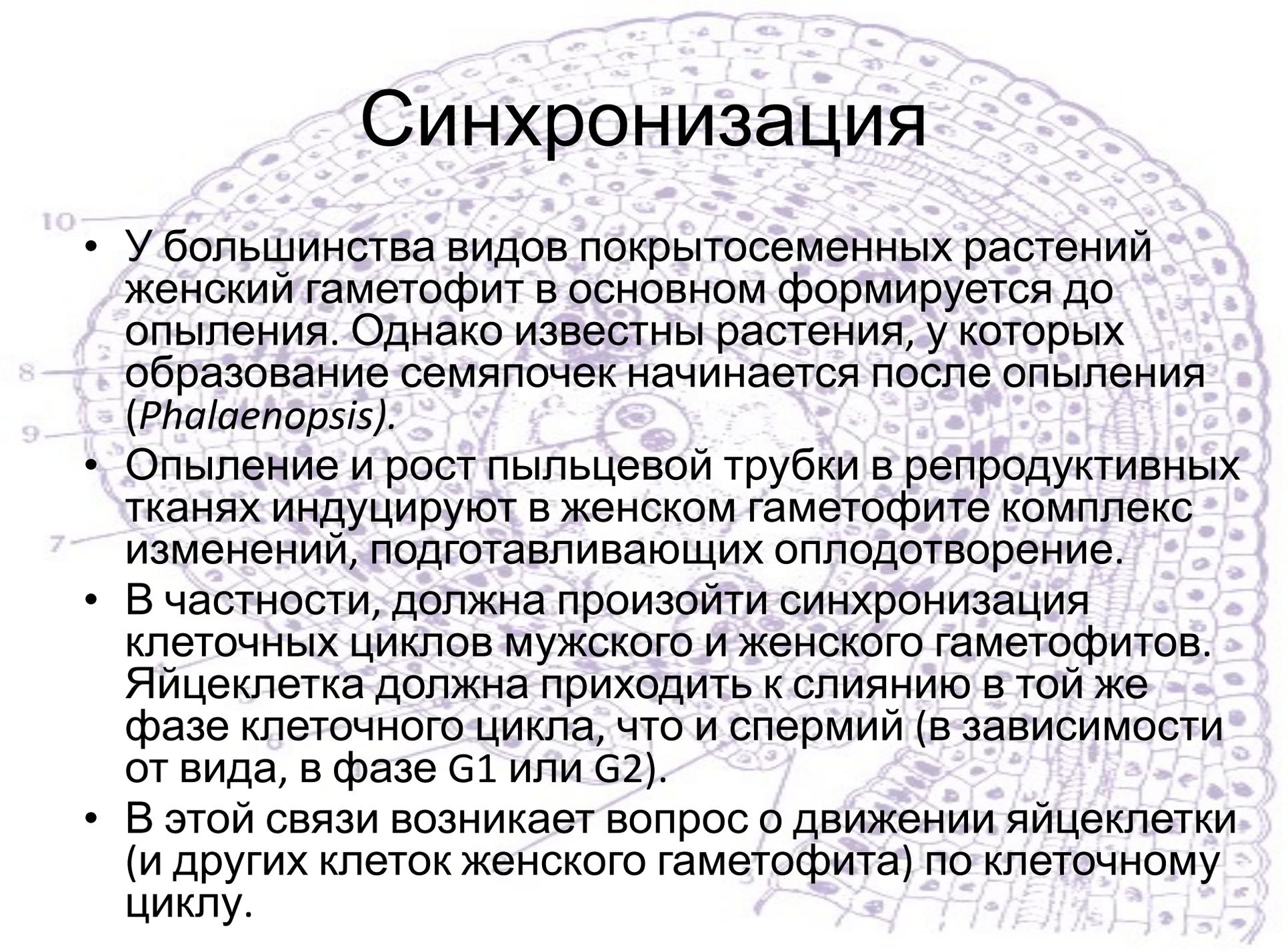


# Антиподы

- 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 этим не ограничиваются
- Они могут выступать как активно синтезирующие и, возможно, регуляторные клетки.



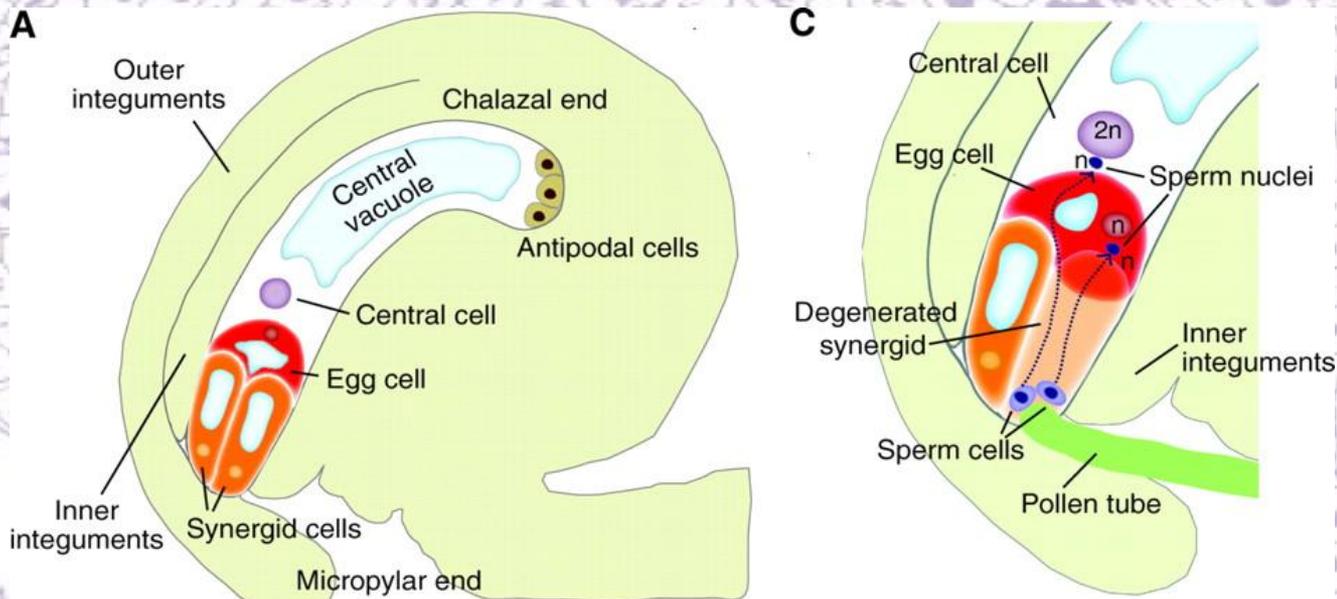
# Синхронизация

A detailed microscopic cross-section of a plant ovule, showing various cellular layers and a pollen tube. The image is labeled with numbers 7, 8, 9, and 10, indicating different anatomical regions. The pollen tube is visible as a central structure with a coiled wall, extending through the ovule.

- 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.

