

Мейоз в теории и на практике

Сценарий учебного видеофильма из видеокомплекса

«Видеопрактика по цитологии в НГУ».

Гусаченко А.М., Корниенко О.С., Высоцкая Л.В.

Аннотация

Фильм «Мейоз в теории и на практике» является частью видеокомплекса «Видеопрактика по цитологии в НГУ». Он состоит из пяти частей - отдельных фильмов суммарной продолжительностью 45 минут.

Первая часть иллюстрирует оборудование и реактивы на рабочем месте, манипуляции, связанные с приготовлением препаратов для анализа мейоза, содержание основных методик. Показаны морфологические особенности самцов и самок саранчовых и тараканов, этапы препарирования насекомых и строение половой системы. *Длительность 12 мин. 18 с.*

Вторая часть - теоретическая – подробно описывает события мейоза в микрофотографиях и схемах. *Длительность 8 мин. 8 с.*

Третья часть описывает поведение хромосом в мейозе с помощью пластилиновых моделей. Используются видеосъемка и элементы анимации. Рассмотрены разные варианты бивалентов и расположения обменов. *Длительность 8 мин. 55 с.*

Четвертая часть посвящена сперматогенезу у насекомых на примере саранчового *Arcyptera fusca* с демонстрацией и анализом тотального и давленого препаратов семенника. *Длительность 8 мин. 22 с.*

В пятой части рассказывается об этапах развития пыльцы, особенностях микроспорогенеза у высших растений. Приведены фотографии последовательных стадий мейоза у саранки *Lilium martagon*. *Длительность 7 мин. 43 с.*

Методические материалы «Учебный видеокурс» подготовлен в рамках реализации Программы развития НИУ-НГУ

Фильм 1.

Заглавный титр: «Видеопрактика по цитологии в НГУ».

Звуковое сопровождение: музыкальный фрагмент из фильма «Хор» (США, 2009).

Заглавный титр: «Мейоз в теории и на практике».

Титр: «Авторы: Гусаченко А.М., Корниенко О.С., Высоцкая Л.В.».

Титр: «Содержание».

Видео: Дверь аудитории, в которой проходит практика, табличка на двери «Большой цитологический и большой генетический практикумы».

Текст.

Каждый год студенты-биологи 2 курса факультета естественных наук Новосибирского государственного университета в течение двух недель проходят практику по цитологии. За это время они должны освоить некоторые методы, позволяющие анализировать клеточное строение живых организмов и организацию их генетического материала.

Слайд: Задачи летней практики по цитологии.

Текст.

Научиться изготавливать препараты некоторых тканей и клеток насекомых и растений, самостоятельно анализировать их с помощью светового микроскопа. Получить навыки организации рабочего места, безопасной работы с реактивами и красителями. Исследования ведутся в нескольких направлениях, одним из них является мейоз.

Заглавный титр, заставка Digital radius:

«Часть 1. Организация рабочего места. Методики».

Титр на черном фоне: «Рабочий стол»

Видео. Показываем рабочий стол, микроскоп, инструменты и реактивы. Объясняем, для чего они нужны.

Текст.

Это рабочий стол студента во время летней практики по цитологии. Вот микроскоп МБС бинокулярный стереоскопический. В отличие от обычных микроскопов он дает прямое объемное изображение и небольшое увеличение, поэтому он удобен для препарирования мелких объектов.

Это планшетка, на которую складывают чистые предметные стекла и готовые цитологические препараты. На предметных стеклах есть матировка, шероховатость, на ней пишут карандашом название препарата, дату изготовления и инициалы того, кто

сделал препарат. Это помогает в дальнейшем отыскать нужный препарат у себя на планшетке или за общим столом, где вы можете его случайно оставить. Матировка может быть двухсторонняя или односторонняя, и это важно учитывать, чтобы положить стекло в нужном положении.

На планшетке есть еще предметное стекло с лункой, где кусочки ткани можно выдерживать в жидкости незначительное время.

Это покровные стекла, ими накрывают препарат. Обычно они квадратные, со стороной 18, 20 и 22 мм. Хранятся покровные стекла в бюксе со спиртовым раствором на общем столе. Их можно доставать при помощи пинцета и протирать кусочком марли.

Нам понадобятся также чашки Петри большая и маленькая, пинцеты разного размера, маленькие ножницы, пипетки для забора химических реактивов.

Препаровальные иглы удобно класть или хранить воткнутыми таким образом. Перед работой их необходимо натачивать на бруске с мелким зерном, потому что они быстро затупляются и покрываются ржавчиной. Также для очистки иглоочек можно использовать стекло, матированное по всей поверхности.

Для работы нам понадобятся следующие реактивы. Часть из них стоят в штативе, остальные в холодильнике.

