

УДК 58.085:581.143.6:581.3

ФЕНОМЕН “СИАМСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ” У ЗЛАКОВ *IN VIVO* И *IN VITRO*: КЛИВАЖНАЯ ПОЛИЭМБРИОНИЯ И ФАСЦИИ

© 2016 г. Г. Е. Титова¹, О. А. Сельдиминова², Н. Н. Круглова², И. Р. Галин², **Т. Б. Батыгина¹**

¹Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2

²Уфимский Институт биологии РАН
450054 Уфа, пр. Октября, 69

E-mail: galina_titova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.11.2015 г.
Окончательный вариант получен 19.11.2015 г.

Проведен детальный анализ генезиса микроспориальных полиэмбриоидов пшеницы *in vitro* и идентифицирована природа различных фенотипов полимерных зародышей злаков из класса “Множественные меристемы побега” – результат кливажной полиэмбрионии, сопровождающейся фасциациями органов всех трех известных типов (радиальная, плоская, кольцевая). Внесено уточнение в морфологическую природу органов зародыша злаков: меристема побега – осевой орган, щиток – латеральный вырост этой оси, колеоптиль – производный меристемы побега, но сросшийся со щитком; терминальность щитка – результат линейной фасциации и искривления оси зародыша, произошедшей в историческом прошлом. Дано объяснение структурного механизма реализации модели полярного транспорта ауксина при становлении билатеральной симметрии в зародыше злаков, связанного с инверсией поляризации белка-переносчика PIN1 на мембранах его клеток и, соответственно, транспорта ауксина, осуществляемого этим переносчиком (Fischer-Iglesias et al., 2001; Forestan et al., 2010).

Ключевые слова: андрогенез *in vitro*, *Triticum aestivum* L., эмбриогенез, сиамские зародыши, кливажная полиэмбриония, фасциации, микроспориальный эмбриоид, полиэмбриоид.

DOI: 10.7868/S047514501603006X

ВВЕДЕНИЕ

Феномен андрогенеза *in vitro* (андроклинии) состоит в переключении морфогенетической программы развития гаплоидных клеток пыльника под действием внешнего стрессового фактора с обычного гаметофитного пути, связанного с образованием пыльцевого зерна, на иной путь – спорофитный, ведущий к формированию гаплоидного растения-регенеранта; при этом клетки реализуют свой потенциал различными путями морфогенеза *in vitro* (обзоры и монографии последних лет: Круглова и др., 2005; Seguí-Simarro, Nuez, 2008; Батыгина и др., 2010; Seguí-Simarro, 2010; Batygina, 2011; Батыгина, 2014 и др.). Один из путей спорофитного развития гаплоидных клеток пыльника – прямой эмбриогенез, состоящий в формировании эмбриоида – биполярной зародышеподобной структуры – непосредственно из инициальной клетки пыльника, как правило, микроспоры. Микроспориальный эмбриогенез интенсивно исследуется (обзоры: Seguí-Simarro, 2010; Soriano et al., 2013; Сельдиминова, Круглова, 2014).

В ряде работ, посвященных различным аспектам микроспориального эмбриогенеза злаков *in vitro*, упоминается о формировании особого типа эмбриоидов с множественными, часто слившимися в той или иной степени, органами – щитками, побегами с листьями, иногда корнями, или приводятся иллюстрации экспериментально полученных структур, выглядящих как сросшиеся в разной степени зародыши (обзор: Сельдиминова, Круглова, 2014). Образование зародышей с множественными органами (полимерных зародышей) у различных представителей цветковых растений может происходить спонтанно *in vivo* (Nishimura, 1922; Naccius, 1955; Erdelska, Vidovencova, 1992) или быть индуцировано различными обработками *in situ*: синтетическими ауксинами (Яковлев, Снегирев, 1954; Naccius, 1955; Ferguson, McEwan, 1970; Ferguson et al., 1979; Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994), рентгеновским облучением (Morgan, Rappleye, 1951; Osone, Oono, 1970), ингибиторами полярного транспорта ауксинов (Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001; Rober-Kleber et al., 2003).

Существенный вклад в понимание строения полимерных зародышей и физиологического механизма их возникновения у однодольных растений внесли К. Фишер с соавт. (Fischer et al., 1997), индуцировавшие их образование воздействием на изолированные зародыши пшеницы *in vitro* (в глобулярной стадии и стадии перехода к органо-генезу) ингибиторами полярного транспорта ауксина — нафтилфталамовой кислотой и кверцетином. Авторы дали описание числа и топографии множественных органов в сформированных полимерных зародышах, выделив 2 класса их фенотипов — класс “Множественные щитки” и класс “Множественные меристемы побегов” (включаяющий группы фенотипов “Сердечковидные сиамские зародыши” и “Сиамские зародыши спина-к-спине”). Они установили четкую зависимость частоты возникновения каждого фенотипа от типа и концентрации примененных ингибиторов, а также от стадии развития зародышей. Авторы предположили, что физиологический механизм формирования полимерных зародышей состоит в нарушении полярных потоков ауксинов в процессе становления их билатеральной симметрии и предложили модель синтеза и транспорта ауксина при переходе зародыша однодольных (Роасеае) от глобулярной стадии к органогенезу.

Следует отметить, что специальный термин для определения полимерных зародышевых структур в литературе отсутствует, что обусловлено главным образом недостаточными знаниями о природе их возникновения (генезисе и специфике заложения органов). Несмотря на наличие определенных данных о развитии этих структур *in vivo* и *in vitro*, а также физиологическом механизме их образования, интерпретация их природы остается спорной. Одни авторы рассматривали их как проявление кливажной полиэмбрионии (Naccius, 1955; Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994), другие считали применение к таким структурам термина “кливажные зародыши” неправомерным, так как составляющие их компоненты не являются полностью самостоятельными (Ferguson et al., 1979). Высказывалось даже мнение о том, что полимерные образования следует относить к разряду явления “вегетативной полиэмбрионии” — своеобразного растительного “педогенеза” (“детского размножения”), возникающего партеногенетически под действием ростовых веществ (Яковлев, Снегирев, 1954). В своих исследованиях полимерных зародышевых структур, полученных в культуре *in vitro* пыльников пшеницы (Сельдимирова и др., 2013, 2015), мы придерживаемся наиболее корректного (с нашей точки зрения) термина “полиэмбрионид” (по: Brisibe et al., 2000), соответствующего термину “polyembryo”, применяющемуся для характеристики аналогичных явлений в условиях *in vivo* (Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994).

Цель настоящей работы состояла в идентификации морфологической природы полимерных зародышей злаков с использованием в качестве модели микроспоридных полиэмбрионидов пшеницы и детального анализа заложения и развития их органов методами световой и сканирующей электронной микроскопии (в сравнении с аналогичными показателями микроспоридных эмбрионидов и зиготических зародышей пшеницы).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования послужила яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта Жница с высокой частотой образования полиэмбрионидов *in vitro*. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара УИБ РАН (Уфимский р-н).

Эмбриониды и полиэмбриониды получали методом культуры *in vitro* пыльников пшеницы (Круглова, Батыгина, 2002) с использованием среды Potato II (Chuang, Quyang, 1978), дополненной 0.2 мг/л кинетина и 0.5 и 1 мг/л 2,4-Д, соответственно. В течение первых 9 сут культивирования эмбриониды и полиэмбриониды изучали методом световой микроскопии (СМ) (Круглова и др., 2013), а начиная с 10 сут — методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с последующим анализом тех же образцов методом СМ (Батыгина и др., 2010). Зиготические зародыши получали путем искусственного опыления и изучали методом СЭМ с последующим анализом тех же образцов методом СМ.

Для исследования методом СЭМ образцы фиксировали в смеси FAA (Berlin, Miksche, 1976) и промывали в трех порциях 70%-го этанола (по 15 мин в каждой порции). Обезвоживание проводили: а) в серии водных растворов этанола возрастающей концентрации: 80, 90, 96, 100% (I) и 100% (II) — по 30 мин в каждом растворе; б) в 2-х порциях смеси ацетона со 100%-м этанолом (в соотношении 1 : 1), 3-х порциях ацетона, смеси ацетона и изоамилацетата (1 : 1) и нескольких порциях чистого изоамилацетата — по 15 мин в каждом растворе. Образцы высушивали с помощью прибора “Critical point” (Hitachi, Japan, с напылением золотом в вакууме) и изучали на сканирующем электронном микроскопе (JSM 35, JSM-6390, Jeol, Japan) на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием “Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов” БИН РАН.

Для приготовления постоянных препаратов образцы после их анализа методом СЭМ выдерживали в 70%-м растворе этанола и заключали в гисторезину Техновит 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Germany) согласно рекомендациям производителя. Полутоновые срезы (2–5 мкм) получали на микротоме HM 325 (Microm, Germany) и окрашивали 1%-ным толуидиновым синим (Lynn, 1965).

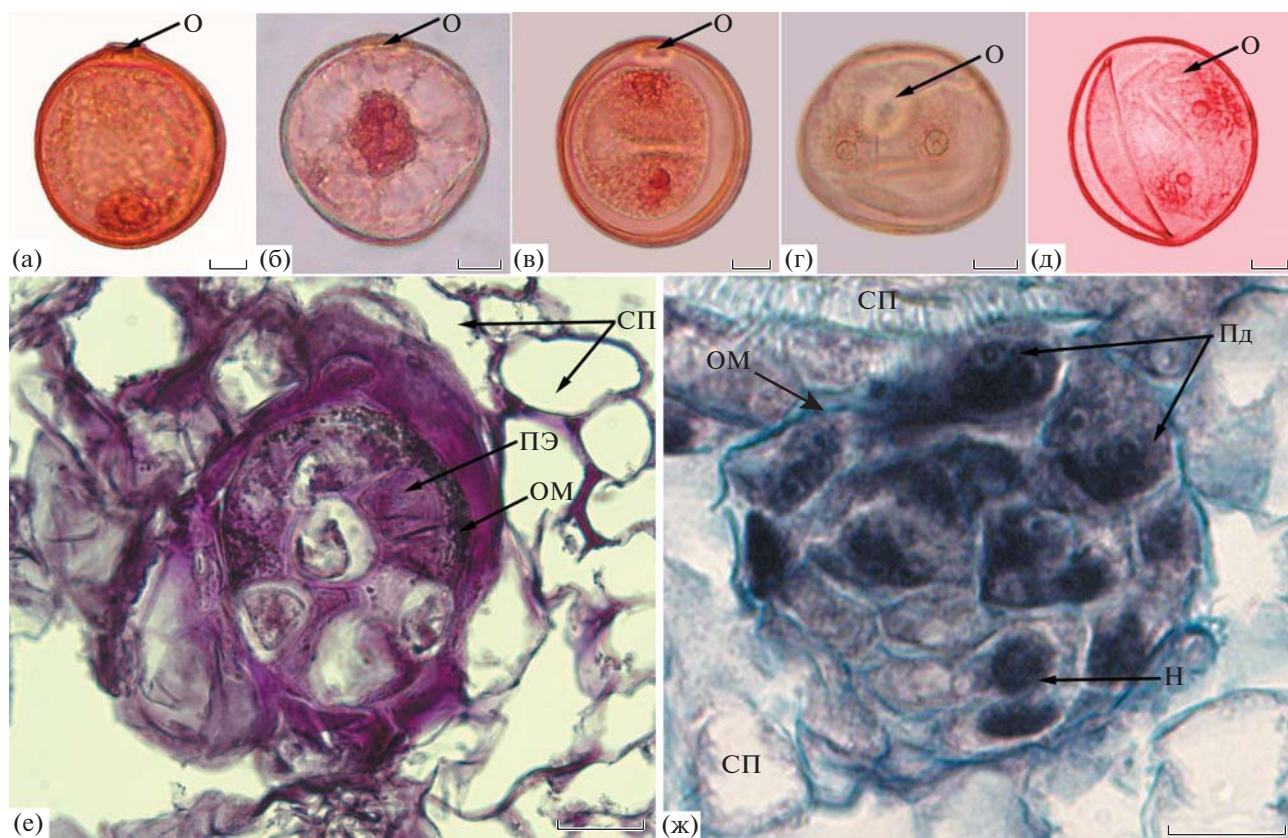


Рис. 1. Начальные стадии развития полиэмбрионов. а – инициальная клетка полиэмбриоида – сильновакуолизирующая микроспора с выраженной полярностью; б – деполаризованная микроспора; в–д – варианты равного деления относительно оси микроспоры: поперечное (в), продольное (г), наклонное (д); е – многоклеточный полиэмбрион, окруженный оболочкой микроспоры; ж – полиэмбрион со сформированной апикально-базальной осью и началом отделения клеток протодермы. а–д – СМ, давленные препараты; е, ж – СМ, постоянные препараты, продольные срезы. Н – ножка, О – оперкулум, ОМ – оболочка микроспоры, Пд – протодерма, ПЭ – полиэмбрион, СП – стенка пыльника. Шкала: а–д – 10 мкм, е, ж – 50 мкм.

Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager A1, Zeiss (Germany) и фотографировали с применением цифровой камеры AxioCam MRC 5, Zeiss (Germany) на базе Центра коллективного пользования УИБ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В условиях выполненных экспериментов отмечено преимущественное формирование полиэмбрионов пшеницы, которые, в соответствии с классификацией К. Фишер с соавт. (1997), относятся к классу фенотипов “Множественные меристемы побегов”, тогда как полиэмбриониды класса фенотипов “Множественные щитки” выявлены в единичных случаях (подробнее см. Сельдимирова и др., 2015). Поэтому нами было проведено исследование развития полиэмбрионидов лишь класса фенотипов “Множественные меристемы побегов”.

Начальные стадии развития полиэмбрионидов всех выявленных фенотипов класса “Множественные меристемы побегов” отражены на рис. 1. В те-

чение 1–9 сут культивирования последовательно происходят: процесс деполаризации инициальной клетки полиэмбрионидов – сильновакуолизирующей микроспоры (рис. 1а, 1б); ее равное (симметричное) деление (рис. 1в–1д); неупорядоченные первые деления дочерних клеток с образованием многоклеточных структур, состоящих из меристематических клеток и расположенных в пределах оболочки микроспоры; постепенное становление полярной организации таких структур (концентрация клеточных делений в их апикальной части и вакуолизация клеток в базальной части с образованием своеобразного суспензора – “ножки”) (рис. 1е). К 9 сут культивирования апикальная часть полиэмбрионидов приобретает радиальную симметрию, а в ее поверхностном слое начинаются периклинальные деления клеток, связанные с отделением протодермы (рис. 1ж). Все эти процессы, вероятно, протекают сходно и в соответствии с таковыми у ранее изученных эмбрионидов пшеницы (в контексте данной работы корректнее – “моноэмбрионидов”) (Круглова и др., 2005).

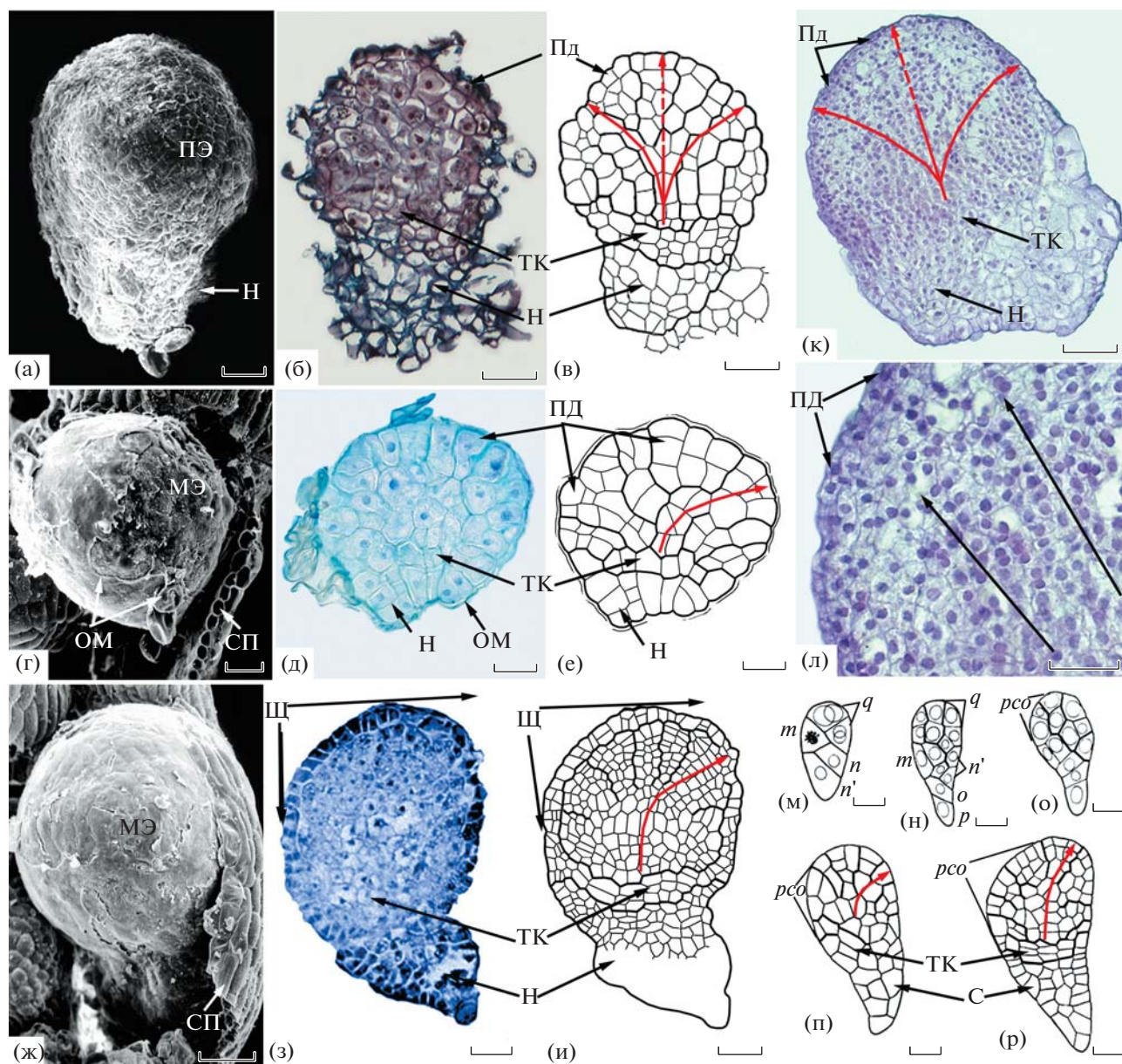


Рис. 2. Ранне-глобулярная стадия развития полиэмбриоидов, моноэмбриоидов и зародышей. а–в, к, л – полиэмбриоид; г–и – моноэмбриоид, м–р – зародыш. а, г, ж – СЭМ; б, д, з – СМ, постоянные препараты, продольные срезы; в, е, и – клеточные ряды в структурах, представленных на фотографиях срезов (а, г, ж), соответственно, схематизировано; к, л – строение полиэмбриоида по завершении ранне-глобулярной стадии развития (к) и фрагмент его апикальной части с радиальными рядами периклинально делящихся клеток (черные стрелки) увеличено (л); м–р – формирование радиальных рядов клеток в зародыше при переходе от стадии проэмбрио к ранне-глобулярной стадии развития (по: Батыгина, 1974 с изменениями). Красные стрелки: на (в, к) – первичная и вторичные оси полиэмбриоида (пунктирная и сплошная линии, соответственно); на (е, и, п, р) – искривленная ось зародыша/моноэмбриоида. МЭ – моноэмбриоид, ПД – периклинальные деления, С – суспensor, ТК – таблитчатые клетки, Ш, *рсо* – шиток, *m, n, n', o, p, q* – бластомеры зародыша. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Шкала: а–е, л – 50 мкм, ж–к – 100 мкм, м–р – 25 мкм.

На 10–12 сут культивирования апикальная часть полиэмбриоидов существенно увеличивается в размерах (при сохранении радиальной симметрии), а в их базальной части (на границе с “ножкой”) отмечается начало дифференциации зоны особых таблитчатых меристематических клеток (рис. 2а–2в), соответствующих инициа-

лям колеоризы и чехлика первичного корня зиготического зародыша пшеницы (Батыгина, 1974). Одновременно в центральной части полиэмбриоидов становятся заметными ряды клеток, радиально расходящиеся от базальной зоны таблитчатых меристематических клеток в направлении поверхности апикального домена (рис. 2в). При этом ряды

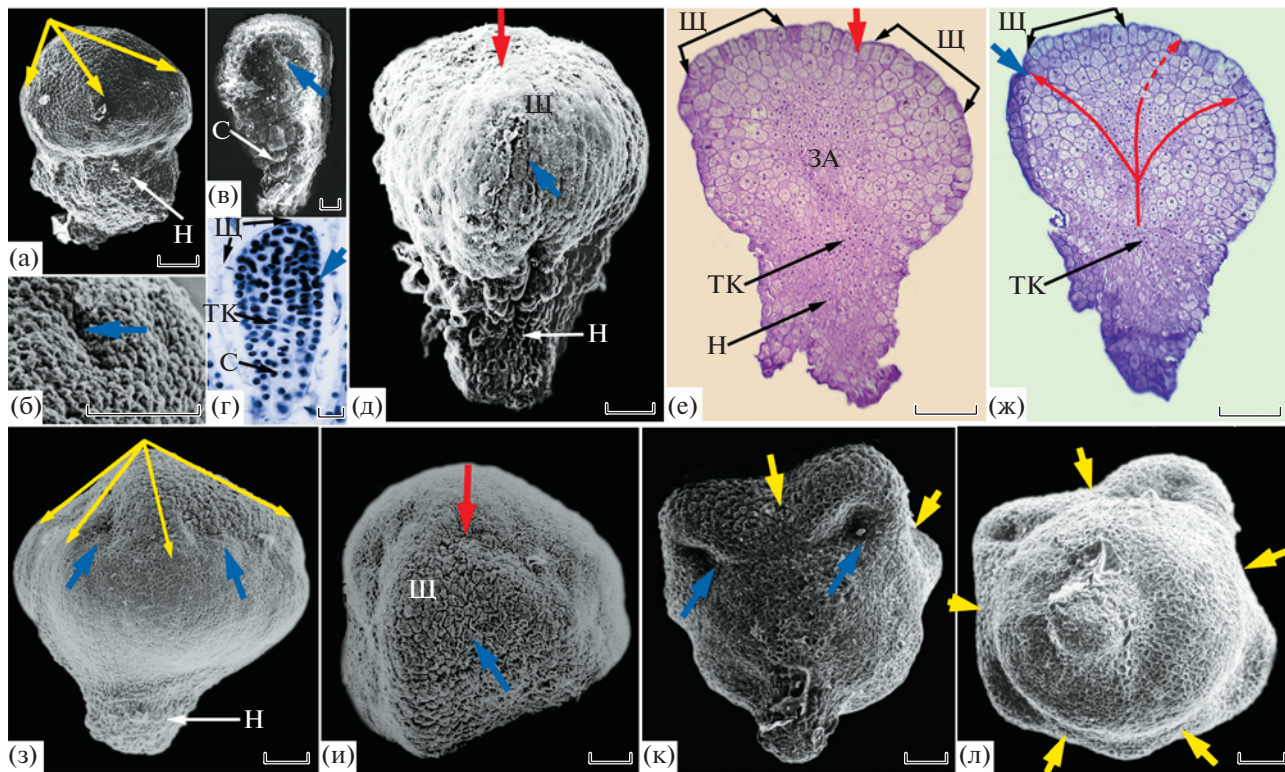


Рис. 3. Переход от поздне-глобулярной стадии развития к стадии заложения органов у полиэмбрионидов фенотипов “Сиамские зародыши спина-к спине” (пентамерные варианты). а, б, д–л – полиэмбриониды; в, г – зародыш. а–в, д, з–л – СЭМ, е, ж – СМ, постоянные препараты, г и е, ж – строение зародыша/полиэмбриоида, изображенных на фото (в) и (д) на продольных срезах, соответственно; и – вид полиэмбриоида, изображенного на фото з, сверху, л – вид полиэмбриоида, представленного на фото к, снизу. Красные жирные стрелки – зона верхушки затухающей первичной оси полиэмбриоида, синие стрелки – меристема побега, желтые стрелки – границы щитков. ЗА – зона формирования будущих анастомозов проводящей ткани составляющих единиц полиэмбрионидов. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 2. Шкала: а–б, д–л – 100 мкм, в – 10 мкм, г – 25 мкм.