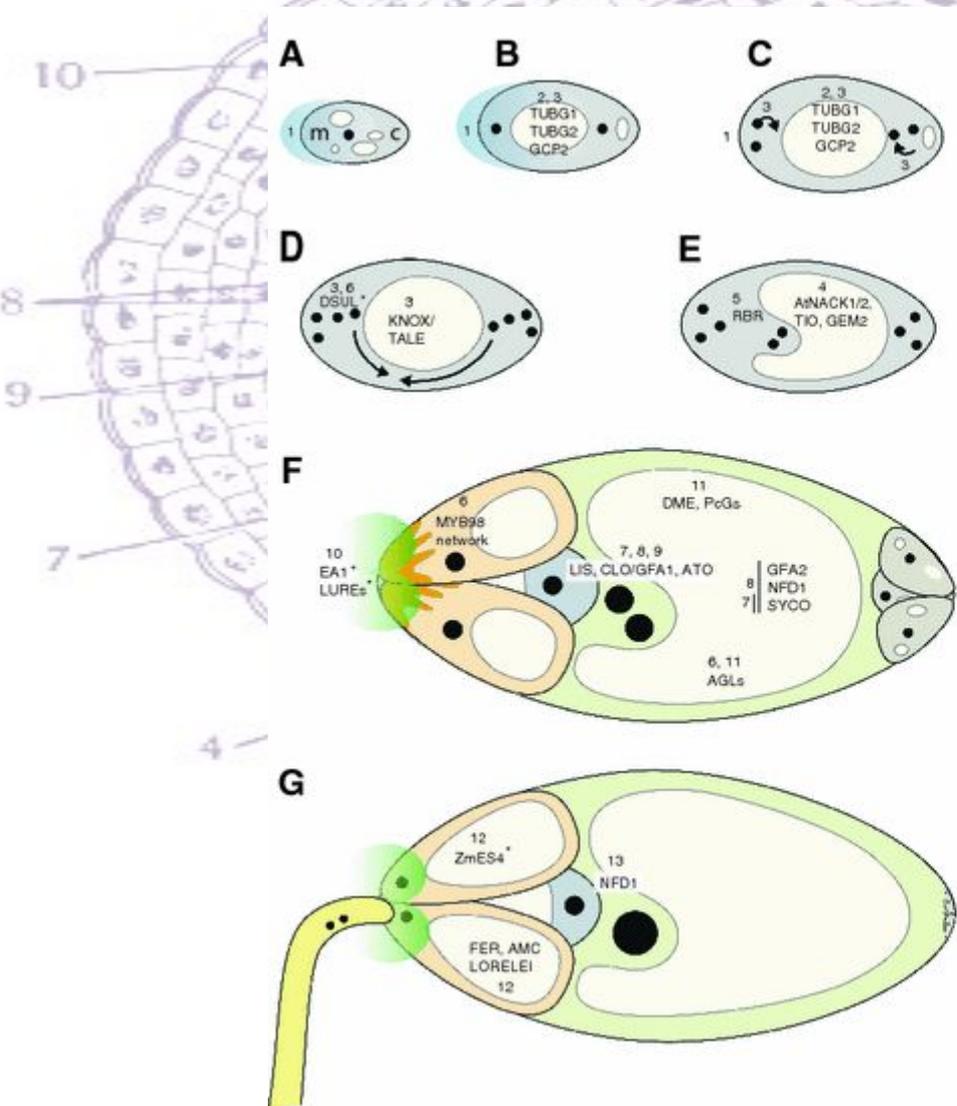
# Спецификация клеток

- 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 и гены



- 1 Establishment of a micropylar (m)-chalazal (c) axis (auxin as a potential morphogen)
- 2 Nuclear divisions (B-D)
- 3 Nuclei migration / positioning
- 4 Cellularization
- 5 Arrest of nuclear divisions

- 6 Establishment of cell specific molecular/morphological profiles
- 7 PCD of antipodals
- 8 Homotypic nuclei fusion
- 9 Separation of gametic and accessory cells
- 10 Generation of pollen tube attractant
- 11 Establishment of the epigenetic cc profile

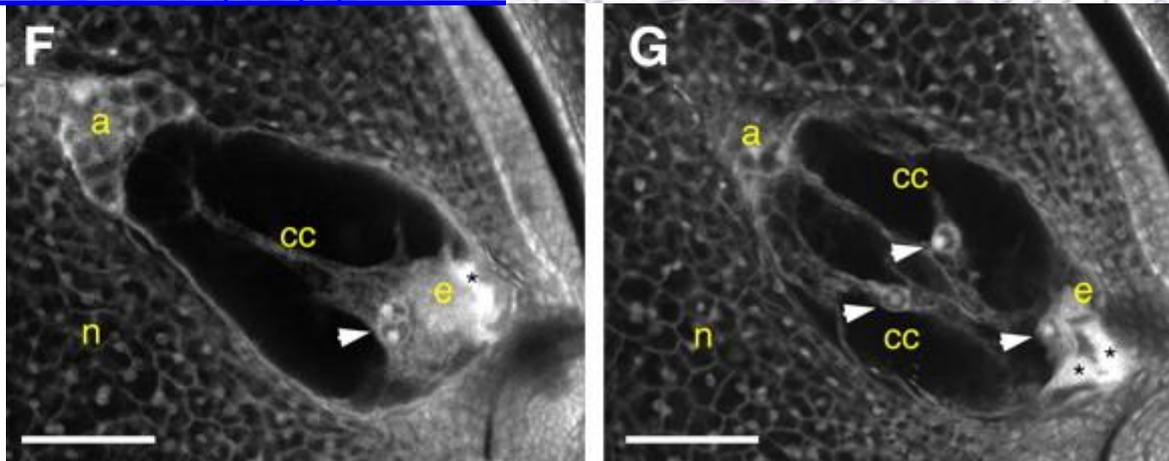
- 12 Pollen tube reception / pollen tube burst
- 13 Gamete fusion

# Мутанты по спецификации

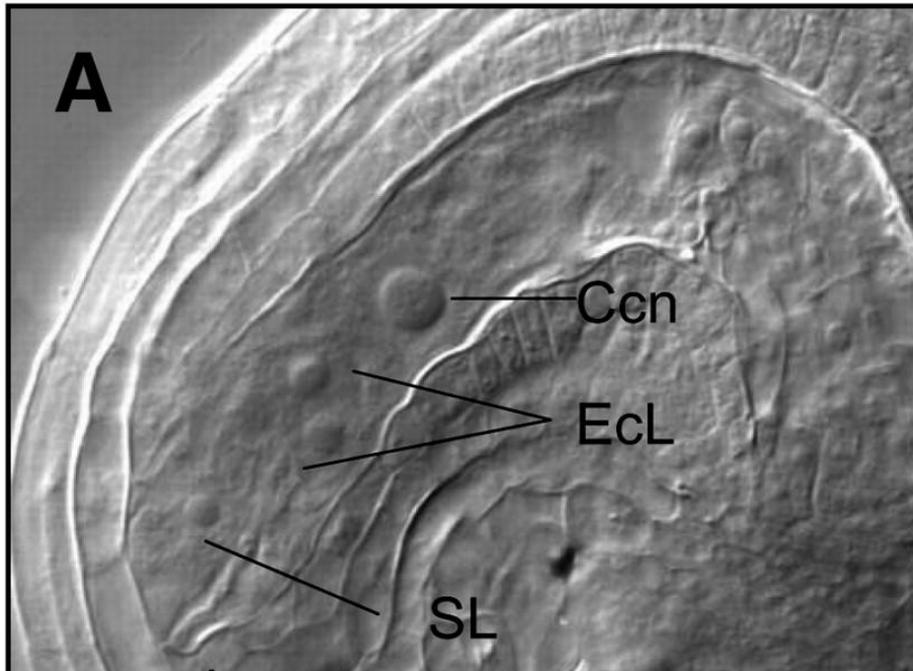
- Мутант кукурузы с избыточной пролиферацией ядер (*ig1, indeterminate gametophyte1*)
- Мутант *Arabidopsis* с нарушением клеточного цикла (*rbr1, retinoblastomarelated1*)

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.