- Физиологический раствор необходим для препарирования тканей насекомых. Меняем каждый день.
- Гипотонический раствор - цитрат натрия - нужен, чтобы вызвать набухание животных клеток, что в дальнейшем улучшает разброс хромосом на препаратах. Меняем каждый день.
- Раствор колхицина используют для разрушения микротрубочек клетки и задержки на стадии метафазы. Для растений его разводят на воде, а для животных - на физиологическом или гипотоническом растворе. В последнем варианте мы получаем колхицинирование и набухание клеток одновременно. Храним в холодильнике.
- Уксуснокислый спирт представляет собой смесь ледяной, концентрированной уксусной кислоты и 96% спирта в соотношении один к трем. Это фиксатор, сохраняющий общую морфологию животных и растительных клеток, структуру ядра и хромосом. Меняем каждый день.
- Краситель ацетоорсеин используют для окрашивания хромосом. Также он удобен для выявления общей морфологии клетки. Ацетоорсеин содержит уксусную кислоту!
- Уксусная кислота 45% необходима для отмывания ацетоорсеина при окрашивании и для размягчения тканей в процессе приготовления давленого препарата.

Для работы требуется много фильтровальной бумаги, нарезанной небольшими кусочками. Она необходима для удаления лишней жидкости. Фильтровальные бумажки, пропитанные уксусной кислотой и фиксатором, бросают в банку с водой, чтобы уменьшить вредные испарения.

Титр на черном фоне: «Выбор насекомых и препарирование материала».

Слайд: Фотография самца саранчового *Melanoplus sp* в природе.

Текст.

Классическим объектом для изучения мейоза являются самцы саранчовых. Это не случайно, потому что саранчовые широко распространены по всему миру, многочисленны. Из семенников этих насекомых можно легко приготовить цитологические препараты. А также у большинства видов саранчовых небольшое число достаточно крупных хромосом.

Слайд: Фотография самки саранчового *Locusta sp*.

Текст.

У самок тоже можно изучать мейоз, но это гораздо более трудоемкая задача, потому что мейотических клеток мало, цитоплазма ооцитов плотно заполняется желтком и маскирует хромосомы в ядре, хроматин менее конденсирован и разрыхлен по причине активной транскрипции.

Слайд: Схема строения брюшка самца и самки саранчовых.

Текст.

Как отличить самцов и самок по внешнему виду? На этом слайде схематично представлены брюшки самца и самки саранчовых. У самца конец брюшка острый, с выраженной генитальной пластинкой. У самки на конце брюшка находятся верхняя и нижняя створки яйцевода.

Слайд: Самец и самка саранчовых *Chorthippus sp*. под бинокулярным микроскопом.

Текст.

На этой фотографии представлены тушки саранчовых разного пола. Вы можете увидеть различия. Вот острый кончик брюшка у самца, а у самки раздвинулись створки яйцевода, это произошло под действием эфира при усыплении насекомых.

Слайд: Серый таракан *Nauphoeta cinerea* в садке.

Текст.

Для изучения мейоза также можно использовать других представителей насекомых, например, тараканов. Серый или мраморный таракан *Nauphoeta cinerea* хорошо размножается в лабораторной культуре, поэтому его часто выращивают как кормовой объект для амфибий, рептилий и пауков.

Слайд: Схема строения брюшка самца и самки серого таракана.

Текст.

Половой диморфизм хорошо выражен, самцов и самок можно определить по строению брюшка. У самцов последний сегмент (стернит) узкий, маленький, а у самок, два последних стернита срослись с образованием широкого щитка.

Слайд: Крупным планом брюшки самца и самки серого таракана *Nauphoeta cinerea* под бинокулярным микроскопом.

Текст.

На фотографии хорошо видно, как выглядит последний стернит у самца, и широкий щиток у самки.

Слайд: Схема строения половой системы самца насекомого.

Текст.

На следующих слайдах вы увидите, как выглядят половые железы саранчовых и тараканов. На этой схеме представлено строение половой системы самца. Она состоит из пары семенников, пары выводящих протоков, придатков семенника и копулятивного органа.

Слайд: Частично препарированное брюшко самца саранчового под микроскопом.

Текст.

У самцов саранчовых семенники расположены в средней части брюшка.

Слайд: Следующая стадия препарирования брюшка самца саранчового, видны семенники и другие органы.

Текст.

Они могут быть окружены желтыми скоплениями жирового тела. Вы можете увидеть на этой фотографии прозрачные придатки семенника, мальпигиевы сосуды коричневого цвета, а также копулятивный орган.

Слайд: Полностью препарированные семенники саранчового под микроскопом.

Текст.

На этом слайде показаны семенники, частично очищенные от жирового тела. Вы видите, что семенник представляет собой парный орган, состоящий из многочисленных семенных фолликулов, проксимальные концы которых открываются в семенные протоки. Количество семенных фолликулов различно у разных видов.

