

А. Ф. Попова

Программируемая смерть клеток эндосперма околозародышевой зоны в процессе формирования семян *Sium latifolium* L.

(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)

Викладено результати дослідження деградації клітин ендосперму в зоні навколо зародка, яка збільшується в процесі його розвитку і дозрівання. Методами світлооптичної, трансмісійної електронної і конфокальної мікроскопії та цитохімії визначено послідовні стадії дегенерації ядер ендосперму вказаної зони, які закінчуються фрагментацією ДНК. Отримані дані підтверджують, що деградація клітин ендосперму навколо зародка відбувається шляхом програмованої клітинної смерті із забезпеченням трофіки зародка в процесі його розвитку за рахунок вмісту дегенеруючих клітин ендосперму і формуванням зони для локалізації зрілого зародка в насінні. У той же час клітини ендосперму поза вказаною зоною інтенсивно накопичують запасні поживні речовини у вигляді різного розміру білкових тілець з глобоїдами та ліпідів, які використовуються в процесі проростання насіння.

Программируемая клеточная смерть (ПКС) — особая генетически управляемая программа гибели, которая характерна для определенных клеток и тканей как растительных, так и животных организмов в процессе их онтогенеза. ПКС как естественный этап в жизнедеятельности этих клеток происходит без какого-либо физического или химического воздействия, хотя конечные этапы дегенерации растительных и животных клеток несколько различаются [1]. Так, дегенерация клеток, конечным этапом которых является ПКС, включает целый ряд последовательных морфологических и биохимических изменений. Это проявляется в конденсации содержимого клеток, увеличении доли гетерохроматина в ядрах, снижении проницаемости мембран, прежде всего цитоплазматической мембраны, деградации ядерной оболочки и фрагментации ядерной ДНК [2]. Следует отметить, что именно фрагментация ДНК является главным характерным признаком ПКС. В дальнейшем наступает довольно быстрая дегенерация цитоплазматического содержимого у растительных организмов [3], в то время как для животных клеток характерный фагоцитозный путь утилизации разрушенных остатков клеток [1], т. е. сформированные апоптозные везикулы в животной клетке, отсутствующие у растений, подвергаются лизису.

У растений ПКС отмечается преимущественно в тканях генеративных органов. В частности, дегенерация клеток нуцеллуса [4], алейронового слоя и ряда клеток эндосперма [5], тапетума [6] на конечном этапе их функционирования происходит путем ПКС. Причем гибель клеток эндосперма с характерными признаками ПКС осуществляется с разной скоростью, что было выявлено у разных генотипов кукурузы [5]. Дегенерацию клеток путем ПКС в указанных тканях исследователи связывают с необходимостью быстрого разрушения одних тканей в процессе формирования других или использованием содержимого дегенерирующих клеток или тканей для трофики других.

Известно, что у видов растений, имеющих массивный эндосперм, клетки которого интенсивно аккумулируют запасные питательные вещества, обычно формируется зона из разрушенных клеток эндосперма вокруг зародыша, увеличивающаяся по мере созревания последнего. В процессе формирования семян растений *Sium latifolium* L. выявлена ранняя гибель клеток эндосперма в околозародышевой зоне, которые по морфологическим признакам отличаются от остальных клеток эндоспермальной ткани. Наличие четкой границы между зоной разрушенных клеток эндосперма и клетками эндосперма, расположенными вне этой зоны, дало нам основание предположить об особом типе гибели клеток эндосперма околозародышевой зоны, а именно путем ПКС.

В данном сообщении представлены результаты изучения последовательных стадий дегенерации клеток эндосперма околозародышевой зоны с использованием светооптического, электронно-микроскопического, цитохимического и флуоресцентного методов. Следует отметить, что данные о последовательных этапах дегенерации клеток эндосперма околозародышевой зоны путем ПКС в литературе отсутствуют.