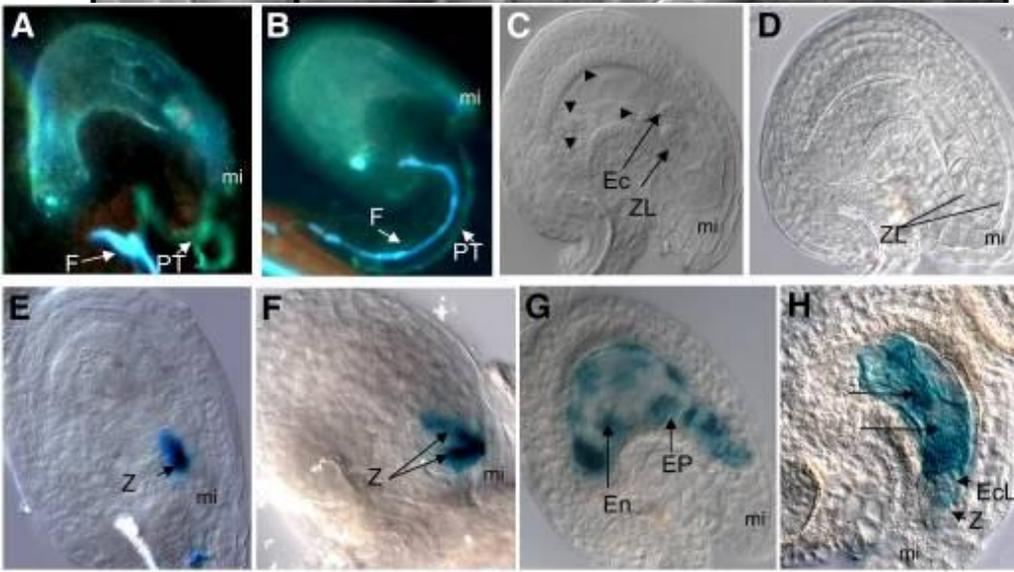
[Plant Cell. 2007 Jan; 19\(1\): 46–62.](#)



# Мутанты по спецификации



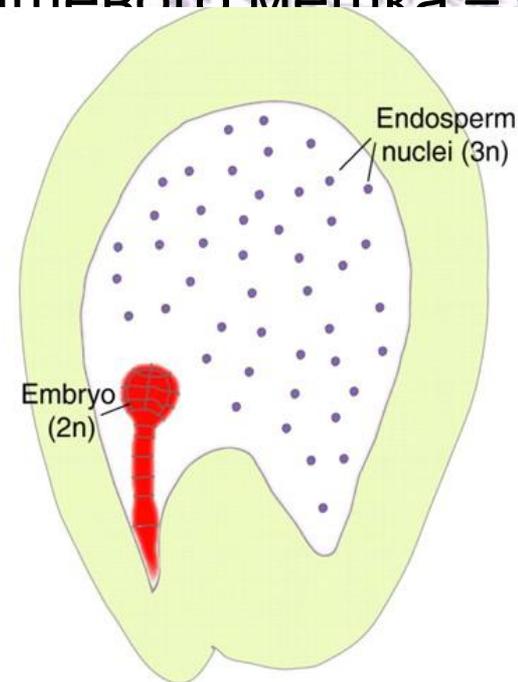
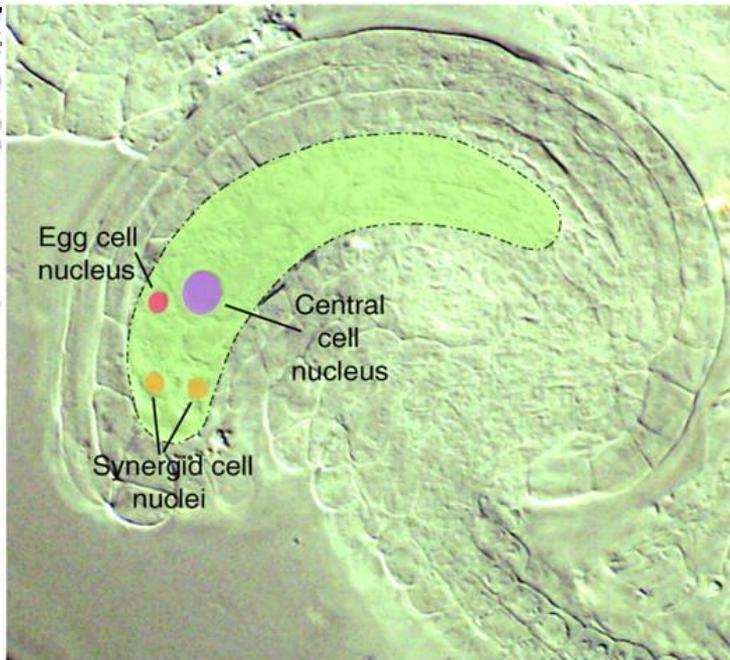
- У мутанта *Arabidopsis eostre* число ядер в зародышевом мешке нормальное, но на четырехядерной стадии нарушается процесс миграции ядер.
- На позиции, в норме соответствующей ядру яйцеклетки, у мутанта располагаются два ядра. После целлюляризации образуются две яйцеклетки, способные участвовать в оплодотворении.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



[Plant Cell. 2007 Nov; 19\(11\): 3578–3592.](#)

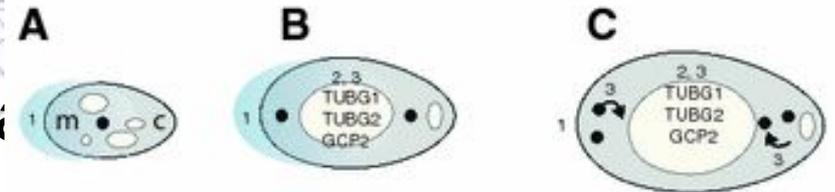
# Итак, что же в норме?

- 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



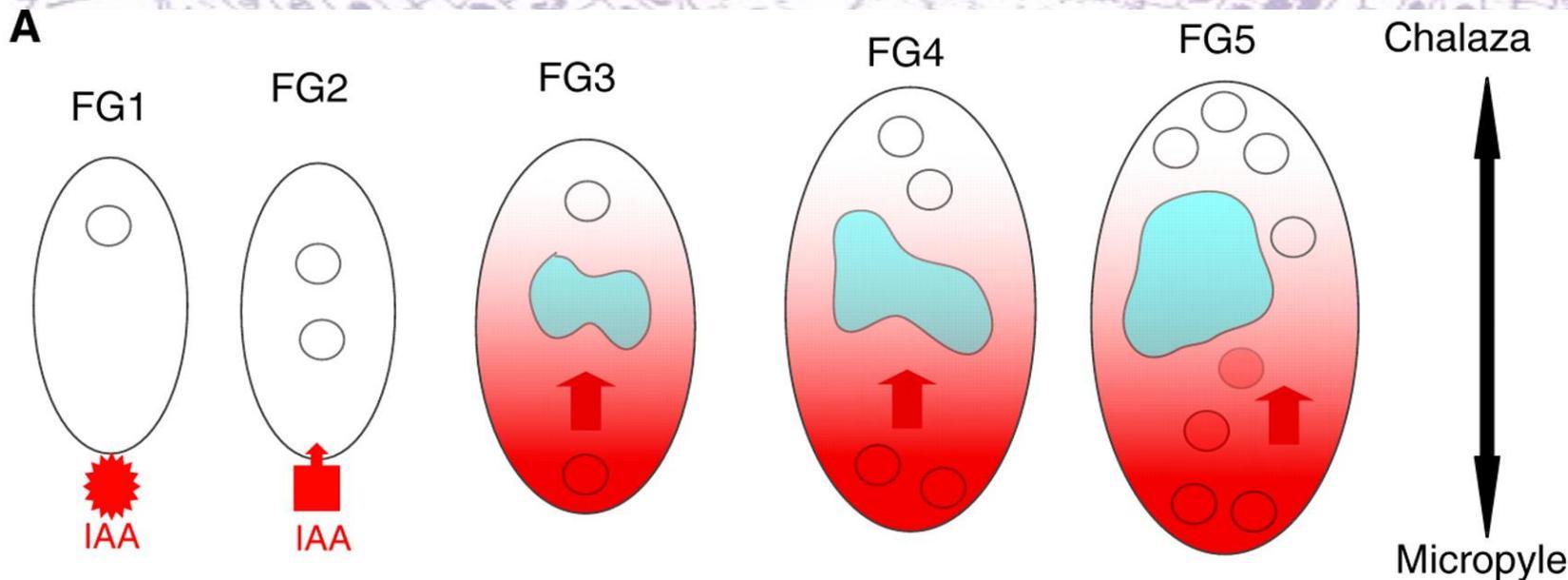
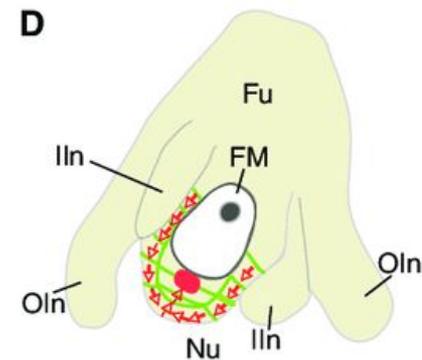
# Позиционная информация

- 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!