Слайд: Препарированный яичник саранчового под микроскопом.

Текст.

На этом слайде можно увидеть как выглядят половые железы у самок саранчовых.

Слайд: Частично препарированное брюшко самца серого таракана под микроскопом.

Текст.

У таракана семенники находятся в концевой части брюшка. Они напоминают по форме шарики, внутри каждого такого шарика находится несколько семенных фолликулов.

Видео: Следующий этап препарирования брюшка самца серого таракана, выделены семенники, крупный план.

Текст.

Семенники могут быть окружены белым скоплением жирового тела. Через семенные протоки спермии выходят в копулятивный аппарат.

Видео: Частично препарированное брюшко самки серого таракана. Видны яичники, крупный план на левый, потом на правый.

Текст.

На этом слайде можно наблюдать яичники у самки серого таракана. Каждый яичник состоит из нескольких яйцевых трубочек. Яйцевые трубочки связаны друг с другом общим яйцеводом.

Титр на черном фоне: «Этапы приготовления препарата».

Слайд: «Схема этапов приготовления препарата».

Текст.

После того, как вы поймали нужный вам биологический объект и выделили семенники или яйцевые трубочки в физиологическом растворе, Вы можете перейти к этапу фиксации материала, который проводится в лунке с уксуснокислым спиртом в течение 20-30 минут. После фиксации материал отмывают несколько минут 96%-м спиртом, и переходят к этапу окрашивания. В лунке с ацетоорсеином материал инкубируют около 40 минут. После окрашивания можно приступать к приготовлению временного препарата. В некоторых случаях проводят предобработку материала сразу после выделения. Инкубация в гипотоническом растворе приводит к набуханию животных клеток и лучшему разбросу хромосом на препарате. Использование колхицина позволяет накапливать клетки на стадии метафазы, так как колхицин ингибирует синтез и сборку микротрубочек веретена деления.

Титр на черном фоне: «Давленный препарат из семенника саранчового».

Видео. Показываем, как делать давленный препарат из семенника саранчового, используя инструменты и химические реактивы.

Текст.

Для того, чтобы сделать цитологический препарат для анализа мейотических клеток, берем чистое предметное стекло, под него кладем кусочек фильтровальной

бумаги. Капаем на стекло капельку 45% уксусной кислоты. Достаем из лунки, где у нас проводилось окрашивание материала в ацетоорсеине при помощи пинцета несколько семенных фолликулов. Распределяем материал равномерно, пытаемся надорвать кончики фолликулов. Уксусная кислота постепенно испаряется, можно добавить еще. Потом берем покровное стекло, аккуратно кладем его сверху на капельку. Придерживая за уголок покровное стекло, иголкой постукиваем, чтобы раздавить фолликулы и распределить клеточную массу равномерно по стеклу. Избыток кислоты впитывается в фильтровальную бумагу, которую мы подложили под предметное стекло. После этого накрываем покровное стекло кусочком бумаги и с усилием раздавливаем. При этом стараемся давить так, чтобы покровное стекло не смещалось относительно предметного. В противном случае клетки деформируются и становятся непригодными для анализа. Фильтровальную бумагу, временный препарат готов, его можно хранить непродолжительное время на планшетке.

Слайд. Источники:

1. Бей-Биенко. Общая энтомология, Москва, 1971.
2. Музыкальный фрагмент из фильма «Хор», США, 2009

Фильм 2

Заглавный титр, заставка Digital radius:

«Часть 2. Процесс мейоза».

Текст.

Мейоз — это тип клеточного деления, в результате которого образуются гаплоидные половые клетки (например, яйцеклетки и спермии).

Слайд. Стадии мейоза.

Текст.

Мейоз похож на митоз, и вместе с тем сильно отличается. Мейоз состоит из двух клеточных делений, которые так и называют деление первое и деление второе. В интерфазе первого деления идет удвоение ДНК в хромосомах, а в интеркинезе второго деления удвоения не происходит. Благодаря этому, у диплоидных организмов, например, из диплоидных клеток после двух делений образуются гаплоидные половые клетки. В мейозе самая длинная и интересная стадия — это профазы первого деления, не зря ее разбили еще на пять подстадий: лептотену, зиготену, пахитену, диплотену и диакинез. В профазе I мейоза происходят такие важные процессы, как поиск и синапсис гомологичных хромосом, рекомбинация, репарация и транскрипция хромосом.

Слайд. Структура синаптонемного комплекса.

Текст.