периклиально делящихся клеток оканчиваются непосредственно в поверхностном слое клеток полиэмбриоида, которые продолжают делиться периклиально, вследствие чего протодерма как слой не формируется. За счет делений клеток в радиальных рядах осуществляется расширение апикальной части полиэмбрионидов, достигающих ранне-глобулярной стадии в особом состоянии – без оформления протодермы (рис. 2а–2в). Сходные процессы отмечаются и при формировании моноэмбрионидов пшеницы (рис. 2г–2е), хотя последние характеризуются ранним становлением дорсовентральности строения – быстрым односторонним апикально-латеральным разрастанием и искривлением оси (рис. 2ж–2и), как и в зиготическом зародыше пшеницы (рис. 2м–2р). Кроме того, базальная зона таблитчатых клеток у полиэмбрионидов (вследствие их многоклеточности) является более широкой по сравнению с моноэмбриоидами и особенно с зиготическими зародышами, благодаря чему наблюдаемые в ходе их развития процессы заметны особенно четко.

На 15–17 сут культивирования радиальные ряды клеток и базальная зона таблитчатых клеток в полиэмбриоидах, находящихся на ранне-глобулярной стадии развития, становятся все более отчетливыми, а их апикальная часть еще более увеличивается в размерах. При этом наружные производные делений клеток радиально расходящихся рядов, ближе к периферии полиэмбрионидов, становятся более крупными, чем меристематические клетки этих рядов в их центральной части (рис. 2к, 2л).

С ранне-глобулярной стадии в развитии полиэмбрионидов начинается явное расхождение, приводящее к возникновению их разных фенотипов.

Развитие полиэмбрионидов класса фенотипов “Множественные меристемы побега. Сиамские зародыши спина-к-спине”. Полиэмбриониды данного класса фенотипов характеризуются заложением в их апикальной части до 2–5 меристем побега и соответствующих им щитков, обращенных друг к другу дорсальной стороной, как правило, объединенных общим корневым полюсом. Такие полиэмбриониды представляют полимерные структуры с радиальным расположением отдельных еди-

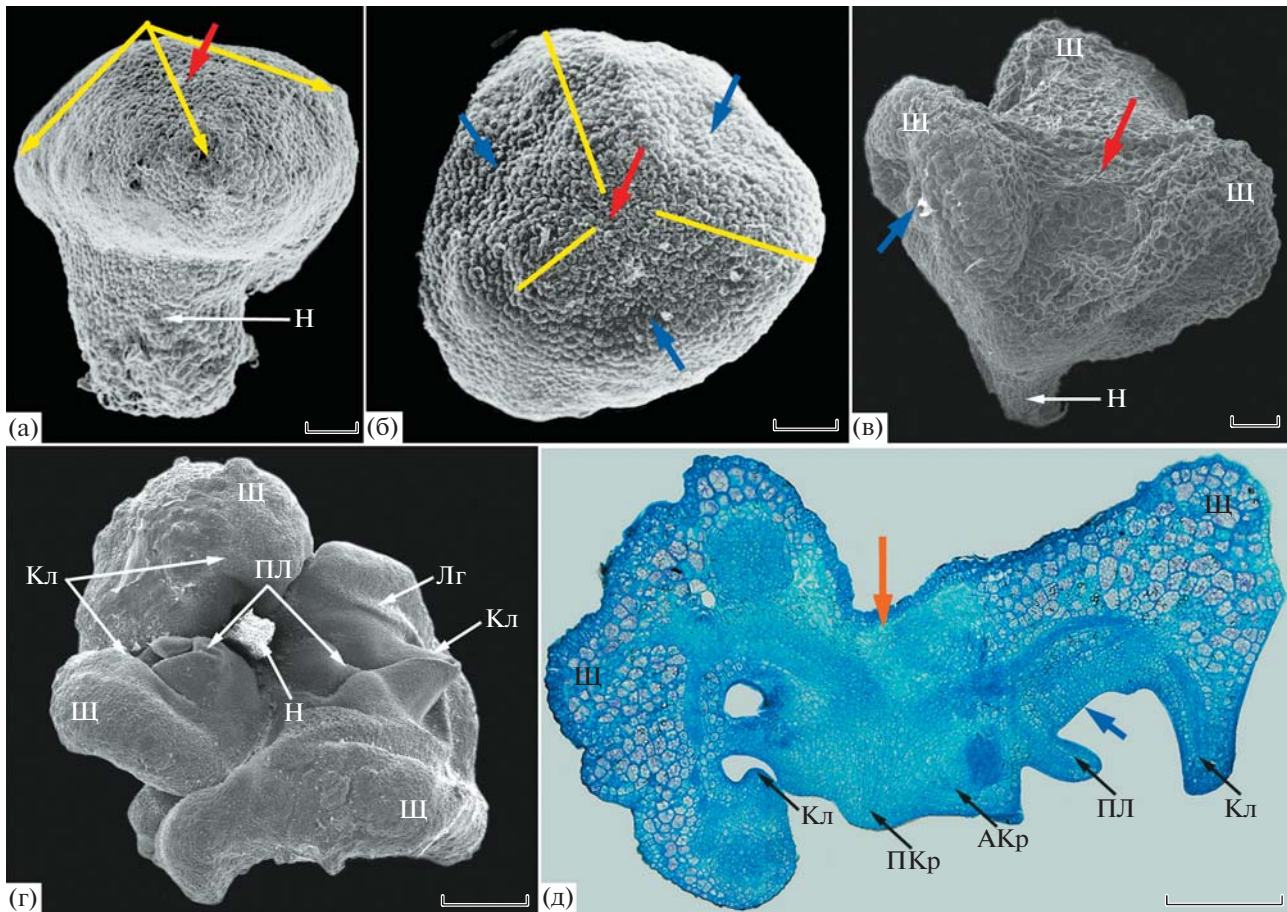


Рис. 4. Переход от поздне-глобулярной стадии к стадии заложения органов у полиэмбрионов с фенотипом “Сиамские зародыши спина-к спине” (тримерные варианты). а–г – СЭМ; д – строение полиэмбриоида, изображенного на фото (г) на продольном срезе, СМ, постоянный препарат. АКр – адвентивный корень, Кл – колеоптиль, ЛГ – лигула, ПЛ – первый лист, ПКр – первичный корень. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 2. Шкала: а–в – 100 мкм, г–д – 500 мкм.

ниц (относительно продольной, первичной, оси эмбриоида – см ниже), каждая из которых имеет дорсовентральное строение и терминальное положение щитка относительно меристемы побега. Щитки и меристемы побегов радиально расположенных единиц частично латерально объединены в своей проксимальной части (рис. 3–5).

В зависимости от числа составляющих единиц и вариантов их симметрии, полиэмбриониды этого класса фенотипов можно разделить на следующие категории: пентамерные полиэмбриониды с 5 щитками, соответствующим числом меристем побегов и колеоптилей и с углом дивергенции между щитками в 70° (рис. 3а, 3д, 3з–3л); тримерные – с 3 щитками и соответствующим числом меристем побегов и колеоптилей и с углом дивергенции между щитками в 120° (рис. 4а–4в); димерные – с 2 щитками, 2 меристемами побегов и 2 колеоптилями, с углом дивергенции между щитками в 180° (рис. 5а, 5б).

Развитие полиэмбрионидов данных фенотипов после ранне-глобулярной стадии (независимо от типа симметрии и числа органов) характеризуется продолжением увеличения размеров их апикального домена при сохранении его радиальной симметрии. За счет продолжающихся делений в радиально расходящихся рядах клеток апикальная часть полиэмбрионидов к 18–20 сут культивирования значительно расширяется, достигая в диаметре до 700 мкм, а сами полиэмбриониды (к поздне-глобулярной стадии развития) приобретают вид “грибков” (рис. 3а; 4а; 6а).

Далее, на стадии перехода к органогенезу (20–21 сут), по периферии апикальной части полиэмбрионидов (по кольцу, в местах наибольшего искривления поверхности) происходит заложение множественных меристем побега и щитков, имеющих вид небольших протуберанцев (рис. 3а, 3б; 4а, 4б), как у моноэмбрионидов (рис. би) и зиготических зародышей (рис. 3в, 3г). По мере роста щитков становится отчетливо выраженной реб-