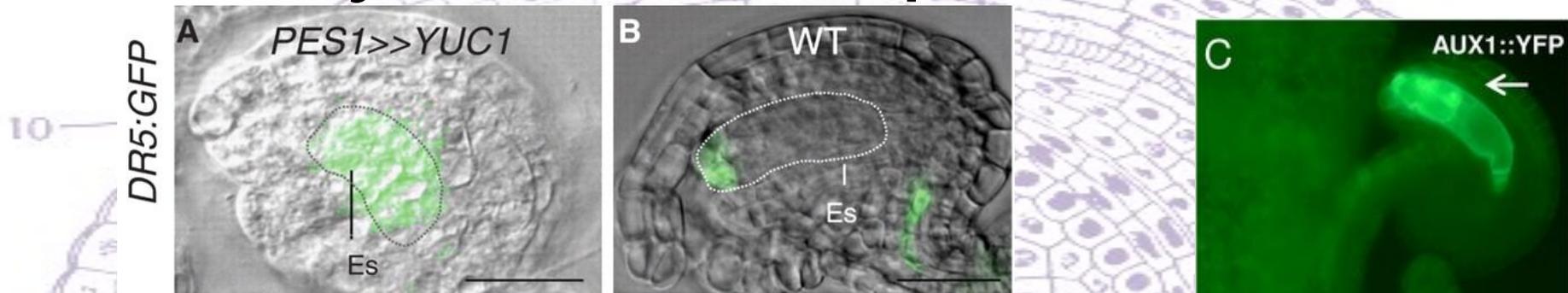


# Позиционная информация и ауксин

- 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 микропилярном конце зародышевого мешка, где должны сформироваться синергиды.
- После целлюляризации распределение ауксина в зародышевом мешке становилось более равномерным.

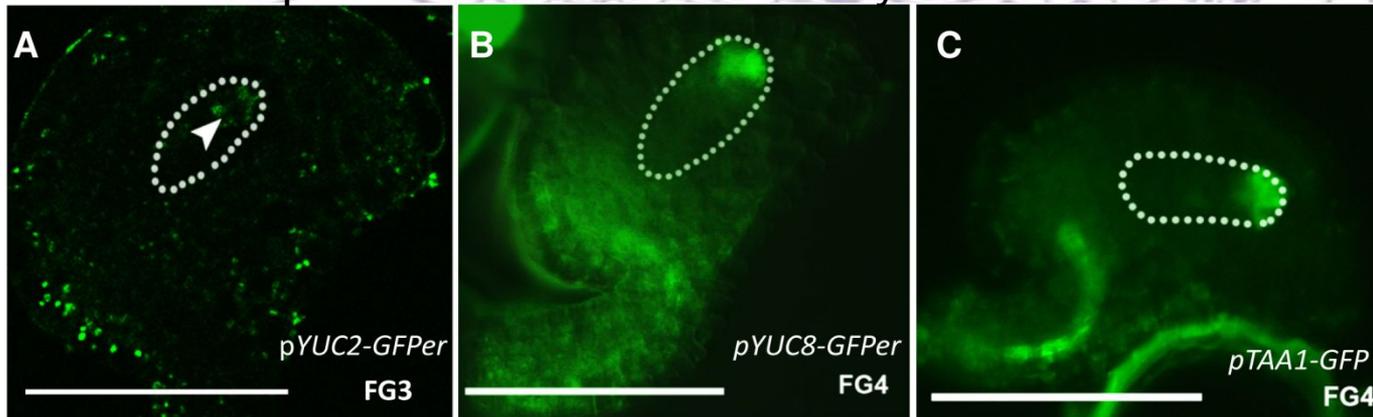


# Ауксиновый градиент



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

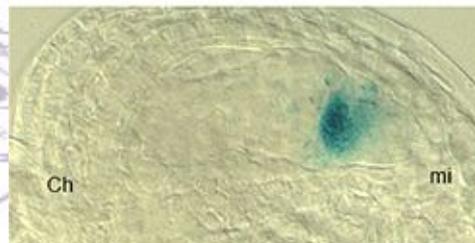
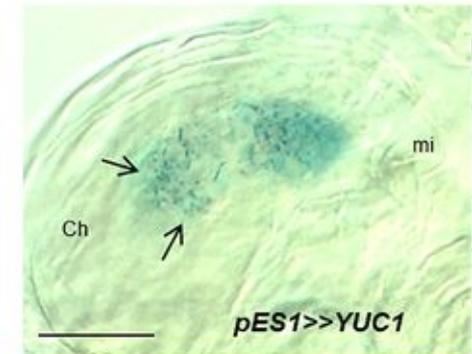
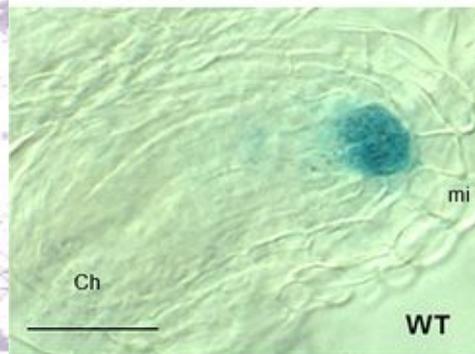
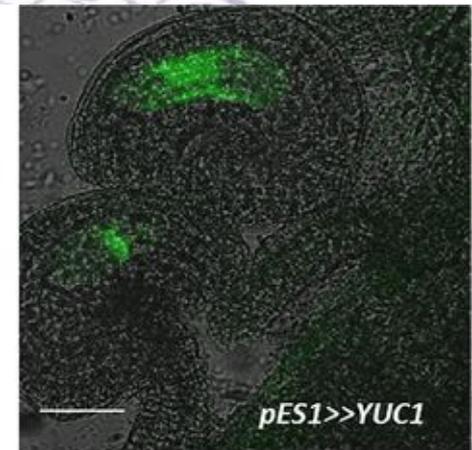
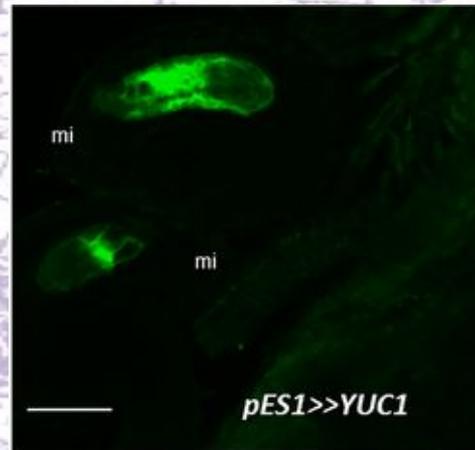
Экспрессия генов биосинтеза ауксина