В первой профазе мейоза у многих организмов образуется очень важная мейотическая структура - синаптонемный комплекс. Здесь схематично изображен его короткий фрагмент. Синаптонемный комплекс образуется между двумя гомологичными хромосомами, отцовской и материнской, и он выполняет скрепляющую функцию. Синаптонемный комплекс имеет белковую природу, и состоит из трех элементов. Два элемента принадлежат каждому из гомологов, они называются латеральные или боковые элементы. А третий элемент называется центральным и он как раз является связующим звеном. В пространстве центрального элемента образуются рекомбинационные узелки, где накапливаются ферменты и осуществляются процессы репарации и рекомбинации.

Слайд. Образование синаптонемного комплекса.

Текст.

На этом слайде, на примере двух хромосом, показано как одновременно идет процесс синапсиса и формирования синаптонемного комплекса. Уже на стадии лептотены появляются боковые элементы вдоль каждого гомолога. Теломерные концы хромосом прикреплены к ядерной мембране. Буквой ц отмечены центромерные районы, в данном случае двуплечих хромосом. К началу зиготены все теломерные концы собираются на

одном полюсе ядра, и начинается синапсис или спаривание хромосом. Между боковыми элементами встраиваются белки центрального элемента синаптонемного комплекса, образно это похоже на застегивание застежки молнии. В пахитене синапсис гомологичных хромосом завершен. А после пахитены идет постепенное разрушение синаптонемного комплекса и отталкивание гомологов друг от друга, а контакты между хромосомами сохраняются только в местах прохождения кроссинговера.

Слайд: Динамика синапсиса.

Текст.

На этой картинке показана динамика формирования синаптонемного комплекса от прелептотены до пахитены. Здесь нужно обратить внимание, что белки синаптонемного комплекса крепятся к белкам оси хромосом.

Слайд: Процесс мейоза на примере самца саранчового *Arcyptera fusca*.

Текст.

Давайте рассмотрим, какие изменения происходят с хромосомами на всех стадиях мейоза, начиная с премейотической интерфазы и до телофазы второго деления. А для примера возьмем самца саранчового *Arcyptera fusca*. На всех слайдах слева будут представлены фотографии хромосом, а справа — иллюстрации хромосом на похожей стадии.

Слайд: Премейотическая интерфаза.

Текст.

Итак, премейотическая интерфаза. В это время в ядре идет репликация ДНК, хроматиды хромосом удваиваются. Эухроматин слабо конденсирован, из-за чего окрашивается равномерно, гетехроматин выявляется в виде темных глыбок.

Слайд: Лептотена.

Текст.

Лептотена — это стадия тонких нитей. Можно кое-где видеть тонкие хроматиновые нити, из-за конденсации хромосом. В это время начинается сбор теломерных концов хромосом на одном из полюсов мейотического ядра.

Слайд: Зиготена.

Текст.

Зиготена — стадия, на которой начинается синапсис или объединение гомологичных хромосом с теломерных концов, одновременно формируется синаптонемный комплекс по типу застежки молнии. Хромосомы постепенно укорачиваются.

Слайд: Ранняя пахитена.

Текст.

Ранняя пахитена — стадия толстых нитей. К этому времени синапсис гомологов завершен, хромосомы продолжают укорачиваться и утолщаться.

Слайд. Поздняя пахитена.

Текст.

Поздняя пахитена, или диффузная, когда хроматин выглядит более диффузным по причине усиления транскрипционных процессов.

Слайд. Ранняя диплотена.

Текст.

Ранняя диплотена. Биваленты еще короче. Синаптонемный комплекс постепенно разрушается и гомологи начинают отталкиваться друг от друга.

Слайд. Поздняя диплотена.

Текст.

Поздняя диплотена. Контакт гомологов сохраняется только в районе хиазм - местах прохождения кроссинговера.

Слайд. Диакинез.

Текст.

Диакинез. Короткие и толстые биваленты разной конфигурации.

Слайд. Схема «Конфигурации бивалентов».

Текст.

На этом слайде показано, какие бывают конфигурации бивалентов, в зависимости от того, где произошел кроссинговер. Могут быть палочки, крестики, колечки. Встречаются также восьмерки.

Слайд. Метафаза I

Текст.

В метафазе первой биваленты выстраиваются на экваторе веретена деления.

Слайд. Анафаза I.

Текст.

В анафазе первой гомологичные хромосомы расходятся к разным полюсам.

Слайд. Телофаза I.

Текст.

Телофаза первая, деление завершено. После этого идет короткая стадия интеркинеза.

Слайд. Профаза II.

Текст.

Во второй профазе хромосомы одиночные, длинные и тонкие.

Слайд. Метафаза II.

Текст.

В метафазе II выстроились на экваторе деления отдельные хромосомы.

Слайд. «Анафаза II».

Текст.

Во второй анафазе расходятся хроматиды хромосом.

Слайд. «Телофаза II».

Текст.

Телофаза второго деления.

Слайд. «Сперматиды».

Текст.

После мейоза половые гаплоидные клетки у самцов становятся сперматидами и проходят несколько ступеней созревания, на этом слайде показаны сперматиды разного возраста.