В качестве объектов исследования использовали воздушно-водные и суходольные растения *Sium latifolium* L., а также другие виды семейства Apiaceae, в частности *Heracleum sosnowskyi* Manden, *Foeniculum vulgare* Mill., *Chaerophyllum nodosum* (L.) Hedge и *Archangelica officinalis* Hoffmann, которые принадлежат к разным родам указанного выше семейства.

Растения были собраны в Полтавской области (в окрестностях пгт Велика Багачка, вдоль берега и на мелководье р. Псел), а также в окрестностях Киева. Используемые растения характеризуются разными размерами как околозародышевой зоны, так и зародышей, а также клеток эндосперма, что дает возможность проведения сравнительного анализа особенностей и темпов протекания ПКС в клетках эндосперма у видов разных родов указанного семейства.

Для цитологического изучения использовали верхние соцветия, причем в зонтиках отбирали семяпочки только крайнего ряда как наиболее крупные и выровненные по размеру, и фиксировали по Карнуа [7]. Срезы окрашивали толуидиновым синим и основным фуксином [7], изучали и фотографировали в микроскопах Stemy SV-6 и Axioscope ("Karl Zeiss", Германия). ДНК и ее фрагменты выявляли на срезах клеток эндосперма путем обработки их специфическими флуоресцентными красителями Hoechst 33 342 и ДАПИ (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид). Исследования проводили в конфокальном микроскопе LSM-5 Pascal ("Karl Zeiss", Германия), используя лазер с длиной волны возбуждения 405 нм и с длиной волны выхода узкополосного фильтра ВР 420–480 нм. Ультратонкие срезы с целью изучения ультраструктурной организации ядер клеток эндосперма анализировали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-1230 ("Jeol", Япония). Цитохимические исследования для выявления резервного полисахарида — крахмала и продуктов его гидролиза в клетках эндосперма проводили с помощью реакции Шифф-перйодной кислоты [7].

Светооптические исследования срезов семяпочек показали, что начальные этапы дегенерации клеток эндосперма околозародышевой зоны у растений *S. latifolium* начинались уже на ранних стадиях развития зародышей, когда последние приобретали глобулярную форму. Содержимое клеток эндосперма значительно уплотнялось, в ядрах увеличивалась доля конденсированного хроматина, отмечались также разрывы цитоплазматической мембраны. Первоначально дегенерации подвергались клетки эндосперма, непосредственно прилегающие к зародышу, а в дальнейшем гибель клеток происходила в направлении от зародыша к окружающим зародыш клеткам эндосперма. Это приводило к формированию зоны вокруг зародыша, лишенной содержимого, в которой наблюдались лишь остатки клеточных

оболочек (рис. 1). Особенно интенсивную дегенерацию клеток эндосперма отмечали в зоне под зародышем, где в будущем располагались семядоли зародыша, причем такая зона почти в два раза превышала длину самих зародышей на разных стадиях их формирования (см. рис. 1, а).

Электронно-микроскопический анализ клеток эндосперма, дегенерирующих путем ПКС, показал изменение их ультраструктуры, в частности содержимое клеток конденсировалось, причем особенно существенные перестройки были характерны для ядер. Профили ядер на срезах в околозародышевой зоне имели неправильную форму и разный размер (рис. 2, а; рис. 3, а). В то же время для ядер эндосперма, локализованных вне указанной зоны, была характерна типичная округлая форма с четкими контурами (см. рис. 2, а). В ядрах клеток, дегенерирующих путем ПКС, существенно увеличивался объем конденсированного хроматина, причем его скопления были локализованы как по периферии, так и по всему объему ядер (см. рис. 2, б). Ядрышки чаще всего в таких ядрах не наблюдались. При этом ядерная оболочка на отдельных участках частично была дезинтегрирована или полностью отсутствовала (см. рис. 2, б). В дегенерирующих ядрах клеток эндосперма формировались обычно 3–4 компактных образования разной величины и формы (см. рис. 3, б), проявляющие интенсивную флуоресценцию после окраски ядер специфическими для ДНК реактивами Hoechst 33342 и ДАПИ.