# 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

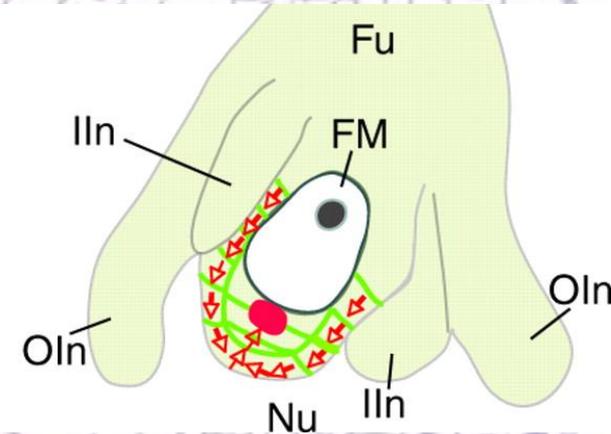
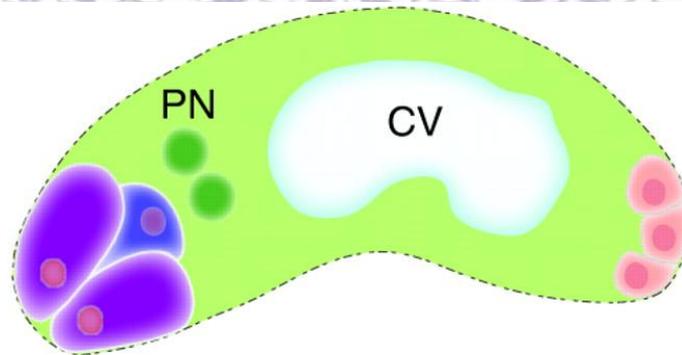
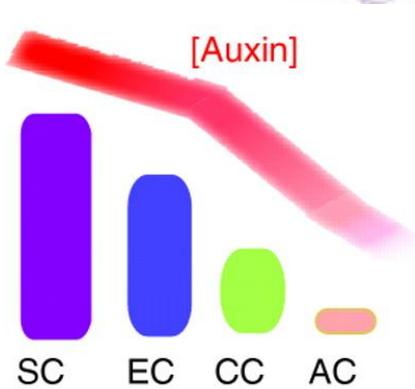


Parish A, Muth M, Y. Alvarado Saenz M, Simon M, Huff C, et al. (2015) Auxin Import and Local Auxin Biosynthesis Are Required for Mitotic Divisions, Cell Expansion and Cell Specification during Female Gametophyte Development in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 10(5): e0126164. doi:10.1371/journal.pone.0126164

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

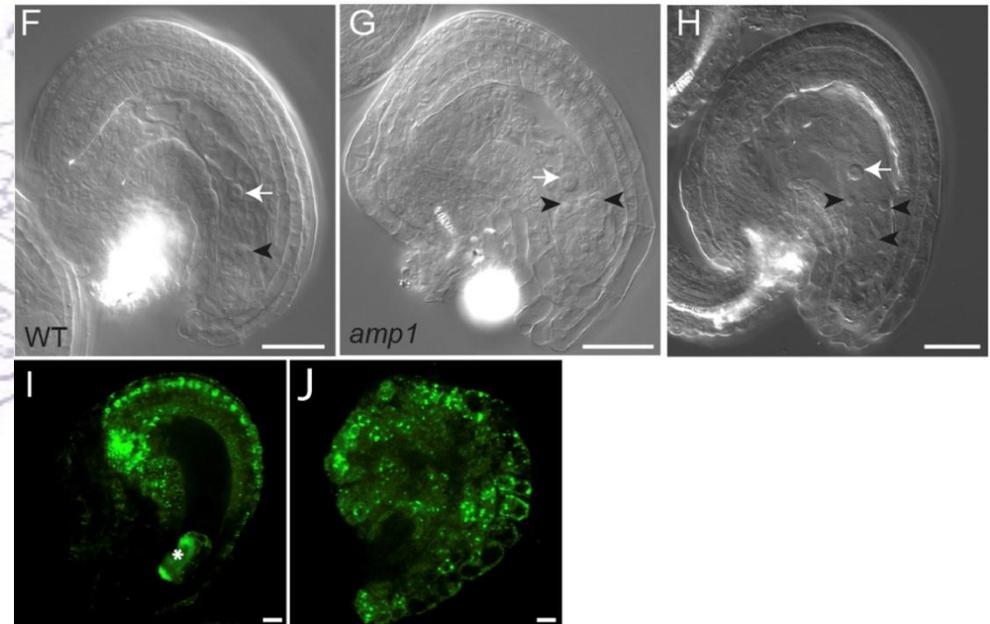
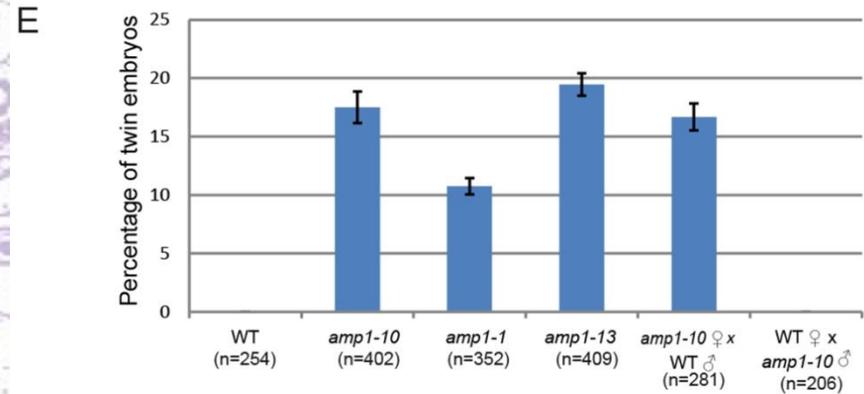
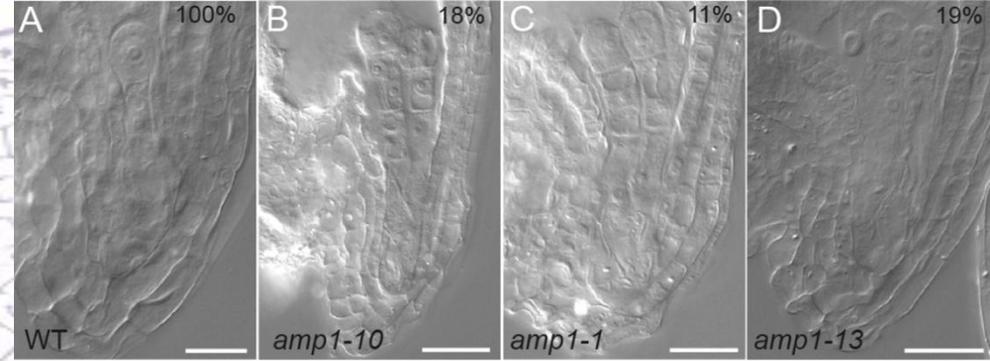
# Мутанты

- 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



# Мутанты

- У мутантов по гену *altered meristem program 1* (*amp1*) синергиды превращаются в ЯК. Белок AMP1 был обнаружен только в интегументах на ранних этапах развития ГФ и позднее в синергидах.
- AMP1, похоже, является фактором идентичности синергид.
- Белок AMP1 – заякоренная в мембране карбоксипептидаза, локализация - ЭПР [19](#). В спорофитных тканях показана ассоциация белка с репрессией трансляции через микроРНК
- Он важен для подавления биосинтеза цитокинина
- Таким образом, белок может участвовать в регуляции гормонального баланса