Слайд. Источники:

1. Богданов Ю.Ф, Коломиец О.Л. Синаптомерный комплекс- индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. 2007.
2. Valdeolmillos A.M, Viera A., Page J. Et al. PloS 2007, V.3, 28.
<www.plosgenetics.org>

Фильм 3

Заглавный титр, заставка Digital radius:

«Поведение хромосом в мейозе. Пластилиновые модели»

Титр на черном фоне: «Первое деление мейоза»

Видео. Модель бивалента из пластилина. Одноплечие хромосомы с одной хиазмой в центре. Манипуляции с бивалентом, моделирующие стадии мейоза от пахитены до анафазы I.

Текст.

Рассмотрим, как изменяются хромосомы в мейозе. Пусть это у нас бивалент на стадии пахитены. Эти оранжевые лепёшечки маркируют центромерные районы, на которых соберутся кинетохоры (стрелки).

Две гомологичные хромосомы, один гомолог - желтого цвета, розового цвета — другой. Они соединяются друг с другом по всей длине синаптонемным комплексом. Каждый гомолог состоит из двух сестринских хроматид. Здесь произошел один обмен, вот он виден. Сестринские хроматиды связаны друг с другом белками когезинами, розовые с розовыми, желтые с желтыми.

Далее синаптонемный комплекс разрушается, и связь между гомологами исчезает. Гомологи, желтый и розовый, расталкиваются за счет броуновского движения, я их разделяю. Наш бивалент начинает конденсироваться и сжиматься, укорачиваться, становится более жестким и упругим и распрямляется. За счет чего теперь удерживаются вместе две гомологичные хромосомы? За счет наличия обмена и сцепления сестринских хроматид.

Бивалент пытается принять положение, энергетически выгодное для всех хроматид, которые вступили в обмен и которые не вступали. При такой форме бивалента хроматиды не в равноценном положении: одни прямые, другие изогнутые. Это возможно, пока бивалент пластичный. Когда он конденсируется, становится все более упругим, то разворачивается вот таким образом, образуя крестик. Сестринские хроматиды по-прежнему сохраняют связь.

Получаем вот такой бивалент. Назовем эту стадию условно метафазой I. Дальше, чтобы у нас наступила анафаза I, должно исчезнуть сцепление между сестринскими хроматидами. То есть должны быть удалены когезины, которые соединяют сестринские хроматиды вдоль плечей (стрелки), но не в центромерном районе. Вот они разрушаются, сестринские хроматиды отделяются друг от друга. Здесь тоже, но это уже не

принципиально, бивалент разделится, и хромосомы могут двигаться. Теперь, когда микротрубочки за кинетохоры растаскивают хромосомы, им это удастся. И они таким вот образом разводят две гомологичные хромосомы в разные клетки в анафазе 1. Анафаза первая таким образом завершается.

Титр на черном фоне: «Второе деление мейоза»

Видео. Продолжение. Модель бивалента из пластилина. Вариант с одной хиазмой в центре хромосомы. Моделирование стадий анафаза 1- анафаза 2.

Текст.

Продолжаем теперь уже следить за одной клеткой, за одной хромосомой. Тот кинетохор, который был в первом делении, уходит и перестраивается. Теперь уже на хромосоме формируется два кинетохора, каждая хроматида имеет свой кинетохор. Вот они образовались, и эту стадию мы условно назовем метафаза вторая. Вспомним, что сестринские хроматиды разделились вдоль плеч хромосом в прошлом делении, больше эта связь не восстанавливается. Мы отличаем клетки на стадии второго деления именно по тому, что у них сестринские хроматиды разделены, а не склеены, как в первом делении. Вот у нас хромосома, начинается разделение, разрушение когезинов в центромерном районе. В первом делении они были защищены специальным белком под названием «шугошин», а вот сейчас разрушаются именно в центромерном районе. Это вызывает разделение и расхождение хроматид во втором делении мейоза. Наступает анафаза 2. Вот хроматиды разошлись, мейоз завершён.

Титр на черном фоне: «Варианты расположения обменов»

Титр на черном фоне: «Обмен на конце хромосомы. Первое деление мейоза»

Текст.

Мы рассмотрели простейший вариант: один обмен в середине одноплечей хромосомы, крестообразный бивалент.

Видео. Последовательные кадры пластилиновой модели, иллюстрирующие первое деление мейоза в одноплечей хромосоме с обменом на конце.

Текст.

Теперь пусть обмен локализуется на дистальном конце хромосомы, т.е. на противоположном конце от центромеры. Тогда бивалент будет выглядеть как вытянутый крест или «палочка». Стрелки показывают, в каком направлении будут расходиться хромосомы.

Видео. Переставили кинетохоры на другой конец хромосом. Стрелки указывают направление расхождения.