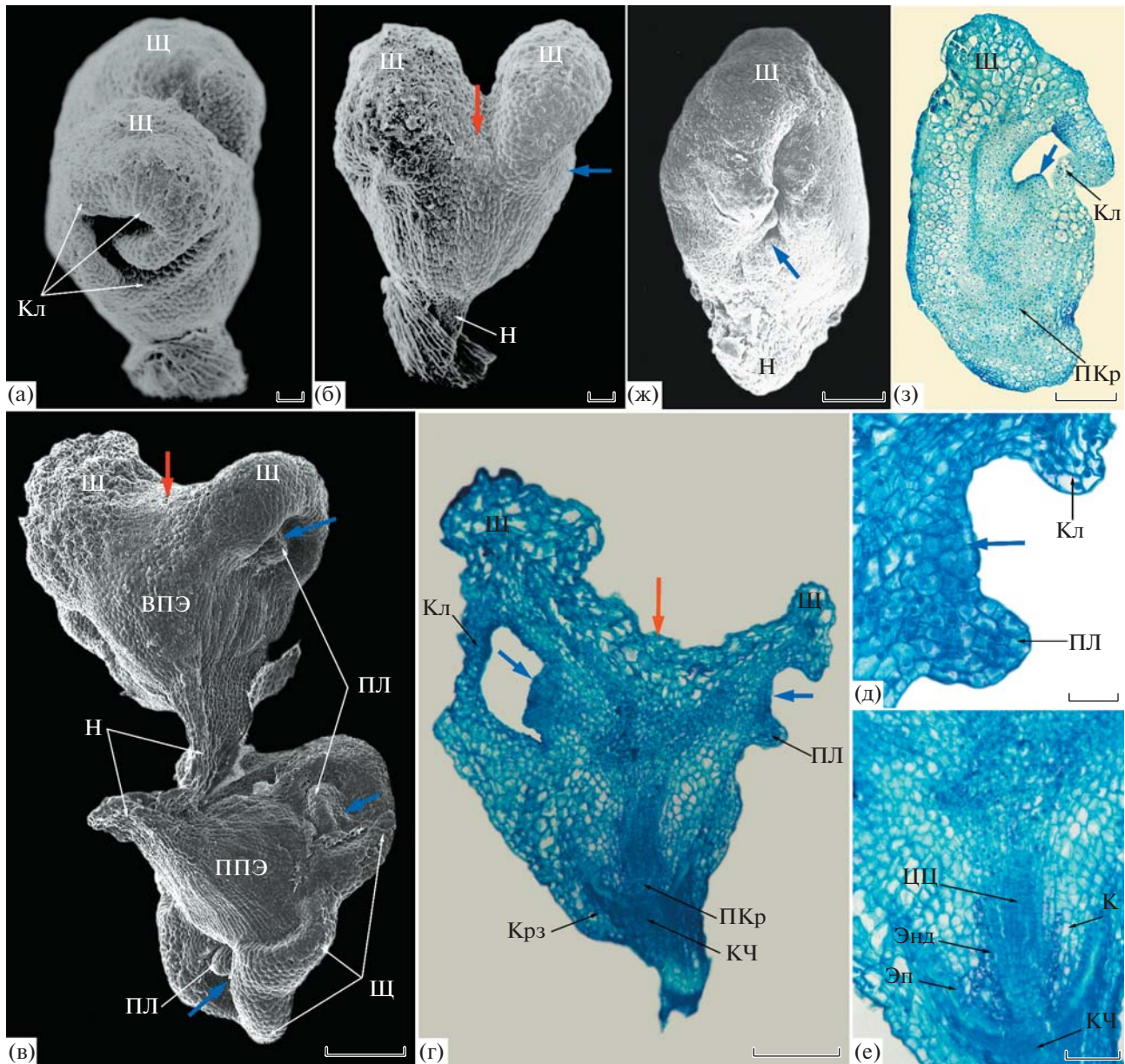


Рис. 5. Переход от поздне-глобулярной стадии к стадии заложения и формирования органов у полиэмбрионидов с фенотипом “Сиамские зародыши спина-к спине” (димерные варинаты). а, б, в–е – полиэмбриониды, ж, з – моноэмбрионид. а–в, ж – СЭМ, г–е, з – СМ, постоянные препараты. а, б – разные ракурсы одного и того же полиэмбрионид на стадии заложившихся щитков и меристем побегов, в – внешний вид вторичного димерного полиэмбрионид, образовавшегося из клеток “ножки” тримерного полиэмбрионид, на стадии заложения на меристемах побега первого листа и меристемы первичного корня, г – строение этого же полиэмбрионид на продольном срезе, д, е – фрагменты данного среза в области меристемы побега (д) и первичного корня (е) увеличено; ж, з – строение моноэмбрионид на стадии заложившегося щитка и меристемы побега – его внешний вид (ж) и продольный срез (з). ВПЭ – вторичный полиэмбрионид, К – кора корня, Крз – колеориза, КЧ – корневой чехлик, ППЭ – первичный полиэмбрионид, ЦЦ – центральный цилиндр, Энд – эндодерма, Эп – эпидерма. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–4. Шкала: а, б, г, ж, з – 100 мкм, в – 200 мкм, д–е – 50 мкм.

ристость поверхности полиэмбрионидов, хорошо заметная при их просмотре сверху и в латеральной проекции. Ребра и лежащие между ними щитки и меристемы побега расположены радиально и симметрично относительно продольной

оси полиэмбрионид (рис. 3а, 3д, 3з, 3и; 4а, 4б; 5а, 5б; 6а, 6б).

На серии продольных срезов таких полиэмбрионидов (рис. 3е, 3ж) видно, что в их центральной части деления клеток в радиально расходя-

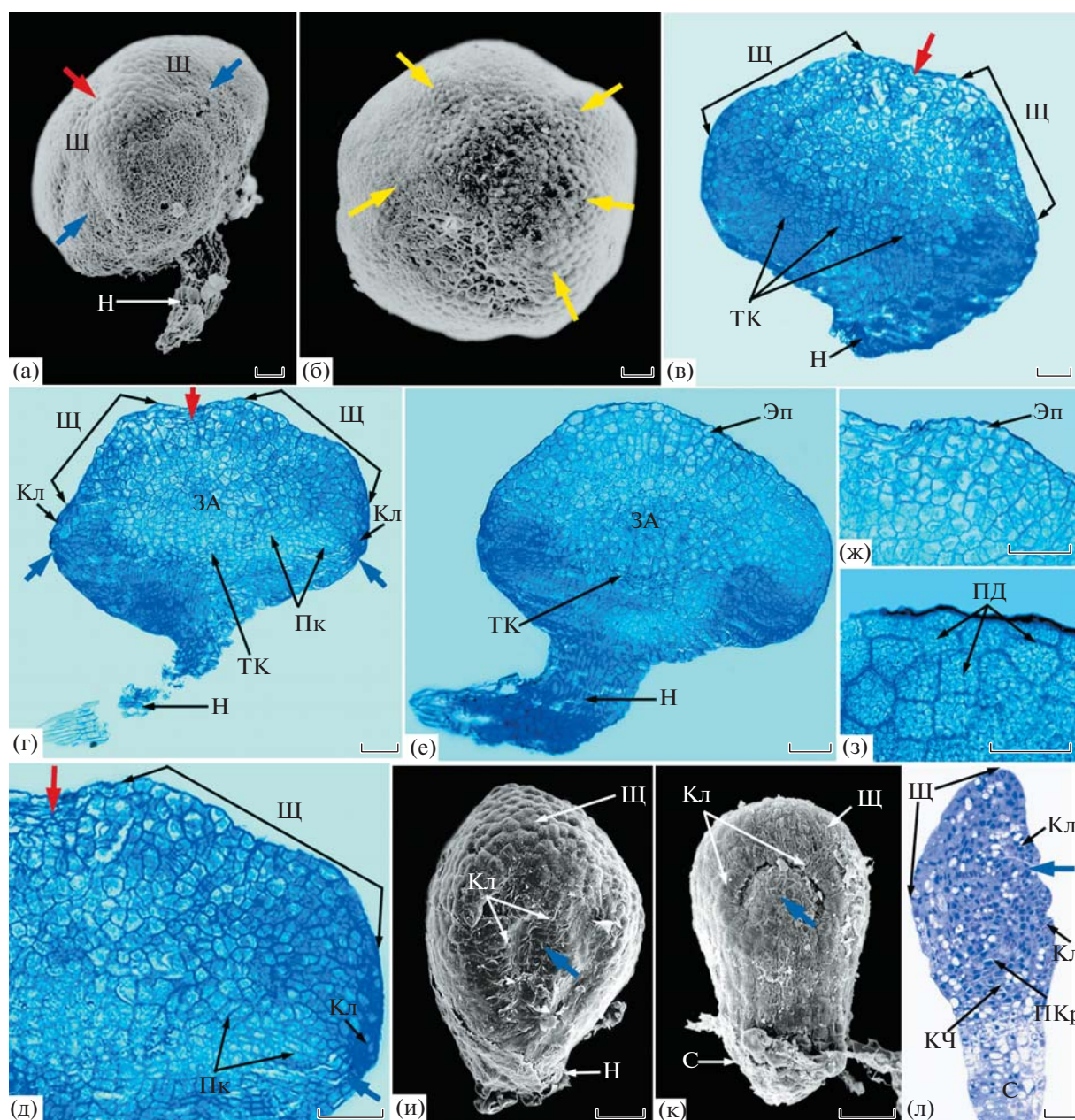


Рис. 6. Заложение органов и начальные стадии их развития у полиэмбриоидов с фенотипом “Сиамиские зародыши спина-к спине” (пентамерный вариант). а–з – полиэмбриоид, и – моноэмбриоид, к, л – зародыш. а, б, и, к – СЭМ; в–з, л – СМ, постоянные препараты. а, б – разные ракурсы одного и того же полиэмбриоида; в, г, е – его строение на продольных срезах; д, ж, з – фрагменты данных срезов в области меристемы побега (д) и щитка (ж, з) увеличено, на (ж, з) видны “старые” периклиналильные деления в поверхностных слоях клеток щитка; и, к – внешний вид моноэмбриоида (и) и зародыша (к) на аналогичной стадии развития; л – строение зародыша на продольном срезе. Пк – прокамбиальные клетки. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–5. Шкала: а–ж, и – 100 мкм, з, к, л – 50 мкм.

шихся рядах постепенно становятся неактивными, особенно в области верхушки, тогда как в периферической части, по ее кольцу (в местах наибольшего искривления поверхности) деления продолжают. Постепенно происходит концентрация делений клеток в нескольких (2–3–5) точках поверхности “грибка”, приводящая к заложению множественных меристем побегов и окружающих

их валиков щитков. Одновременно конечные производные делений клеток рядов в верхней (апикально-латеральной) части постепенно подвергаются вакуолизации, что приводит к формированию характерной структуры этих клеток, свойственной клеткам щитков моноэмбриоидов и зиготических зародышей на ранних стадиях развития (рис. 3г; 5з; 6л). В поверхностном слое клеток отмечается

постепенное прекращение периклиналильных делений, т.е. происходит окончательное оформление протодермы. В центральной части, вдоль продольной оси, ближе к базальной зоне таблитчатых клеток, меристематичный характер клеток рядов сохраняется.

В результате описанных процессов возникают полимерные образования, состоящие из нескольких новых осей, объединенных общим корневым полюсом. При этом верхушка продольной оси полиэмбриоида — его первичной оси, становится слегка вдавленной, а все новые оси — меристемы побегов и образующиеся на них валики щитков, вследствие их возникновения из единой кольцевой меристематической зоны, являются частично конгенитально латерально объединенными в своей проксимальной части (рис. 3з—3л; 4в; 5а, 5б). Зона образования валика щитка на каждой меристеме побега топографически соответствуют зоне будущего колеоптиля, который возникает как первый латеральный орган меристемы побега, но вследствие специфики заложения органов в полиэмбриоидах является конгенитально объединенным с собственно щитком, по сути — латеральным выростом вторичных осей полиэмбриоида.

В ходе дальнейшего развития (23—25 сут культивирования) в отдельных единицах полимерных структур происходит рост щитка и формирование колеоптиля, окружающего меристему побега (рис. 6а—6е) — как и в моноэмбриоидах и зиготических зародышах пшеницы (рис. 6и—6л). Рост собственно щитков осуществляется за счет делений и растяжения клеток радиальных рядов, причем на этой стадии развития в их эпидерме еще отчетливо сохраняются следы ранее произошедших периклиналильных делений ее клеток (рис. 6ж, 6з). По мере развития меристем побегов и щитков в них формируются тяжи прокамбия, связанные с базальной зоной меристематических таблитчатых клеток в области корневого полюса полиэмбриоида (на границе с “ножкой”), которые вытягиваются тангентально и также напоминают клетки прокамбия (рис. 6г—6д). В центральной части полиэмбриоида, соответствующей зоне его первичной оси, ближе к основанию, на базе сохраняющихся радиальных рядов клеток могут формироваться дополнительные тяжи прокамбия (рис. 6в—6е), в дальнейшем анастомозирующие с проводящими пучками отдельных щитков.

Далее (25—30 сут культивирования) на меристеме побега каждой единицы полиэмбриоида (вторичных осях) происходит заложение примордиев 1-го и последующих листьев; при этом меристема побега смещается в латеральное положение, а щиток — в терминальное. Заложение меристемы единственного первичного корня происходит позднее, после заложения меристем побега и щитков (рис. 4г, 4д; 5г—5е), как и в моноэмбриоидах

(рис. 5ж, 5з) и зиготических зародышах (рис. 6л). В редких случаях наблюдалось заложение 2—4-х первичных, часто латерально сросшихся корней (данные не приведены). После заложения на меристемах побега примордия 1-го листа в их основании отмечается заложение адвентивных корней, внешне проявляющихся в виде вздутий на поверхности базальной части полиэмбриоида (рис. 4г, 4д). При этом характерная ребристость последней, соответствующая границам слияния отдельных единиц — вторичных осей полиэмбриоидов, становится менее выраженной (рис. 4г), хотя на всех прослеженных нами стадиях развития присутствуют следы их сохраняющейся первичной оси (рис. 3е, 3ж; 4д; 5г).