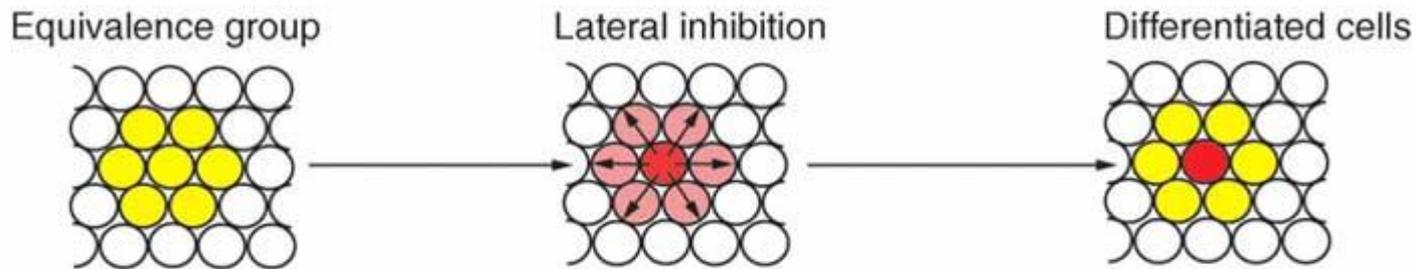


# Межклеточные взаимодействия в зародышевом мешке

- 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



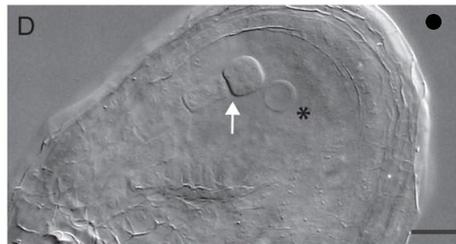
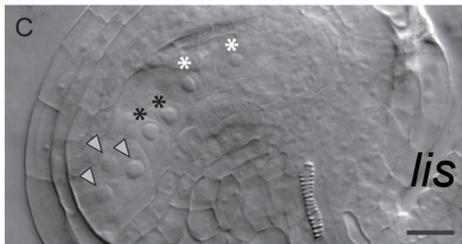
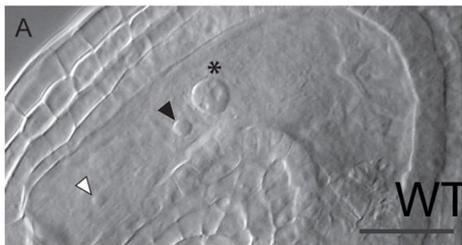
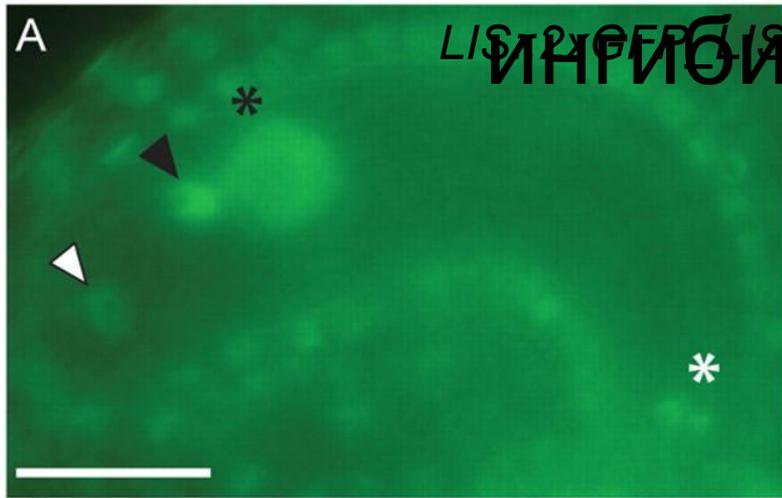
- после первичной спецификации клеток зародышевого мешка яйцеклетка и центральная клетка удерживают синергиды и антиподы от превращения в гаметы.

# Мутант по латеральному ингибированию

Белок LIS в норме локализован только в гамететах: ЯК и ЦК.

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

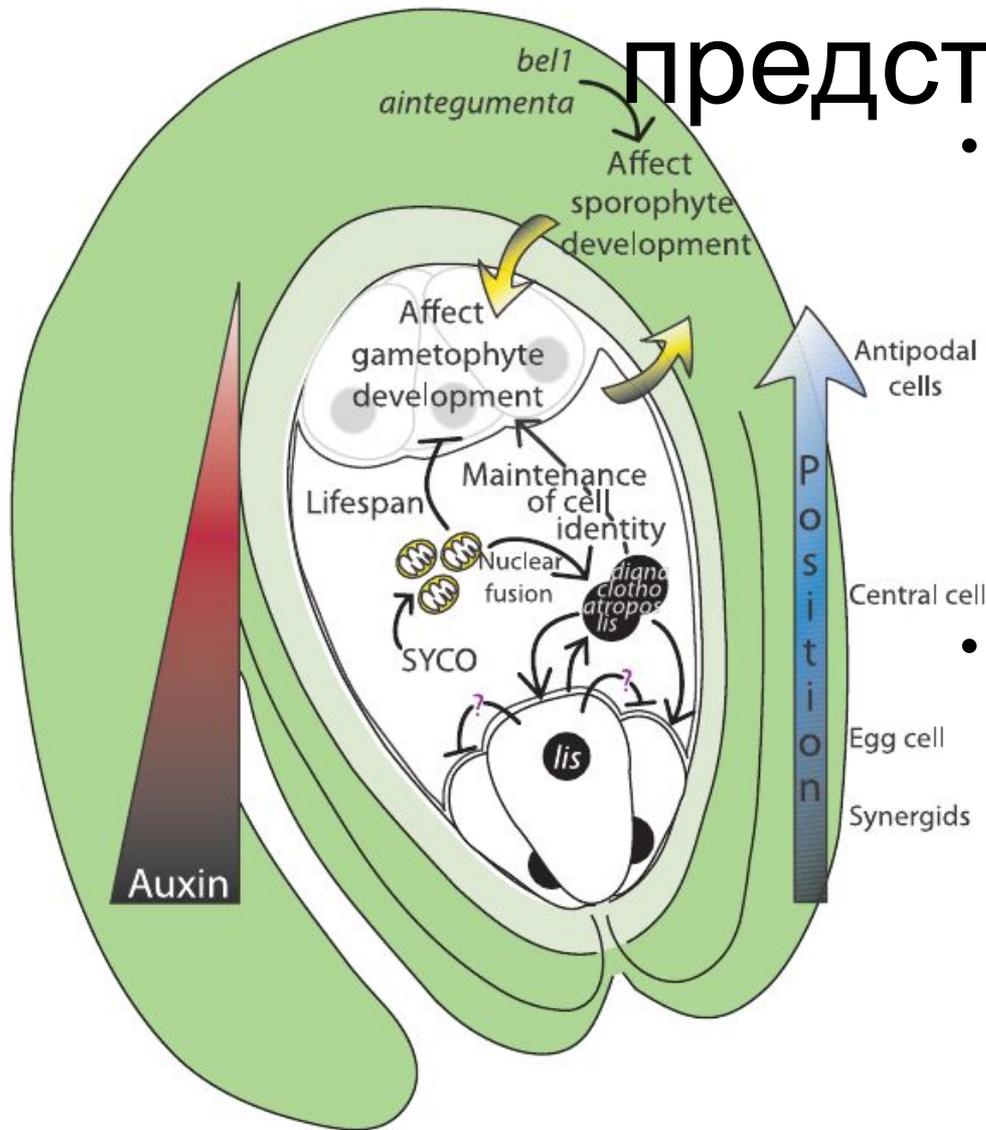
*LIS*-зависимый сигналинг можно рассматривать как защитный механизм, который запрещает развитие питающей ткани в отсутствие функциональной