Полученные результаты подтверждают, что формирование в клетках эндосперма нескольких компактных образований неправильной формы является следствием фрагментации ДНК ядер (см. рис. 3, б), что согласуется с литературными данными, полученными при исследовании дегенерации ядер как в клетках эндосперма, так и других типах клеток генеративных тканей, происходящих путем ПКС [3, 8].

По мере увеличения размера зародышей у всех изучаемых видов семейства Ариасеae продолжалась дегенерация клеток эндосперма в околозародышевой зоне, причем четко прослеживалось усиление степени разрушения клеток в направлении от зародыша к окружающему зародыш эндосперму. В то время как клетки эндосперма околозародышевой зоны полностью разрушались, клетки более отдаленных от зародыша слоев эндосперма еще сохраняли часть своего содержимого, которое, очевидно, постепенно использовалось зародышами для их трофики.

В пользу высказанного предположения свидетельствуют результаты цитохимической реакции с применением Шифф-периодной кислоты. Наличие интенсивной малиново-розовой окраски в зоне вокруг зародышей как на глобулярной стадии, так и на ранних стадиях формирования семядолей и зародышевого корня указывает на присутствие растворимых полисахаридов в результате гидролиза зерен крахмала в пластидах клеток эндосперма (рис. 4, а). По мере дифференциации зародышей, когда последние содержали уже полностью сформированные семядоли и зародышевый корень, интенсивность реакции на полисахариды снижалась, что, несомненно, подтверждает использование полисахаридов развивающимся зародышем. Клетки эндосперма, находящиеся за пределами околозародышевой зоны, в этот период интенсивно накапливали запасные питательные вещества в виде липидов и преимущественно разного размера белковых телец с глобоидами (см. рис. 4, б).

Следует отметить, что последовательные стадии дегенерации ядер и клеток эндосперма у сухоходольных и воздушно-водных растений *S. latifolium* были сходными, несмотря на различия (почти в два раза) размеров как самих зародышей, так и сформированных пустых зон вокруг них [9]. Как показал проведенный цитологический анализ, подобные стадии дегенерации клеток эндосперма путем ПКС наблюдались также и у других изученных на-



Рис. 1. Фрагменты зародышевых мешков *S. latifolium* с зародышами и клетками эндосперма околозародышевой зоны на стадии дегенерации (15-суточный зародыш) (а) и дегенерировавшими клетками эндосперма (35-суточный зародыш) (б) (показаны стрелками). Условные обозначения: З — зародыш, Э — эндосperm, ЗДЭ — зона дегенерации эндосперма

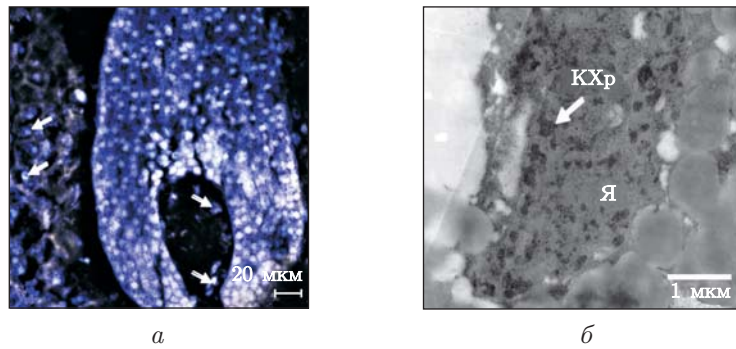


Рис. 2. Фрагмент зародыша и эндосперма в околозародышевой зоне *S. latifolium* с дегенерирующими ядрами эндосперма (показаны двухлинейными стрелками, обработка Hoechst 33342) и ядра эндосперма за пределами указанной зоны, имеющие типичную округлую форму (показаны простыми стрелками) (а); ультраструктура ядра клетки эндосперма на стадии дегенерации с увеличенным количеством конденсированного хроматина (б). Условные обозначения: Я — ядро, КХр — конденсированный хроматин