Текст.

А вот так выглядит бивалент с обменом в проксимальной части хромосомы, т.е. около центромерного района. Расходятся хромосомы будут так.

Титр на черном фоне: «Первое деление мейоза. Две хиазмы».

Текст.

Теперь давайте рассмотрим бивалент более сложной конфигурации. Пусть хромосома двуплечая, в каждом плече по обмену.

Видео: Серия последовательных снимков пластилиновой модели двуплечей хромосомы с двумя хиазмами, первое деление.

Текст.

Рассмотрим события с самого начала. Это две гомологичные хромосомы. Условно – стадия лептотена. Они синаптируют- сближаются - условно – зиготена. Сделаем рекомбинационный обмен. Не пытаюсь точно воспроизвести молекулярные механизмы, сразу смоделируем итог этого события: по одной хроматиде из каждого гомолога разрезается и сшивается с хроматидой другого. Обмен выглядит как перекрест – хиазма - и так же называется. Аналогичным образом делаем второй обмен в другом хромосомном плече. Эти события происходят в пахитене.

Далее наступает диплотена, когда синаптонемный комплекс, сближающий гомологи, разрушается. Гомологи конденсируются и отталкиваются друг от друга. Бивалент конденсируется и принимает характерный вид, напоминающий кольцо – стадия соответствует диакинезу – метафазе 1. Наконец, сестринские хроматиды разделяются, наступает анафаза1, гомологи расходятся.

Титр на черном фоне: «Второе деление мейоза. Две хиазмы».

Видео: Серия последовательных снимков пластилиновой модели двуплечей хромосомы с двумя хиазмами, второе деление.

Текст.

Второе деление мейоза. Расходятся хроматиды двуплечей хромосомы. Они рекомбинантные.

Фильм 4

Заглавный титр, заставка Digital radius:

«Сперматогенез саранчового *Arcyptera fusca*».

Видео: Фотография отпрепарированных семенников саранчового, стрелка указывает на отдельные семенные фолликулы.

Текст.

Рассмотрим, как организуется сперматогенез в семеннике саранчового. Семенник представляет собой пучок из нескольких трубчатых фолликулов, один конец которых слепой, а другой открывается в семяпровод. В неокрашенном семеннике хорошо видна зона, занятая спермиями: пучки спермиев подобны световодам и блестят в свете лампы.

Титр на черном фоне: «Тотальный препарат семенника».

Видео: Изготовление тотального препарата.

Текст.

Фиксированный семенник окрашивают в ацетоорсеине в течение одного или нескольких часов. Отмывают лишнюю краску в 45% уксусной кислоте и в дистиллированной воде. На препарат в каплю глицерина помещают целые, неповрежденные фолликулы и накрывают покровным стеклом.

Видео: Серия снимков вдоль семенного фолликула от кончика до конца.

Текст.

Это снимок с тотального препарата семенного фолликула. Можно наблюдать клетки на разной глубине, опуская или поднимая объектив микроскопа. Видны группы клеток, синхронно проходящих последовательные стадии сперматогенеза – их называют **цисты**.

Рассмотрим серию снимков, сделанных вдоль фолликула. В самом его кончике находятся стволовые клетки зародышевой линии. Они делятся, образуя сперматогонии, гонии делятся несколько раз, образуя цисту. Клетки цисты сохраняют связь между собой за счет неполного цитокинеза, они объединены общей цитоплазмой и движутся вдоль фолликула компактной группой. Кроме того, их охватывают, как мешком, цистные клетки соматического происхождения. В кончике фолликула мы наблюдаем клетки на разных стадиях митоза и раннюю профазу мейоза. Здесь пахитена. Тут пахитена и появились клетки после первого деления. В этом районе видна метафаза первого деления и телофаза. А ближе к концу фолликула располагаются цисты сперматид, проходящих спермиогенез.

На тотальном препарате можно изучать относительное расположение клеток и цист. Но морфологию отдельных клеток и хромосом лучше изучать на препаратах, приготовленных другим способом.

Титр на черном фоне: «Давленный препарат семенного фолликула».

Видео: Поле микроскопа, увеличение 10x10, препарат семенника.

Текст.

Окрашенные семенные фолликулы раздавливают в капле уксусной кислоты, как показано в предыдущем фильме. Клетки из объемных становятся плоскими, хромосомы ложатся в одной плоскости, что удобно для анализа. Но при таком способе приготовления препарата клетки из соседних цист оказываются рядом и могут перемешиваться.

Примерно такую картину мы наблюдаем, просматривая давленный препарат семенника саранчового. В поле микроскопа мы видим длинные нитевидные структуры (Zoom). Это пучки спермиев, которые образовались из клеток одной цисты. У них нитевидные головки (стрелка) и длинные хвосты (стрелка).