Отличительными чертами строения отдельных единиц полиэмбриоидов этого класса являются разомкнутая структура колеоптиля и почти полное отсутствие образования эпибластов (рис. 4г; 5а—5в; 7а—7д). К числу характерных особенностей их развития также следует отнести частое нарушение филлотаксиса (те же рис.) и образование дополнительных эмбриоидов (также обычно с множественными органами) из клеток “ножки” (рис. 5в).

Следует отметить, что нередко заложение щитков и меристем побегов в полиэмбриоидах данного класса фенотипов происходило асинхронно, при этом одна из единиц могла несколько опережать в развитии остальные единицы. Часто щитки сближены и срастаются между собой латерально в сильной степени, что обуславливает нарушение симметрии полиэмбриоидов (варьирование значения углов между щитками). В частности, среди пентамерных полиэмбриоидов отмечены следующие варианты срастания щитков: 2 сросшихся и 3 относительно свободных щитка (рис. 7а); 4 сросшихся и 1 свободный щиток (рис. 7б); 3 сросшихся и 2 относительно свободных щитка (рис. 7в). При почти полном срастании щитков наблюдается почти полное объединение соответствующих им меристем побега, с образованием единого синтетического 1-го листа в виде пластинчатой структуры, лишь слегка разделенной в дистальной части (рис. 7г, 7д).

Характеристика и развитие полиэмбриоидов из класса фенотипов “Множественные меристемы побега. Сердечковидные сиамские зародыши”. Для полиэмбриоидов этого класса фенотипов также характерно образование в апикальной части нескольких щитков и меристем побегов, объединенных общим корневым полюсом, однако, в отличие от предыдущего класса, они характеризуются иной симметрией расположения единиц и их органов. В зависимости от взаимной топографии составляющих единиц и их органов фенотипы этого класса можно разделить на 2 группы.

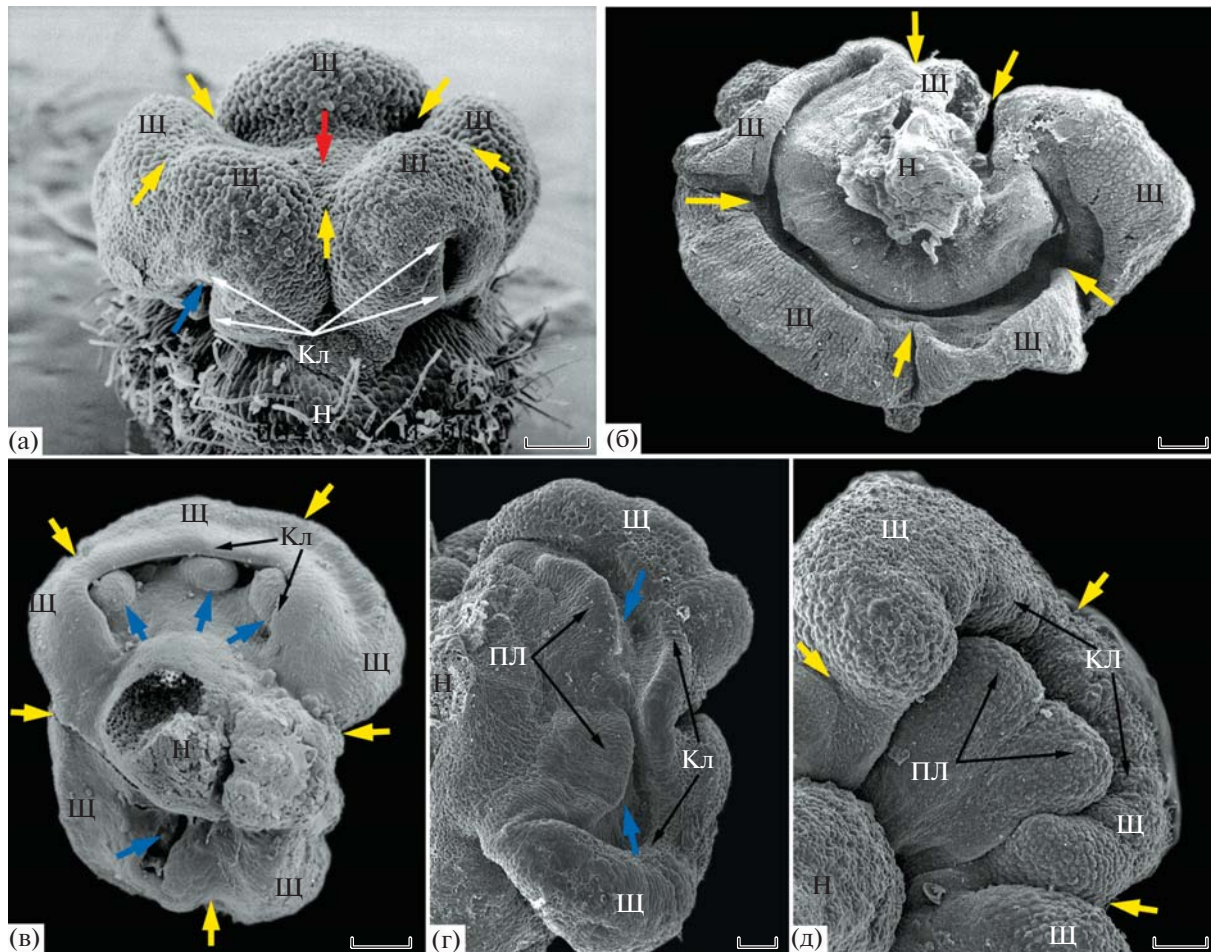


Рис. 7. Различные варианты степени сближения и срастания органов у полиэмбриоидов с фенотипом “Сиамские зародыши спина-к спине” (пентамерные варианты, СЭМ). Обозначения те же, что и на рис. 1–5. Шкала: 200 мкм.

1-ая группа фенотипов характеризуется линейным расположением составляющих их единиц со смещением всех щитков и меристем побегов на одну сторону полиэмбриоида (их расположением в одной плоскости), вследствие чего вся полимерная структура (как и слагающие ее единицы) характеризуется дорсовентральным строением. Щитки имеют одинаковую ориентацию, расположены терминально относительно меристем побегов и частично или полностью объединены латерально. В зависимости от числа слагающих единиц эту группу фенотипов можно разделить на следующие категории: димерные полиэмбриоиды с 2 щитками, частично или почти полностью сросшимися латерально; каждому щитку соответствует свой coleoptиль, заключающий в себе одну меристему побега (рис. 8а–8д); тримерные и пентамерные полиэмбриоиды с 3 или 5 щитками, также, как правило, сросшимися латерально в разной степени, нередко почти полностью – с образованием единого синтетического щитка и единого синтетического

coleoptиля, частично разделенных в своей дистальной части (рис. 8е–8з).

2-ая группа фенотипов характеризуется радиальным расположением составляющих единиц – как и группа фенотипов “Сиамские зародыши спина-к-спине” (см. выше), однако отличается от них полной инверсией их положения. В таких полиэмбриоидах формировались 2 супротивно расположенных щитка (под углом в 180°), обращенных друг к другу вентральными сторонами; при каждом щитке имелось по одной меристеме побега (рис. 9а, 9б). В отличие от димерных вариантов фенотипа “Сиамские зародыши спина-к-спине”, меристемы побегов в этом случае занимают в полиэмбриоиде терминальное положение относительно щитков (внешне напоминая зародыш двудольных растений, в котором единственная меристема побега располагается между двумя семядолями, занимая по отношению к ним терминальное положение).

Анализ внешнего строения димерных полиэмбриоидов с линейным расположением единиц на стадии заложившихся органов показал, что в их

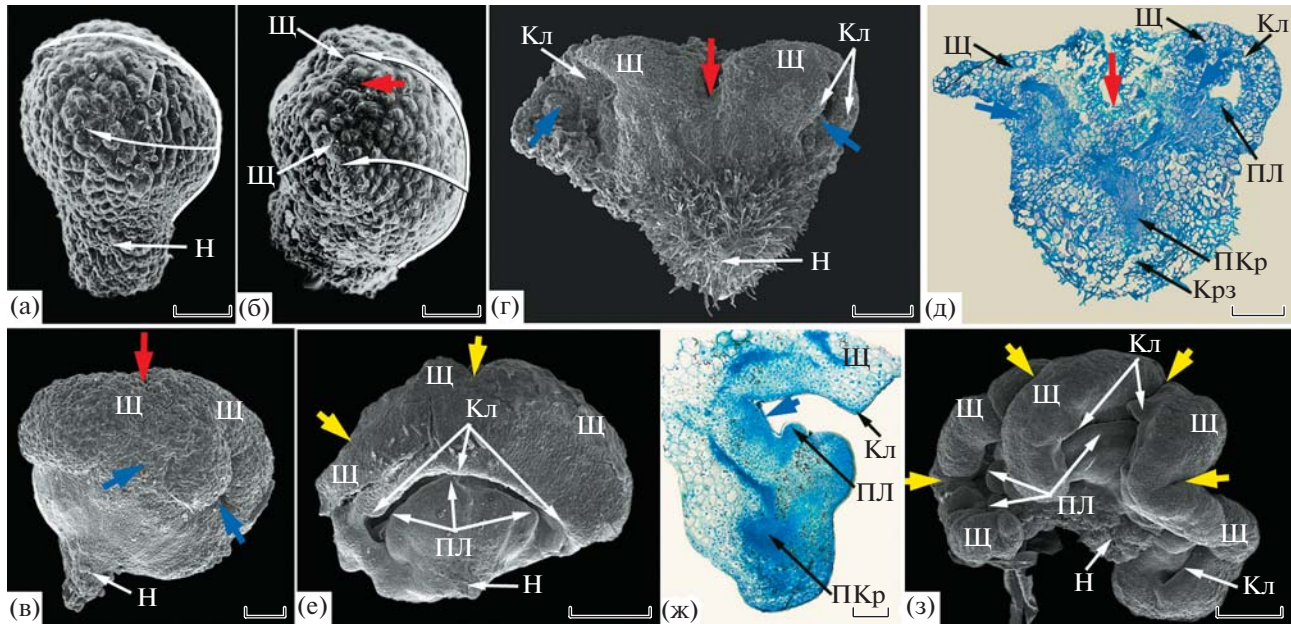


Рис. 8. Последовательные стадии развития полиэмбриоидов из класса фенотипов “Множественные меристемы побегов. Сердцевидные сиамские зародыши” с линейным расположением составляющих единиц. а–г, е, з – СЭМ; д, ж – СМ, постоянные препараты. а, б, в – внешний вид димерных полиэмбриоидов на стадии заложившихся щитков и меристем побега, вид сбоку (а) и вид сверху (б) одного и того же полиэмбриоида; г, е, з – внешний вид димерного (г), тримерного (е) и пентамерного (з) полиэмбриоидов и их строение на продольных срезах (д, ж) на стадии заложения на меристемах побегов первого листа и первичного корня. Белые изогнутые стрелки: искривление оси полиэмбриоида. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–5. Шкала: а, б, ж – 100 мкм, в – 200 мкм, г, д, е, з – 500 мкм.