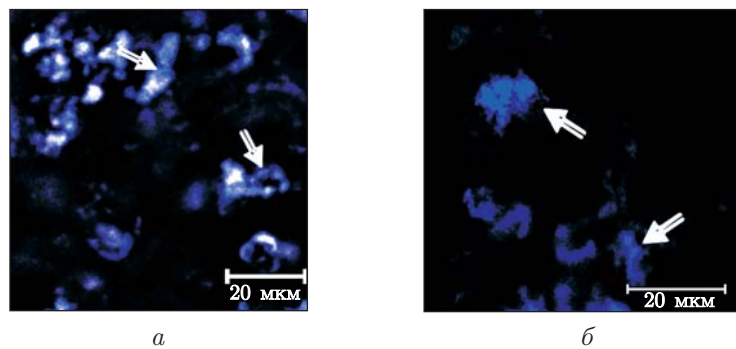


Рис. 3. Фрагменты клеток эндосперма *S. latifolium* в околозародышевой зоне с дегенерирующими ядрами (а); фрагменты ДНК в дегенерировавших ядрах эндосперма (б) (показаны двухлинейными стрелками, обработка Hoechst 33342)

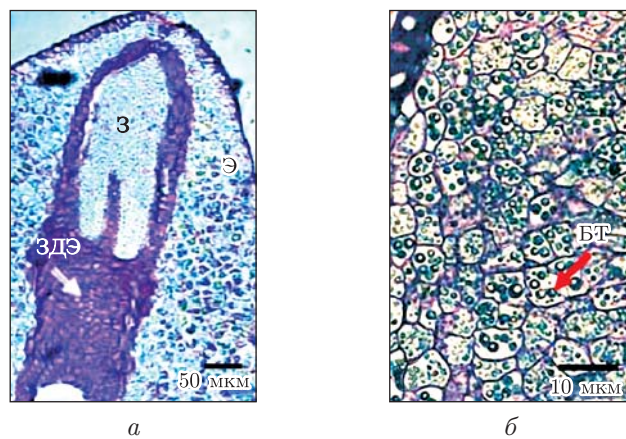


Рис. 4. Фрагмент зародышевого мешка *S. latifolium* с 30-суточным зародышем, окруженным зоной дегенерировавших клеток эндосперма (малиновая окраска как следствие реакции на растворимые полисахариды, показано двухлинейной стрелкой) (а); фрагмент эндосперма, локализованный вне околозародышевой зоны с включениями в клетках белковых телец с глобоидами (показаны красной стрелкой) (б). Условные обозначения: З — зародыш, Э — эндосперм, ЗДЭ — зона дегенерации клеток эндосперма, БТ — белковые тельца

ми видов разных родов семейства *Ariaceae*, несмотря на различия в размерах как самих зародышей, так и околозародышевых зон, а также клеток эндосперма.

Выявленные нами последовательные морфологические изменения клеток эндосперма околозародышевой зоны, дегенерирующих путем ПКС, у всех изученных нами видов семейства *Ariaceae*, совпадают с литературными данными, полученными в процессе изучения дегенерации ядер эндосперма у видов других семейств, в частности *Cucurbitaceae* [2], *Gramineae* [5]. Следует отметить также, что основные признаки дегенерации ядер клеток эндосперма, дегенерирующих в соответствии с ПКС, характерны также для разных типов клеток генеративных тканей [10, 11], причем процесс дегенерации клеток всегда заканчивался прогрессией интернуклеосомной фрагментации ДНК [3].

Считают, что механизм фрагментации ядерной ДНК обусловлен энергозависимым расщеплением ее эндонуклеазами [12] или каспазоподобными протеазами в зоне интернуклеосомных спейсеров [4]. Под действием указанных ферментов происходит фрагментация ДНК, что проявляется в формировании многочисленных фрагментов ДНК, содержащих до 180–200 пар нуклеотидов [8]. Поэтому этот тип гибели клеток считают биохимически специфичным типом, характеризующимся активацией эндогенных нуклеаз, расщепляющих ДНК на небольшие фрагменты [2].