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

# Как это себе

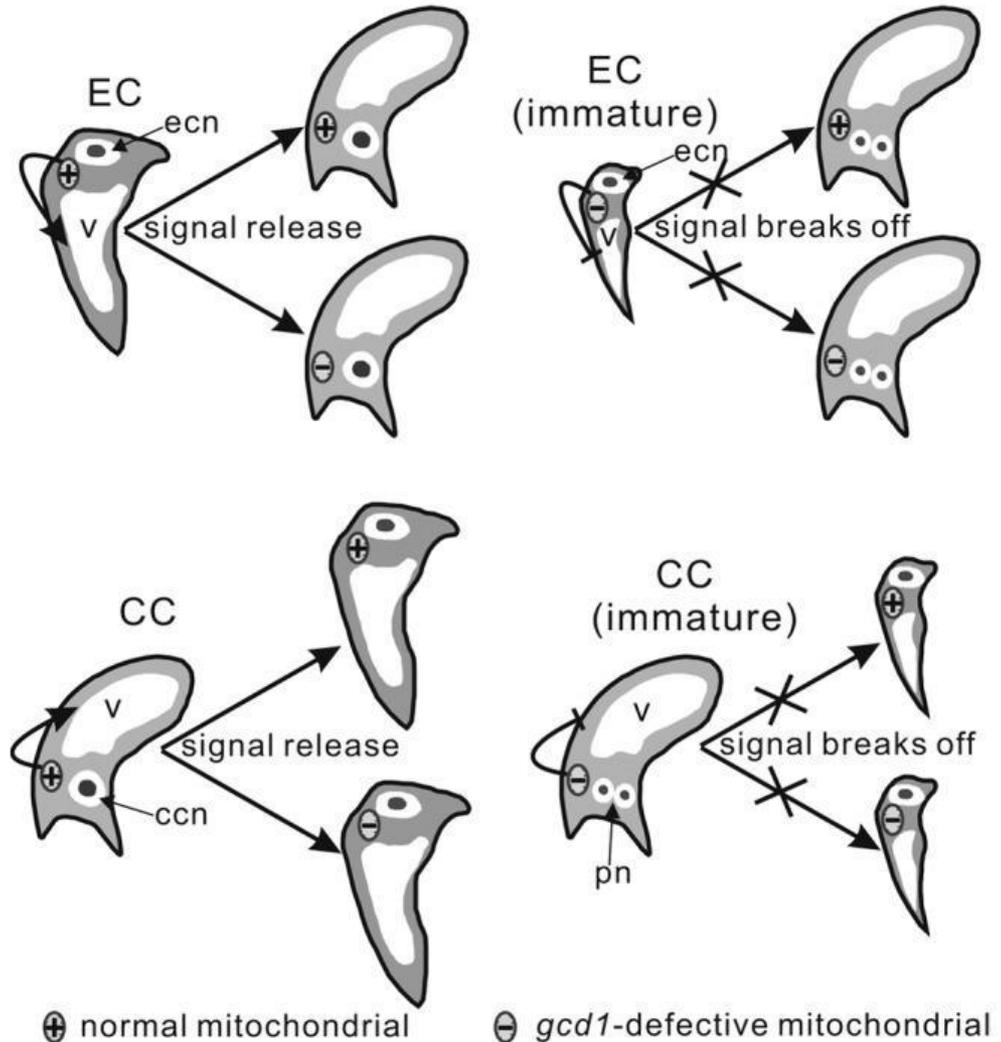
## представляют?



- 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.

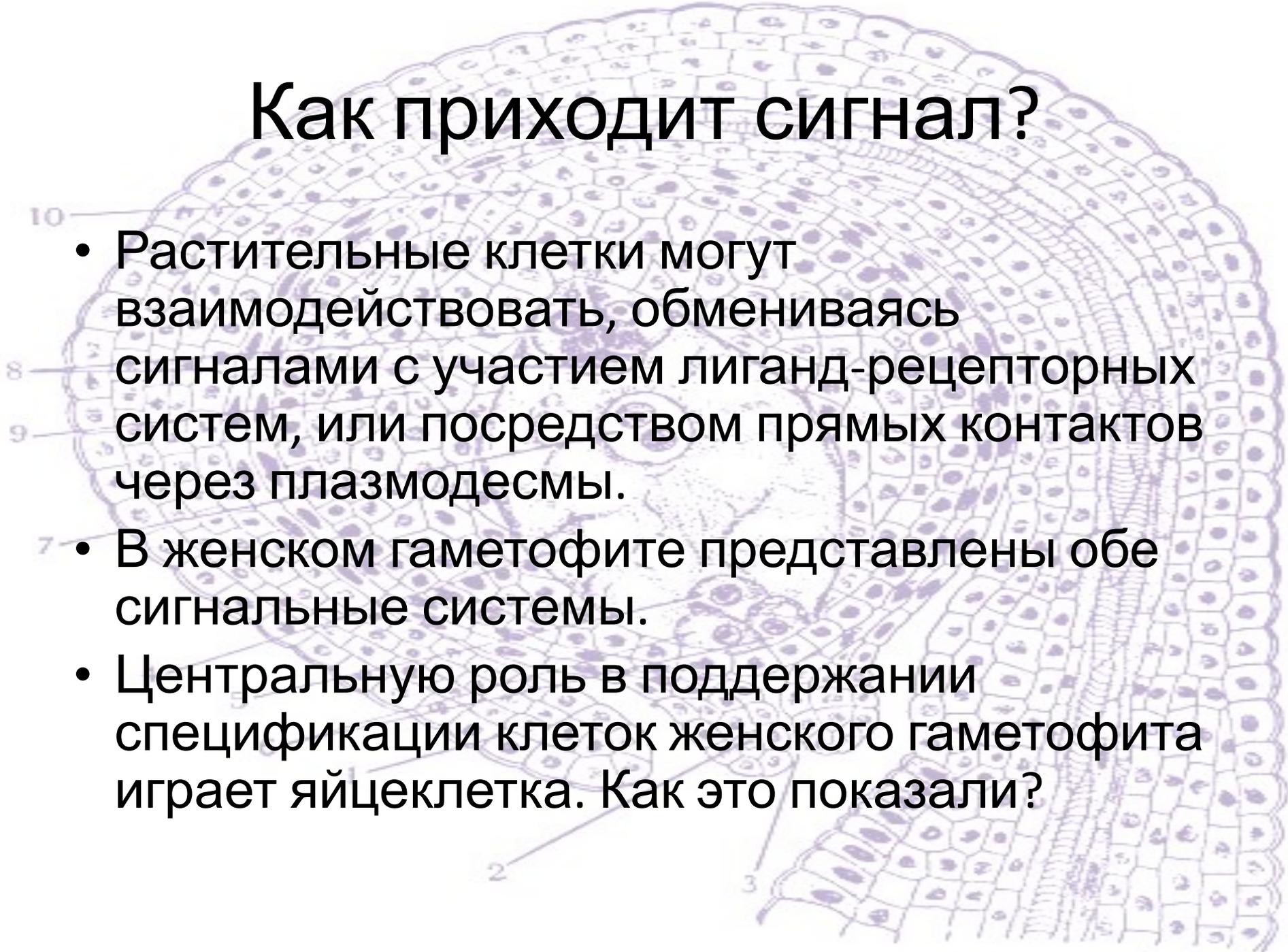
# Центральная клетка убивает антиподы

- 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?



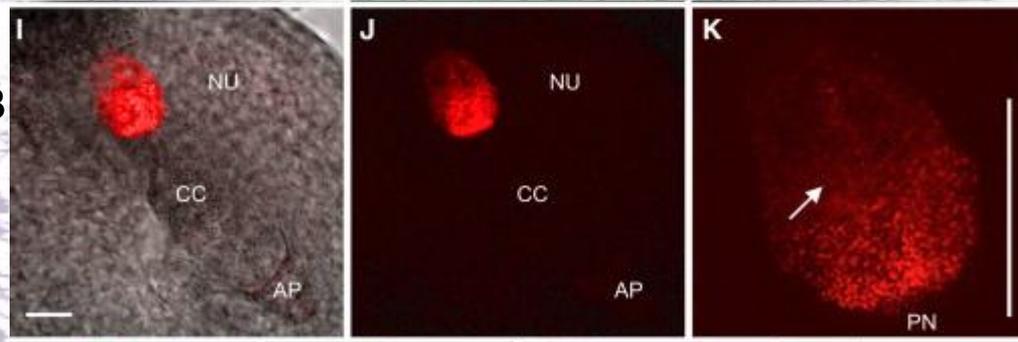
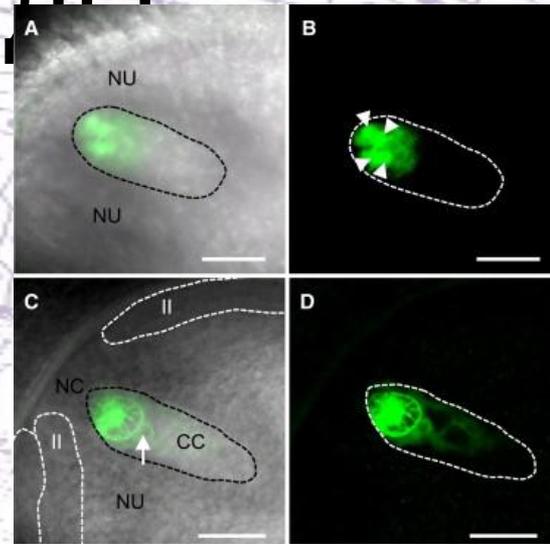
# Главная – яйцеклетка