апикальной части (чуть выше границы слияния щитков) имеется вдавленная зона, состоящая из более крупных клеток (как и у “Сиамских зародышей спина-к спине”) и расположенная на одной оси с корневым полюсом, при этом сама ось является несколько искривленной (рис. 8б, 8г). Наличие этой зоны подтверждается анатомическим анализом строения таких полиэмбриоидов, причем на продольных срезах в их центральной части заметны сохраняющиеся ряды клеток, идущие от базальной зоны таблитчатых клеток в направлении поверхности (рис. 8д). Это позволяет рассматривать центральную продольную часть полиэмбриоидов в качестве их первичной оси. Можно полагать, что образование полиэмбриоидов с линейным расположением единиц также связано с радиальным ростом апикального домена после ранне-глобулярной стадии развития (об этом свидетельствует и форма полиэмбриоидов данных фенотипов на ранних стадиях). Однако в дальнейшем, начиная с 15–17 сут культивирования, рост таких полиэмбриоидов, вероятно, становится асимметричным, с постепенной концентрацией клеточных делений лишь с одной стороны периферической части апикального домена (в 2, 3 или 5 точках). Вследствие этого полиэмбриоиды быстро приобретают дорсовентральное строение, подобно моноэмбриоидам (ср. рис. 8ж; 5ж, 5з), с той

разницей, что они имеют более сложную природу, связанную с частичным умножением числа осей.

Менее ясен характер перехода от ранне-глобулярной стадии развития к процессу заложения органов у полиэмбриоидов с радиальным расположением единиц, но с инвертированным положением меристем побега и щитков, обращенных друг к другу вентральными сторонами. При анализе строения таких полиэмбриоидов на стадии заложившихся органов с помощью СЭМ и на продольных срезах в их апикальной части (между 2 меристемами побегов вновь образованных составляющих единиц) также выявляется верхушка их сохраняющейся первичной оси (как и у предыдущих фенотипов полиэмбриоидов). Обе меристемы побега вновь образованных единиц располагаются вблизи верхушки первичной оси полиэмбриоида, по бокам от нее. Тяж прокамбия каждого щитка у таких полиэмбриоидов связан с базальной зоной меристематических таблитчатых клеток в области корневого полюса, а соответствующие им меристемы побегов еще не сформировали сосудистой связи со щитком. При этом, находясь вблизи верхушки первичной оси полиэмбриоида и занимая в нем почти терминальное положение, они в то же время выглядят как пазушные меристемы щитков (рис. 9а–9е).

Более поздние стадии развития прослежены нами только у полиэмбриоидов фенотипов “Сер-

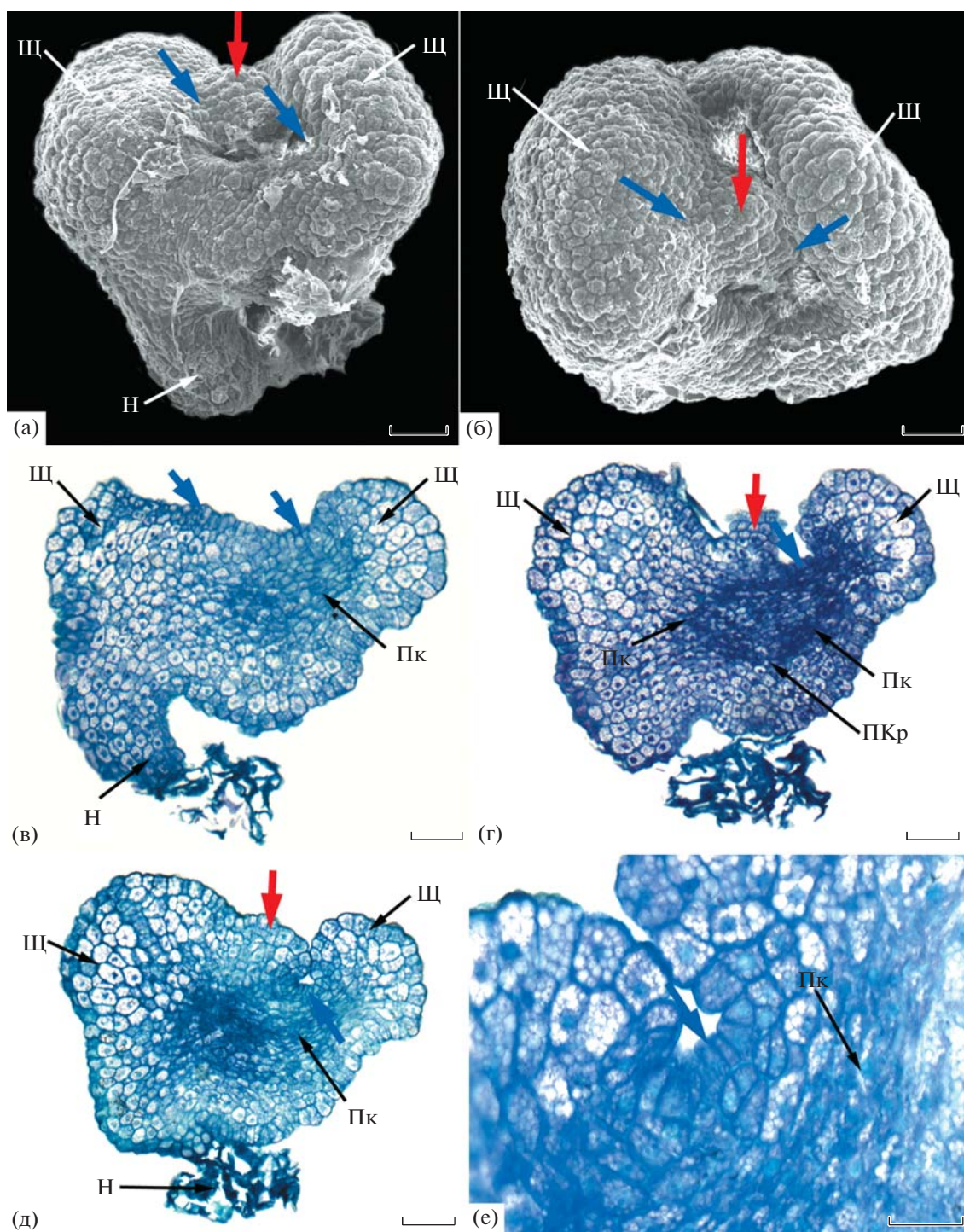


Рис. 9. Строение полиэмбриоида из класса фенотипов “Множественные меристемы побегов. Сердцевидные сиа́мские зародыши” с вентральным обращением щитков друг к другу на стадии заложившихся щитков и меристем побегов. а, б – СЭМ, разные ракурсы одного и того же полиэмбриоида, а – вид сбоку, б – вид сверху; в–г – СМ, строение этого же полиэмбриоида на продольных срезах; в, г, д – серия его последовательных срезов в области заложения двух меристем побегов и затухающей первичной оси; е – строение одной из меристем побега увеличено. Обозначения те же, что и на рис. 1–6. Шкала: а–д – 100 мкм, е – 25 мкм.

дечковидные сямские зародыши” с линейным расположением составляющих их единиц, формирование которых происходит также, как у фенотипов “Сямские зародыши спина-к-спине” (рис. 8е, 8ж), включая редкие случаи образования множественных первичных корней (данные не приведены). Общей чертой строения полиэмбрионидов фенотипов “Сердечковидные сямские зародыши” также являются: характерная ребристость их поверхности в базальной части на ранних стадиях развития (соответствующая границам отдельных срастающихся единиц), разомкнутая структура колеоптилей и отсутствие эпибластов. Для полиэмбрионидов с линейным расположением составляющих единиц также характерны нарушения в филлотаксисе (рис. 8г, 8е, 8з). В случаях почти полного срастания щитков также наблюдается почти полное объединение и соответствующих им меристем побега, с образованием единого синтетического 1-го листа, частично разделенного в своей дистальной части (рис. 8е).

Большинство полиэмбрионидов всех выявленных фенотипов были способны к дальнейшему развитию — образованию листьев на меристеме побегов и последующему формированию растений-регенерантов. Кроме того, между выявленными фенотипами полиэмбрионидов наблюдались все переходные состояния.

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях выполненных нами экспериментов, как и в экспериментах К. Фишер с соавт. (1997) по влиянию ингибиторов полярного транспорта ауксинов на ранние изолированные зиготические зародыши пшеницы *in vitro*, наблюдалось образование микроспориальных полиэмбрионидов, относящихся к 2 классам фенотипов — “Множественные меристемы побегов” и “Множественные щитки”. При этом среди полиэмбрионидов из класса “Множественные меристемы побегов” отмечалось преимущественное формирование фенотипов “Сямские зародыши спина-к-спине”, с преобладанием пентамерных и тримерных вариантов строения; полиэмбриониды же класса фенотипов “Множественные щитки” (с удвоением щитков, сходно ориентированных, объединенных латерально почти по всей длине и соседствующих с единственной нормальной меристемой побега) выявлены в единичных случаях. Кроме того, как и в указанной работе, воздействие действующего вещества (в нашем случае — 2,4-Д) было, вероятно, эффективным лишь в “окне” между ранне-глобулярной и ранне-переходной стадиями развития (до установления билатеральной симметрии) зародышей/полиэмбрионидов пшеницы. Значительное сходство результатов, полученных нами и указанными авторами, свидетельствует, на наш взгляд, об общности морфогенетических процессов, лежа-

щих в основе развития зиготических зародышей и полиэмбрионидов пшеницы, что еще раз подтверждает концепцию о параллелизме развития зиготических зародышей *in vivo* и эмбрионидов разного происхождения *in vivo* и *in vitro* (Batygina, 2004).

Образование полимерных зародышей рассматривается рядом авторов как одно из проявлений кливажной (монозиготической¹) полиэмбрионии (Naccius, 1955; Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994) — феномена образования генетически идентичных однойцевых близнецов (двоен, троен и т.д.), возникающих на ранних этапах эмбриогенеза из клеточек зиготического зародыша (обзоры: Sharma, Thorpe, 1995; Durzan, 2008). Некоторые авторы рассматривают кливажную полиэмбрионию как способ образования соматических зародышей (эмбрионидов) на базе дочернего спорофита — из клеток зиготы или многоклеточного зиготического зародыша (Batygina, Osadtchiy, 2013). Известно, что кливажная полиэмбриония, свойственная покрытосеменным и особенно голосеменным растениям, может осуществляться на разных, обычно очень ранних стадиях развития зародыша — зиготы или проэмбрио (до отделения протодермы). Кроме того, новые зародыши могут возникать как из отдельных клеток собственно зародыша, так и суспензора (суспензорная полиэмбриония). Во всех этих случаях в ходе развития все зародыши формируют собственные оси (апекс побега — апекс корня) и становятся полностью независимыми (см. те же обзоры).

В случае образования полиэмбрионидов/полимерных зародышей пшеницы класса фенотипов “Множественные меристемы побегов”, описанных нами и в работе (Fischer et al., 1997), а также в аналогичных случаях, отмеченных у других видов растений *in vivo* и *in vitro* (Naccius, 1955; Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994; Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001; Rober-Kleber et al., 2003), “кливаж” происходит на ранне-глобулярной стадии. В этих случаях образующиеся полиэмбриониды/зародыши не являются самостоятельными, представляя собой полимерные структуры с множественными меристемами побегов, семядолями или специфическими органами (щитками, колеоптилями — злаки), как правило, сросшимися в разной степени и объединенными общим корневым полюсом. В работе К. Фишер с соавт. (1997) было показано, что даже в случаях образования отдельных множественных первичных корней полимерные зародыши пшеницы все равно были объединены между собой в области щитков. В наших экспериментах образование множественных (2–4) кор-

¹ В связи со спецификой проявления кливажной полиэмбрионии у покрытосеменных растений, особенно на более поздних этапах эмбриогенеза, а также ее определенными отличиями от таковой у голосеменных (расслоение оболочки зиготы) Т.Б. Батыгина предпочитает использовать вместо термина “кливажная полиэмбриония” термин “монозиготическая полиэмбриония” (Batygina, Osadtchiy, 2013).