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что дегенерация клеток эндосперма, окружающих зародыш, у видов семейства *Ariaceae* происходит путем ПКС. Наличие признаков ПКС в процессе дегенерации ядер клеток эндосперма околозародышевой зоны сопровождается глубокими изменениями в морфологии ядер, дегенерацией ядерной ДНК в результате ее фрагментации и формированием плотных масс разной формы и величины, интенсивно флуоресцирующих вследствие связывания ДНК флуоресцентными красителями. Клетки эндосперма, расположенные в околозародышевой зоне, благодаря быстрой дегенерации в соответствии с ПКС обеспечивают трофику зародыша и способствуют формированию пустой зоны для локализации развивающегося зародыша, тогда как клетки основной эндоспермальной ткани у видов исследуемого семейства *Ariaceae* синтезируют и аккумулируют запасные питательные вещества в виде липидов и белковых телец, необходимых для прорастания семян.

1. Levy R. R., Cordonier H., Czyba J. C., Guerin J. F. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics // *Ital. J. Anat. Embryol.* – 2001. – **106**, No 1. – P. 101–108.
2. Wojciechowska M., Olszewska M. Endosperm degradation during seed development of *Echinocystis lobata* (*Cucurbitaceae*) as a manifestation of programmed cell death (PCD) in plants // *Folia Histochem. Cyto-biol.* – 2003. – No 1. – P. 41–50.
3. Palavan-Unsal N., Buyuktuncer E.-D., Tufekci M. A. Programmed cell death in plants // *J. Cell and Mol. Biol.* – 2005. – **4**, No 9. – P. 9–23.
4. Lombardi L., Casani S., Ceccarelli N. Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases // *J. Exp. Bot.* – 2007. – **137**, No 1. – P. 1093–2003.
5. Young T. E., Gallie D. R., DeMason D. A. Ethylene – mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunk2* genotypes // *Plant physiol.* – 1997. – **115**, No 2. – P. 737–751.
6. Pacini A., Mosti S., Brighigna L. Programmed-cell-death events during tapetum development of Angiosperms // *Protoplasma.* – 1999. – **207**, No 3–4. – P. 213–221.
7. Дженсен У. Боганическая гистохимия. – Москва: Мир, 1965. – 378 с.
8. Collins J. A., Schandi C. A., Yang K. K. et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis // *Histochem. and Cytochem.* – 1997. – **45**, No 7. – P. 923–934.
9. Popova A. F., Ivanenko G. F. Embryogenesis of *Sium latifolium* L. (*Umbeliferae*) under different water regimes // *Biologia.* – 2007. – **8**, No 2. – P. 12–14.

10. Wu H., Cheung A. Y. Programmed cell death in plant reproduction // Plant. Mol. Biol. – 2000. – **44**. – P. 267–281.
11. Woltering E. J., Jong A., Hoeberichts F. A. et al. Plant programmed cell death, ethylene and flower senescence // Acta Horticulturae (ISHS). – 2005. – **669**. – P. 159–170.
12. Schmid M., Simpson D., Gietl C. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**, No 24. – P. 14159–14164.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 10.06.2010

A. F. Popova

Programmed death of endosperm cells in a zone around embryo during seed development of *Sium latifolium* L. plants

The results of investigation of the endosperm cell degeneration in a zone around embryos during their development and maturing are presented. The consecutive stages of endosperm nuclei degradation and DNA fragmentation in endosperm cells around the embryo were shown by light-optical, electron transmission and confocal microscopy and cytochemical methods. The obtained data confirm that the degeneration of the endosperm cells occurs via programmed cell death, supplying nutrition of the embryos by content of degenerative cells and thus forming a zone for the localization of a mature embryo in seeds. At the same time, the endosperm cells localized beyond this zone intensively accumulate reserve nutrient substances in a form of protein inclusions with numerous globoids of different sizes and lipids which are used during the seed germination.