Большую часть препарата занимают клетки с округлыми ядрами двух размеров. Их сферическая форма свидетельствует о том, что они имеют отношение к мейозу. Размеры ядер этих клеток пропорциональны количеству хромосом или содержанию ДНК (Zoom). Крупные клетки готовятся первому делению мейоза и находятся на стадиях пахитены (стрелка) и метафазы 1 (стрелка). Содержание ДНК у них $4C$, хромосомный набор $2n$, каждая хромосома состоит из 2-х сестринских хроматид.

Клетки более мелкие (Zoom) претерпели одно деление мейоза (стрелка), содержание ДНК у них $2C$.

Это диакинез- метафаза 1. Мы видим 12 фигур – это 11 бивалентов и унивалент X-хромосомы, он отмечен стрелкой. Хромосомы уже ориентированы относительно полюсов. И клетки видны в разной ориентации. Здесь мы наблюдаем клетку с полюса, а здесь с экватора.

В этом поле зрения мы видим клетки на стадии ранней диплотены, а это метафаза 2. Здесь тоже диплотена.

Здесь анафаза первая, видно, как биваленты разделяются на отдельные гомологи. Это ранние анафазы, где хромосомы только слегка отошли друг от друга, еще читается форма бивалента. Это более поздняя, продвинутая анафаза.

Тут анафазы первые завершены. Рядом попались клетки на стадии зиготены.

Здесь также анафазы первые и телофазы этого же деления, хромосомы деконденсируются.

Здесь уже упомянутые стадии. А это клетки во втором делении: метафаза вторая в проекции с полюса и с экватора.

Здесь снова метафаза 2. В одной клетке 11 аутосом без X. В другой 11 аутосом и X. Здесь хроматиды расходятся – анафаза 2.

Тут снова метафаза 2. Можно посчитать число хромосом. В этом поле зрения мы наблюдаем более редкое событие, чем мейоз. Это ядра клеток, гибнущих апоптозом.

Тут мы видим группы сперматид на разных стадиях процесса формирования, их ядра сферические, овальные и веретеновидные. Это на большем увеличении. Орсеин не красит хвосты спермиев, они могут быть видны по преломлению света с этого конца. Обратите внимание, в уголке этого снимка изображена масштабная линейка длиной 50 микрометров. Она выставляется автоматически. С ее помощью мы можем оценить размеры объектов. Например, диаметр ядра на стадии пахитены и диплотены – около 100 микрометров. Размеры хромосом на стадии диакинеза – 10-30 микрометров.

Фильм 4

Заглавный титр, заставка Digital radius:

«Мейоз у растений»

Титр на черном фоне: «Этапы развития пыльцевого зерна из материнской клетки пыльцы»

Видео. Схема развития пыльцы. Крупно показываем последовательные этапы.

Zoom на материнские клетки пыльцы.

Текст.

Рассмотрим этапы развития пыльцы.

В пыльнике расположены первичные спорогенные клетки, которые делятся митозом несколько раз, образуя микроспороциты или материнские клетки микроспор (*).

Микроспороциты вступают в мейоз. До мейоза материнские клетки микроспор связаны друг с другом и с клетками оболочки пыльника – тапетума- цитоплазматическими мостиками – плазмодесмами. Перед стадией лептотена микроспороциты быстро начинают обволакиваться слоем каллозы (*), это нерастворимый в воде полисахарид глюкозы. По мере роста слоя каллозы плазмодесмы исчезают, но некоторые районы каллозой не покрываются, там сохраняются широкие цитоплазматические каналы. Их называют цитомиктическими. В результате у большинства растений все микроспороциты пыльника связаны между собой и представляют синцитий. Это позволяет синхронизировать начальные фазы мейоза.

Далее каналы начинают постепенно исчезать, и к началу второго деления микроспороциты полностью изолируются друг от друга.

Видео: Zoom на клетки после первого деления мейоза.

Текст:

Микроспороциты проходят 2 мейотических деления. После первого образуется диада микроспор: это две дочерние клетки, объединенные одной каллозной оболочкой.

Видео: Zoom на тетрады.

Текст:

После второго деления под этой же оболочкой образуется тетрада. Она состоит из конечных продуктов мейоза – гаплоидных клеток: число хромосом n , каждая содержит одну хроматиду.

Видео: Электронограмма среза тетрады микроспор.

Текст:

А так выглядит тетрада под электронным микроскопом. Видны три клетки, которые попали в срез, их ядра и каллозная оболочка.

Оболочка пыльцевого зерна формируется в каждой споре тетрады вокруг мембраны и называется примэкзина (первичная экзина). После этого клетки тапетума выделяют фермент коллазу, разрушающий каллозную оболочку.

Видео: Zoom на отдельные споры.

Текст:

Тетрады разделяются на отдельные споры. Они быстро увеличиваются в размерах. Формируется спородерма- целлюлозная оболочка пыльцы различной формы.