ней у полиэмбрионидов наблюдалось очень редко. Обычно они были сросшимися между собой (фасцированными), что отмечалось и в работах других авторов (Ferguson et al., 1979), полагавших, что случаи образования полимерных структур с общим корневым полюсом нельзя рассматривать как проявление кливажной полиэмбрионии. Согласно К. Фишер с соавт. (1997), их следует определять как частичное умножение зародышевых осей – в отличие от случаев их полного умножения (полиэмбрионии).

Тем не менее, мы разделяем точку зрения О. Эрдельской и З. Видовенковой (Erdelska, Vidovencova, 1992, 1994) о том, что случаи образования полимерных структур с множественными меристемами побегов и с одним общим корневым полюсом следует рассматривать как проявление кливажной полиэмбрионии, но неполной, незавершенной. Согласно указанным авторам, специфика проявления кливажной полиэмбрионии на поздних стадиях развития (“delayed cleavage”) связана с вовлечением в этот процесс более крупных кластеров клеток. Авторы также отмечали возможность одновременного проявления позднего кливажа и суспензорной полиэмбрионии (такие редкие случаи обнаружены нами и у полиэмбрионидов пшеницы, рис. 5в), а также сходство факторов индукции этих форм полиэмбрионии (воздействие ауксинами, ингибиторами их полярного транспорта, рентгеновское облучение и др.). К этим аргументам можно добавить наличие переходных состояний между структурами с одним и множественными первичными корнями, причем в последнем случае составляющие полимерные зародыши единицы являются генетически идентичными, хотя и не вполне самостоятельными. Кроме того, специфика проявления кливажной полиэмбрионии на глобулярной стадии развития зародыша может быть связана с иной степенью компетентности его клеток к различным воздействиям по сравнению с клетками зиготы и раннего проэмбрио.

Однако специфика проявления кливажной полиэмбрионии на поздних стадиях эмбриогенеза пшеницы (после глобулярной стадии) состоит не только в вовлечении в образование множественных зародышей целых кластеров клеток и их неполном разделении, но и в различной топографии и сростании их органов, а также ряде других специфических особенностей развития, свидетельствующих о том, что кливажная полиэмбриония в этом случае сопровождается фасциациями.

Различают три типа фасциаций побега – радиальную, плоскую и кольцевую, с разнообразными переходами между ними. Их общими характерными признаками являются: ребристость стебля; его частое искривление и разветвление в апикальной части на две или несколько осей; нарушение филлотаксиса; значительное увеличение разме-

ров апикальной меристемы побега, связываемое с процессами нарушения ритмики ее клеточных делений и аномальным ростом (обзоры: Данилова, 1961; Чуб, Синюшин, 2012).

Большинство признаков фасциаций наблюдаются в выявленных нами случаях образования разных фенотипов полиэмбрионидов класса “Множественные меристемы побегов”. Так, полиэмбриониды фенотипов “Сиамские зародыши спина-к-спине” с радиальным расположением единиц (рис. 3–5) следует рассматривать как результат радиальной фасциации верхушки оси эмбриоида (зародыша), тогда как полиэмбриониды фенотипов “Сердечковидные сиамские зародыши” с линейным расположением единиц – как результат плоской фасциации (рис. 8). Сложнее определение типа фасциаций у фенотипов “Сердечковидные сиамские зародыши” с радиальным расположением единиц, но со щитками, ориентированными вентрально друг к другу (рис. 9). Их также можно оценивать как результат радиальной фасциации, хотя характерная для них инверсия органов больше свидетельствует в пользу кольцевой фасциации, возникающей в результате искривления и замыкания в кольцо линейной фасцированной верхушки эмбриоида/зародыша. Таким образом, наши данные по генезису полиэмбрионидов подтверждают идею М.Ф. Даниловой (1961) о возможности проявления разных типов фасциаций не только на поздних этапах онтогенеза – в ходе формирования вегетативного и генеративного побега, но и на самых ранних стадиях эмбриогенеза – при становлении оси зародыша. Более того, полученные нами результаты подтверждают и основанное на анализе работы (Braun, 1859) мнение М.Ф. Даниловой о возможной связи фасциаций с полиэмбрионией.

Следует отметить, что проявление фасциаций зародыша показано у мутантных растений – *Ara-bidopsis amp1* с увеличенным размером апекса глобулярного зародыша (с 3 или большим числом семядолей) (Howell et al., 2003) и *Zea mays abphyll* с увеличенной апикальной меристемой побега зрелого зародыша и нарушением филлотаксиса (Jackson, Hake, 1999). Однако в этих работах не выявлено связи фасциаций с полиэмбрионией. У мутанта *OsPE* риса (Puri et al., 2010; Paul et al., 2012), с нашей точки зрения, проявляющего кливажную полиэмбрионию с образованием полимерных структур по типу “Сиамских зародышей” пшеницы, наоборот, осталась без внимания ее очевидная связь с фасциацией.

Наши данные по генезису полиэмбрионидов пшеницы различных фенотипов также позволяют внести вклад в решение проблемы природы фасциаций. Известны две основные точки зрения в отношении этого вопроса. Согласно первой из них, фасцированный орган есть результат кон-

генитального срастания нескольких компонентов/нескольких меристем. Один из внешне-морфологических признаков срастания – наличие в фасцированном органе отдельных компонентов, сохраняющих до некоторой степени свою самостоятельность и стремящихся к обособлению. Согласно второй точке зрения, фасциация есть результат разрастания единственной точки роста/увеличения пула клеток в единственной меристеме (обзоры: Данилова, 1961; Чуб, Синюшин, 2012). Наши данные свидетельствуют о том, что фасциация у полимерных эмбриоидов пшеницы – результат конгенитального срастания отдельных компонентов – множественных моноэмбриоидов и их органов. В ходе их развития прослеживались отчетливые следы и последовательные этапы слияния множественных моноэмбриоидов и их органов – от частичного до полного (без признаков исходного слияния в морфологии единых синтетических структур). В частности, отмечались увеличенные в размере протяженные апикальные меристемы побегов и щитки, а в синтетических органах были четко различимы их свободные дистальные части (рис. 7в–7д; 8е).

Заслуживает внимания физиологический механизм реализации кливажной полиэмбрионии (и фасциаций). Б. Хациус (Nassius, 1955) трактовала его как нарушение апикального доминирования, существующего в зародыше уже на глобулярной стадии развития. О. Эрдельска и З. Видовенкова (1994) считали, что кливажная полиэмбриония возникает в результате процесса нарушения связей между клетками раннего проэмбрио под действием регуляторов роста или ингибиторов полярного транспорта ауксина, индуцирующих экспрессию тотипотентности в каждой клетке проэмбрио.

Исходя из анализа изменений в структуре разных фенотипов полимерных зародышей пшеницы, образующихся при воздействии ингибиторов полярного транспорта ауксинов, по сравнению с нормальным зиготическим зародышем данного вида, а также анализа содержания в последнем меченой экзогенной ИУК, К. Фишер с соавт. (Fischer, Neuhaus, 1996; Fischer et al., 1997; Fischer-Iglesias et al., 2001) предложили модель синтеза и полярного транспорта ауксинов в зародыше однодольных растений (Poaceae) в процессе становления билатеральной симметрии. Согласно этой модели, в глобулярном зародыше имеет место диффузия или многонаправленный активный транспорт ауксина в направлении протодермы. При переходе к органогенезу устанавливается его направленный полярный транспорт от внутренних слоев зародыша к наружным (протодерме), в специфические участки, для инициации клеточных делений в этих участках и роста щитков. Авторы предположили существование вокруг апикальной части недифференцированного зароды-

ша знаков кольца клеток, морфогенетически компетентных к инициации меристемы побега. Для реализации этой компетенции таким клеткам необходим импульс в виде потока ауксина. В обычно развивающихся зародышах полярный транспорт ауксина к одной группе клеток инициирует промеристему побега. Как следствие, ауксин недоступен/недостаточен другим группам клеток для приобретения ими меристематической идентичности. Под действием ингибитора происходит нарушение полярного транспорта ауксинов и их накопление в местах синтеза, которые могут диффундировать или транспортироваться через новые потоки к другим группам клеток кольцевидной меристематической зоны. Это приводит к образованию в ней множественных очагов, на основе которых возникают новые меристемы побегов. Отсутствие ауксина в зоне инициации меристемы побега на этой стадии, согласно авторам, связано с отсутствием его полярного транспорта к ее клеткам или их неспособностью к его экспорту.

Согласно более поздней, уточненной модели синтеза и полярного транспорта ауксина К. Форестана с соавт. (Forestan et al., 2010), основанной на анализе локализации свободной эндогенной ИУК и переносчика ауксина – ZmPIN1 в клетках зародыша кукурузы на этих же стадиях развития, в зародыше злаков на глобулярной стадии развития уже осуществляется активный полярный поток ауксина в направлении от основания к верхушке собственно зародыша (к протодерме). Переход от радиальной симметрии к билатеральной связан с инверсией поляризации белка-переносчика PIN1 на мембранах клеток собственно зародыша и протодермы, и соответственно, транспорта ауксина, осуществляемого этим переносчиком.

В этой связи следует отметить такую важную особенность развития полиэмбриоидов пшеницы фенотипов “Сиамские зародыши спина-к-спине”, как необычный характер делений их клеток начиная с ранне-глобулярной стадии развития, состоящий в формировании рядов периклиналильно делящихся клеток, радиально расходящихся от базальной зоны табличчатых меристематических клеток (инициалей чехлика первичного корня и колеоризы) в направлении периферии полиэмбриоида. Это приводит к расширению апикальной части полиэмбриоида с сохранением ее радиальной симметрии. В так называемой протодерме также наблюдаются непрерывные периклиналильные деления. Более того, периклиналильно делящиеся клетки протодермы, вероятно, являются конечными производными делений клеток этих рядов, вследствие чего ее слой на глобулярной стадии развития не оформлен окончательно. Аналогичные ряды клеток характерны и для моноэмбриоидов и зиготических зародышей, причем их направление соответствует направлению потоков ауксина

в модели его транспорта в ранне-глобулярном зародыше пшеницы (по: Fischer et al., 1997).

При переходе к органогенезу меристематическая активность верхней части полиэмбриоида постепенно затухает, и клеточные деления концентрируются в периферической части апекса, по кольцу. При этом отмечается прекращение периклиналильных делений клеток поверхностного слоя полиэмбриоида, что приводит к окончательному отделению слоя протодермы. Сходные процессы наблюдаются и в моноэмбриоидах (Круглова и др., 2005) и в зиготических зародышах пшеницы (Батыгина, 1974), с той разницей, что в них происходит быстрое одностороннее разрастание, приводящее к искривлению оси (рис. 2е, 2и, 2м–2р). Эти изменения могут свидетельствовать о смене вектора делений клеток в их поверхностном слое (периклиналильных на только антиклиналильные) при переходе от глобулярной стадии к заложению органов и объяснять структурный механизм, лежащий в основе модели инверсии полярного транспорта ауксина в зародыше при переходе к органогенезу, предложенной К. Форстаном с соавт. (2010).