- 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

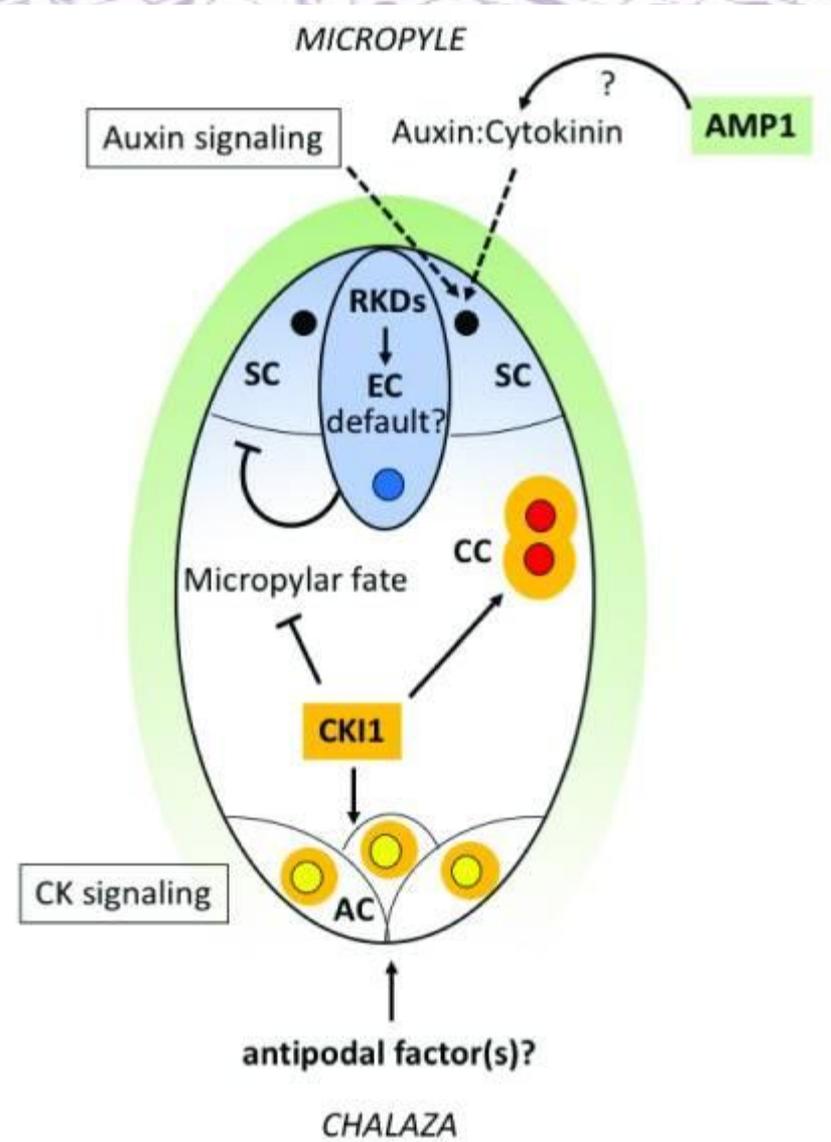
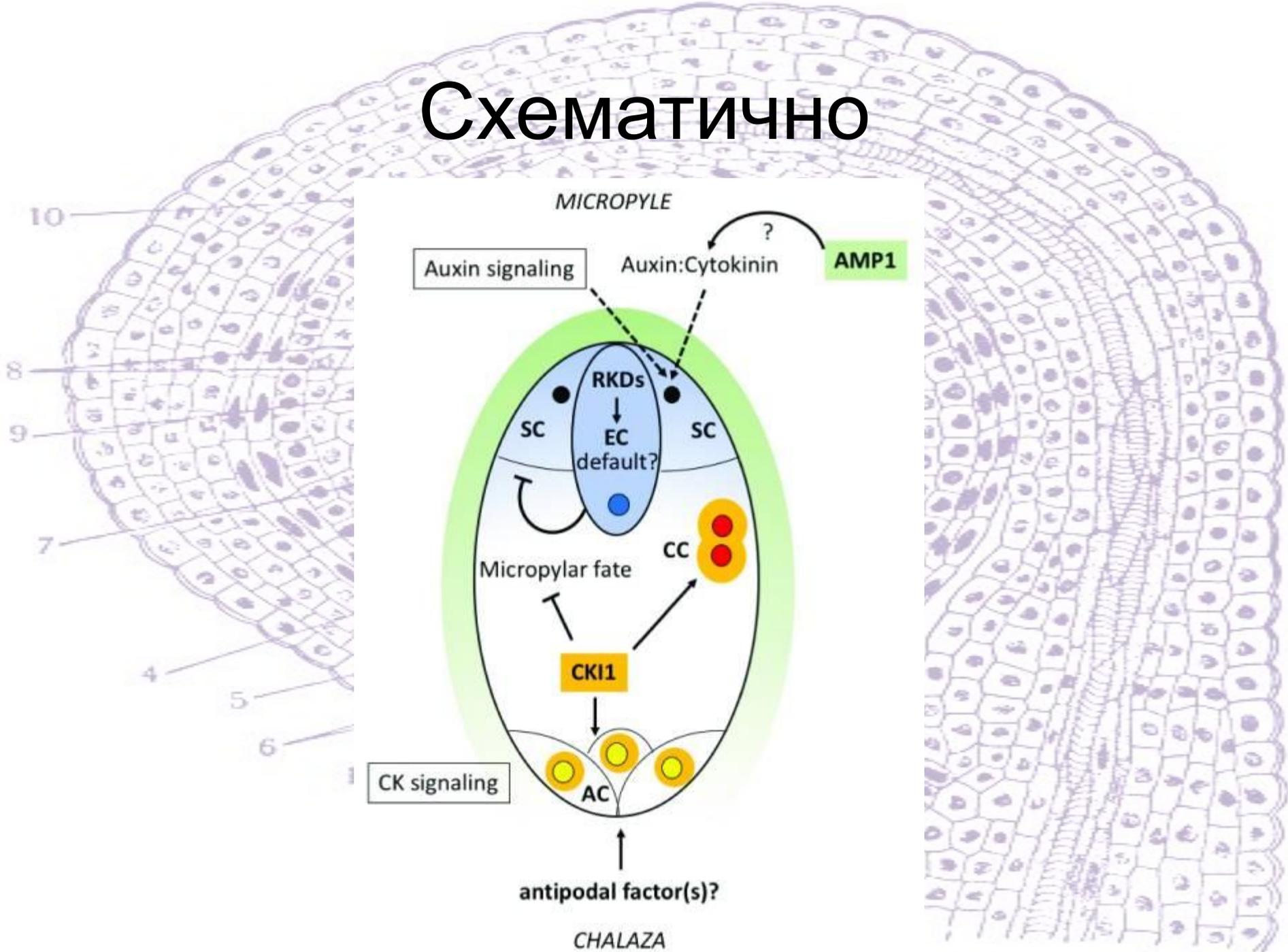
# Что за сигнал? Похоже,

## пептиды

- Химическая природа сигналов, продуцируемых яйцеклеткой и центральной клеткой *Arabidopsis*, активно изучается.
- 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,



# Схематично



# Далее

Транскрипционная активность и  
эпигенетический статус клеток женского  
гаметофита (лекция 2)