Видео: Zoom на гаметофит с двумя ядрами.

Текст:

Далее происходит спермиогенез – развитие мужского гаметофита. Гаплоидное ядро микроспоры делится митозом, образуя две клетки, различающиеся по форме и судьбе. Более крупная, с округлым ядром – вегетативная, другая значительно меньше, часто веретеновидная – генеративная клетка.

Видео: Электронограмма среза двуклеточного мужского гаметофита.

Текст: А это срез мужского гаметофита на стадии двух клеток под электронным микроскопом. Видна более крупная клетка - вегетативная, с запасами крахмала и липидов, в ней более мелкая – генеративная. Также видна спородерма – целлюлозная оболочка пыльцы.

Видео: Электронограмма сканирующего микроскопа зрелых пыльцевых зерен различных растений.

Текст:

Так выглядят зрелые пыльцевые зерна различных растений под сканирующим электронным микроскопом.

Видео: Zoom на трехклеточное пыльцевое зерно.

Текст:

У многих растений генеративная клетка делится еще в пыльце, образуя 2 спермия с тонкой оболочкой, которые растут и развиваются за счет вегетативной клетки.

Видео: Zoom на проросший мужской гаметофит с пыльцевой трубкой.

Текст:

Попадая на пестик, пыльцевое зерно прорастает. Это вегетативная клетка образует трубочку, по которой мигрируют оба спермия. Один оплодотворяет яйцеклетку, другой – два центральных ядра женского гаметофита, образуя триплоидный эндосперм.

Титр на черном фоне: «Мейоз у растений на примере саранки *Lilium martagon*»

Видео. Микрофотографии стадий мейоза саранки: пахитена, диплотена ранняя, поздняя диплотена, метафаза 1, анафаза 1, телофазы 1 ранняя и поздняя, метафаза 2, телофаза 2, пыльцевое зерно.

Текст.

Рассмотрим фазы мейоза на примере саранки.

Это пахитена. В ядре клубок из хромосом. Видно сферическое ядрышко.

Диплотена ранняя. Биваленты длинные, видны отдельные гомологи.

Более поздняя диплотена. Видны более короткие биваленты, свободно лежащие в ядре, и сферическое ядрышко. Каллозный слой еще тонкий.

Две клетки на стадии метафазы 1. Биваленты построены в экваториальной плоскости, видно веретено деления. Хорошо заметна каллозная оболочка с утолщениями.

Еще одна клетка в метафазе первой в разном фокусе.

Снова первая метафаза.

Две клетки на стадии анафазы 1. Здесь хромосомы только начали расходиться, здесь более поздняя анафаза, они отошли к полюсам.

Это телофаза 1 ранняя, хромосомы отошли к полюсам и образовались ядра. Видны полюсные микротрубочки веретена.

Это телофаза 1, перпендикулярно остаткам веретена строится клеточная стенка.

Поздняя телофаза 1. Цитокинез завершен, образовалась клеточная стенка, веретена уже не видно. Хорошо заметна каллозная оболочка. Возникла диада. Мы видим, что у саранки сукцессионный тип образования тетрад: цитокинез происходит после каждого деления мейоза.

Диада вступила во второе деление мейоза. Метафаза 2, видно веретено деления, каллозную оболочку.

Еще две клетки на стадии метафазы 2

Ранняя телофаза 2. Хромосомы разошлись, начала строиться клеточная стенка.

Образуются тетрада микроспор.

Титр на черном фоне: «Типы тетрад»

Видео. Схема различных типов тетрад в разной проекции.

Текст.

Микроспоры в тетрадах располагаются в определенном порядке, который является систематическим признаком. Выделяют 5 типов: линейное (Рис. 1), тетраэдрическое (2, 3)- это и это в разных проекциях, крест-накрест (4, 5)- также в разных проекциях, Т-

образное (6), ромбическое и изобилатеральное (8). Как можно заметить, на расположение тетрад влияет ориентация веретен второго деления мейоза относительно первого и друг друга. Наиболее часто встречаются тетраэдрическое (это, в основном, двудольные) и изобилатеральное (в основном, однодольные). Тип расположения тетрад является систематическим признаком.

Видео: Пыльцевое зерно.

Текст.

А это зрелое пыльцевое зерно. Каллозная оболочка заменилась на спородерму. Видны два ядра: сферическое - вегетативное и серповидное - генеративное.

Титр на черном фоне: «Источники

1. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений. Т.5(1), 1980.
2. Жуковский П.М. Ботаника, М.: «Высшая школа», 1964.
3. Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976.
4. В.П.Тыщенко ФИЗИОЛОГИЯ НАСЕКОМЫХ МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1986
5. Цитология растений. М.: «Агропромиздат», 1987.»