Анализ заложения органов у полиэмбриоидов также объясняет общий механизм регуляции полярным транспортом ауксинов процесса заложения щитка и меристемы побега в зародыше злаков — органов, кажущихся (по: Fischer et al., 1997) столь разными по своей природе. По нашим данным, меристема побега в полиэмбриоидах представляет собой осевой орган, щиток — латеральный вырост этой оси, а колеоптиль — производное меристемы побега, но сросшееся со щитком. Терминальность щитка в сформированных полиэмбриоидах (“Сиамские зародыши спина-к-спине”, “Сердечковидные сиамские зародыши” с линейным расположением единиц) может являться следствием искривления их осей, характерного для фасцированных побегов, а его терминальность в зиготическом зародыше — результатом линейной фасциации и искривления оси, имевшей место в историческом прошлом.

Длительность фазы периклиналильных делений, связанных с отделением протодермы зародыша (ее позднее отделение, после перехода к органогенезу) и сменой вектора клеточных делений в раннем эмбриогенезе свойственна многим другим однодольным растениям и, вероятно, свидетельствует об инверсии симметрии их внутреннего строения относительно оси зародыша, а также обратной физиологической полярности его органов (Titova, 2006; Титова 2007).

Отмечая разную скорость развития меристем побегов в полимерных зародышах пшеницы, К. Фишер с соавт. (1997) полагают, что такие меристемы формируются дополнительно к главной промеристеме побега, связывая этот факт с необ-

ходимостью перепрограммирования их инициальных клеток для приобретения способности к восприятию и транспорта ауксинов. Более позднее формирование дополнительных щитков и меристем побегов в зародышах пшеницы отмечалось также Дж. Фергюсоном с соавт. (Ferguson et al., 1979). Согласно нашим данным, в полиэмбриоидах пшеницы также наблюдалось асинхронное заложение и развитие меристем побега. Все они возникали в периферической кольцевой меристематической зоне апикальной части полиэмбриоида почти одновременно, однако, по-видимому, из-за возникающего апикального доминирования одна из них опережала в развитии другие. Такая трактовка способа возникновения новых меристем (*de novo*, вместо деградирующей первичной оси) согласуется с данными по развитию меристем радиально фасцированных побегов, где также отмечалось подавление активности и частая деградация плохо иннервируемой центральной зоны меристемы или ее стабилизация за счет формирования дополнительных пучков (Чуб, Синюшин, 2012).

В заключение следует отметить, что дальнейшее изучение различных проявлений феноменов кливажной полиэмбрионии и фасциаций в эмбриогенезе растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro* имеет важное теоретическое и прикладное значение. Данные феномены вызывают интерес с позиции ряда фундаментальных проблем биологии развития: становление полярности и симметрии в эмбриогенезе; эволюция эмбриогенеза семенных растений. Феномен кливажной полиэмбрионии — общее свойство голосеменных и покрытосеменных растений, тогда как “поздний климаж”, сопровождающийся фасциациями и приводящий к образованию “сиамских зародышей”, у голосеменных не выявлен, а важная роль фасциаций в формообразовательных процессах (изменении числа и топографии органов путем конгенитальных срастаний) отмечалась неоднократно (Данилова, 1961). Анализ природы полимерных зародышей у различных видов растений (в свете полученных нами данных по заложению их органов у злаков) может внести вклад и в решение проблемы однодольности: хорошо известно, что зародыши двудольных и однодольных растений различаются именно по типу симметрии и числу органов. Кроме того, фасцированные формы могут служить источником создания новых форм растений с селекционно-ценными признаками (филлотаксис, многоцветковость, повышенная продуктивность).

Работа выполнена по государственным заданиям № 01201255606, № 01201361803 и при финансовой поддержке гранта Президента РФ “Ведущие научные школы” № НШ-5282.2014.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б.* Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206 с.
- Батыгина Т.Б.* Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 712 с.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А.* От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Данилова М.Ф.* О природе фасциации у растений // Бот. журн. 1961. Т. 46. № 10. С. 1545–1549.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б.* Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа: ИБ УНЦ РАН. 2002. 32 с.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А.* Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас. М.: Наука, 2005. 99 с.
- Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е.* Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н.* Андроклиний эмбриогенез *in vitro* злаков // Успехи соврем. биологии. 2014. Т. 134. № 5. С. 503–514.
- Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Галин И.Р., Круглова Н.Н.* Структурные механизмы становления симметрии у микроспориальных эмбрионов пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Изв. Самарск. НЦ РАН. 2013. Т. 15. № 3(5). С. 1676–1679.
- Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н.* Андроклинные “сиамские зародыши” пшеницы *in vitro* // Изв. Уфимск. НЦ РАН. 2015. № 4(1). С. 137–142.
- Титова Г.Е.* Структурная организация зародышей двудольных и однодольных растений: принципы различий и возможные механизмы их возникновения // II международная школа молодых ученых “Эмбриология, генетика и биотехнология”: Материалы. Уфа, 2007. С. 112–114.
- Чуб В.В., Синюшин А.А.* Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы // Физ. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 574–590.
- Яковлев М.С., Снегирев Д.П.* Влияние ростовых веществ на образование многозародышевых зерновок у пшеницы // Бот. журн. 1954. Т. 39. № 2. С. 187–194.
- Batygina T.B.* Polymorphism of sexual and somatic embryos as manifestation of their developmental parallelism under natural conditions and in tissue culture // Plant Biotechnology and Molecular Markers / Eds Srivastava P.S., Narula A., Srivastava S. New Delhi: Anamaya Publishers, 2004. P. 43–59.
- Batygina T.B.* Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants // Stem Cell Res. J. 2011. V. 3. № 1–2. P. 45–120.
- Batygina T.B., Osadtchij J.V.* Polyembryony: twins – the result of vegetative propagation // Int. J. Plant Reprod. Biol. 2013. V. 5. № 1. P. 21–27.
- Berlin G.P., Miksche G.P.* Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Iowa: State Univer. press, 1976. 326 p.
- Braun A.* Über Polyembryonie und Keimung von Coelebogyne. Ein Naehtrag zu der Abhandlung über Parthenogenesis bei Pflanzen. Berlin: Abh. Kon. Akad. Wiss., 1859. S. 109–263.
- Brisibe E.A., Gajdosova A., Olesen A., Andersen S.B.* Cyto-differentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. № 343. P. 187–196.
- Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W.* A set of potato media for wheat anther culture // Sympos. on Plant Tissue Culture: Proceed. Peking: Sci. Press., 1978. P. 52–56.
- Durzan D.J.* Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement // Cytology and Genetics. 2008. Т. 42. № 3. С. 27–44.
- Erdelska O., Vidovencova Z.* Cleavage polyembryony in maize // Sex. Plant Reprod. 1992. V. 5. № 3. P. 224–226.
- Erdelska O., Vidovencova Z.* Cleavage polyembryony *in vivo* and *in vitro* // Biol. Plant. 1994. V. 36. № 3. P. 329–334.
- Ferguson J.D., McEwan J.M.* The chemical induction of supernumerary shoots in the developing embryos of wheat // Physiol. Plant. 1970. V. 23. № 1. P. 18–28.
- Ferguson J.D., McEwan J.M., Card K.A.* Hormonally induced polyembryos in wheat // Physiol. Plant. 1979. V. 45. № 4. P. 470–474.
- Fischer C., Neuhaus G.* Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots // Plant J. 1996. V. 9. № 5. P. 659–669.
- Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G.* Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport // Plant Cell. 1997. V. 9. № 10. P. 1767–1780.
- Fischer-Iglesias C., Sundberg B., Neuhaus G., Jones A.M.* Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat // Plant J. 2001. V. 26. № 2. P. 115–129.
- Forestan C., Meda S., Varotto S.* ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // Plant Physiol. 2010. V. 152. № 3. P. 1373–1390.
- Haccius B.* Experimentally induced twinning in plants // Nature. 1955. V. 176. № 4477. P. 355–356.
- Howell S.H., Lall S., Che P.* Cytokinins and shoot development // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. № 9. P. 453–459.
- Jackson D., Hake S.* Control of phyllotaxy in maize by the *abphyll* gene // Development. 1999. V. 126. № 2. P. 315–323.
- Lynn J.A.* Rapid toluidine blue staining of Epon-embedded and mounted “adjacent” sections // Amer. J. Clin. Path. 1965. V. 44. № 1. P. 57–58.
- Morgan D.T., Rappleye R.D.* Polyembryony in maize and lily following X-irradiation of the pollen // J. Hered. 1951. V. 42. № 2. P. 91–93.
- Nishimura M.* Comparative morphology and development of *Poa pratensis*, *Phleum pretense* and *Setaria italica* // Jap. J. Bot. 1922. V. 1. № 2. P. 55–85.
- Osone K., Oono K.* Effects of irradiation on embryogenesis in rice: I. Stage-specific responses in the induction of M1 lethality and twins // Jap. J. Breed. 1970. V. 20. № 3. P. 151–159.
- Paul P., Awasthi A., Kumar S., Verma S.K., Prasad R., Dhalliwai H.S.* Development of multiple embryos in polyem-

- bryonic insertional mutant *OsPE* of rice // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. № 10. P. 1779–1787.
- Puri A., Basha P.O., Kumar M., Rajpurohit D., Randhawa G.S., Kianian S.F., Rishi A., Dhaliwal H.S. The polyembryo gene (*OsPE*) in rice // *Funct. Integr. Genom.* 2010. V. 10. № 3. P. 359–366.
- Rober-Kleber N., Albrechtová J.T.P., Fleig S., Huck N., Michalke W., Wagner E., Speth V., Neuhaus G., Fischer-Iglesias C. Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. № 3. P. 1302–1312.
- Segui-Simarro J.M. Androgenesis revisited // *Bot. Rev.* 2010. V. 76. P. 377–404.
- Segui-Simarro J.M., Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis // *Physiol. Plant.* 2008. V. 134. № 1. P. 1–12.
- Sharma K.K., Thorpe T.A. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature // *In vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. Thorpe T.A. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish., 1995. P. 17–72.
- Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture // *Plant Reprod.* 2013. V. 26. P. 181–196.
- Titova G.E. Structural organization of dicot and monocot embryos. Principles of differences and possible mechanisms of their origin // XIX Intern. Congr. on Sexual Plant Reproduction: Abstr. Budapest, 2006. P. 94.

Phenomenon of “Siamese Embryos” in Cereals in vivo and in vitro: Cleavage Polyembryony and Fasciations

G. E. Titova^a, O. A. Seldimirova^b, N. N. Kruglova^b, I. R. Galin^b, and T. B. Batygina^a

^a Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Professora Popova 2, St. Petersburg, 197376 Russia

^b Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, pr. Oktyabrya 69, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia

e-mail: galina_titova@mail.ru

Received November 5, 2015; in final form, November 19, 2015

Abstract—The genesis of wheat microsporial polyembryoids in vitro was analyzed in detail. The nature of different phenotypes of cereal polymeric embryos was identified. They represent the class “multiple shoot meristems,” which results from a cleavage polyembryony and is accompanied by organ fasciations of all known types (radial, flat, or annular). The knowledge of morphology of cereal embryonic organs was updated as related to shoot meristem—axial organ; scutellum—lateral outgrowth of this axis; coleoptile—derivative of shoot meristem but coalesced with scutellum; terminality of scutellum—the result of linear fasciation that occurred historically. An explanation is given on how the structural model of an auxin polar transport works upon an establishment of bilateral symmetry in a cereal embryo that is associated with the inverted polarization of the carrier protein PIN1 on cell membranes and, correspondingly, with the inverted auxin transport performed by this carrier (Fischer-Iglesias et al., 2001; Forestan et al., 2010).

Keywords: *Triticum aestivum* L., androgenesis in vitro, cleavage polyembryony, embryogenesis, fasciations, microsporial embryoid, polyembryoid, Siamese embryos