



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



КРИТИЧЕСКАЯ СТАДИЯ АУТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ *IN PLANTA*

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 69, Россия,
email: kruglova@anrb.ru

Резюме

В экспериментальных условиях эмбриокультуры *in vitro* выявлено, что у яровой мягкой пшеницы ряда сортов критической стадии автономности зиготического эмбриогенеза соответствует сформированный зародыш. Подтверждено предположение авторов о том, что оценку автономности зародыша следует давать не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения в условиях *ex vitro*.

Ключевые слова: зародыш, эмбриогенез, эмбриокультура *in vitro*; автономность зародыша, пшеница

Цитирование - Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Критическая стадия автономности зародыша пшеницы *in planta*. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 1-6. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-1

THE CRITICAL STAGE OF AUTONOMY OF WHEAT EMBRYO *IN PLANTA*

Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S.

Ufa Institute of Biology of UFRS RAS, Ufa, pr. Oktyabrya, 69, Russia,
email: kruglova@anrb.ru

Resume

In the experimental conditions of embryo culture *in vitro* in number of spring bread wheat cultivars it was showed that for the critical stage of autonomy of zygotic embryogenesis correspond the formed embryo. The authors confirmed the assumption that the evaluation of the embryo autonomy should be given not only on the basis of the formation of a sprout on a hormonal-free medium *in vitro*, but also on the formation from such sprout a full-fledged fertile plant in *ex vitro*.

Keywords: embryo, embryogenesis, embryo culture *in vitro*, embryo autonomy, wheat

Citation - Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. The critical stage of autonomy of wheat embryo *in planta*. *Biomics*. 2018. 10(1). P. 1-6. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-1 [In Russian]

Введение

Развитие зародыша растений при такой системе размножения, как зиготическая эмбриогения *in planta*, представляет собой единый процесс, в результате которого из одной инициальной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослой особи [Эмбриология цветковых..., 1997, 2000; Raghavan, 1997; Dodeman et al., 1997]. В то же время в своём морфогенезе зародыш проходит через ряд дискретных стадий (или, в терминологии различных авторов [Банникова и др., 1991; Батыгина, 1997; Круглова,

2012, 2013; Kruglova, 2013], – периодов, фаз, этапов), различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, по значению для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию как морфогенетического потенциала зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом [Batygina, 1999, 2005, 2012].

Системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций позволил выявить

ряд критических стадий эмбриогенеза растений, во время которых закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша. Последовательные стадии развития зародыша рассматриваются при этом как последовательный процесс, при котором в различные критические точки времени и пространства происходит переключение развития на альтернативные пути, а те или иные части зародыша становятся «детерминированными» в отношении их дальнейшей дифференциации. В целом, зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов [Батыгина, 2014].

Одна из критических стадий эмбриогенеза растений *in planta* – автономность зародыша как особое структурно-функциональное состояние развивающегося организма, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Автономность зародыша может рассматриваться как один из этапов автономизации онтогенеза, с которого зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития. Стадия автономности зародыша для цветковых растений разных таксонов будет совершенно различна, поскольку определяется в основном разнообразием структур материнского организма, которые окружают зародыш и обуславливают как специфику его строения и развития, так и особенности формирования проростка и растения в целом [Батыгина, 1987, 2014].

Экспериментальный способ выявления критической стадии автономности зиготического зародыша *in planta* состоит в использовании метода эмбриокультуры *in vitro* (анализу этого метода посвящены обзоры [Raghavan, 2003; Elhiti, Stasolla, 2011]). Предложено выявлять стадию автономности по способности изолированного зародыша в условиях *in vitro* завершить эмбриогенез и дать нормальный проросток на безгормональной среде [Батыгина, 1987]. Такой подход вполне оправдан. Действительно, с одной стороны, именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации морфогенетических программ (в том числе потенциальных) развития зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми потенциями взрослого организма. С другой стороны, именно в культуре *in vitro* экспериментатор может моделировать условия материнского организма и выявить ту стадию эмбриогенеза, когда зародыш способен к дальнейшей дифференциации и превращению во взрослое нормальное растение независимо от экзогенных гормонов питательной

среды. В то же время, по нашему мнению, следует дать оценку автономности зародыша *in planta* не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения далее, в условиях *ex vitro*. Немаловажное значение имеет и сравнение фенофаз развития регенерантов *in vitro* и *ex vitro* с аналогичными показателями донорных растений пшеницы в полевых условиях *in planta*. Такой подход был предложен нами на примере модельного сорта пшеницы Симбирка [Круглова, 2013].

Цель исследования состояла в выявлении критической стадии автономности зародыша *in planta* методом эмбриокультуры *in vitro* у ряда сортов яровой мягкой пшеницы.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали сорта яровой мягкой пшеницы – Скала, Жница, Башкирская 26, Салават Юлаев и Экада 70, перспективные для выращивания в климатической зоне Южного Урала. Донорные растения выращивали в полевых условиях согласно рекомендациям [Доспехов, 1985] на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) и срезали на 2.5–25.0 сут после искусственного опыления.

Использовали метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических эмбриологических нюансов [Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдимирова, 2011]. При этом для культивирования использовали незрелые зародыши, изолированные через определённое время после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза (согласно авторской периодизации [Круглова, 2012; Kругlova, 2013]): четырехклеточный зародыш (2.5 сут после опыления); многоклеточный зародыш (4.0 сут после опыления); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (8.0 сут после опыления), подстадия 2 (12.0 сут после опыления), подстадия 3 (17.0 сут после опыления); сформированный зародыш (20.0 сут после опыления). Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двухклеточного зародыша в экспериментах не использовали: миниатюрность зародышей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Инокулируемые зародыши размещали на индукционную среду *in vitro*, составленную по полной прописи [Murashige, Skoog, 1962], с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в различной концентрации: 0.0 мг/л (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0,

5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Культивирование проводили в темноте, при температуре +26°C. Вели визуальную оценку морфологических показателей сформировавшихся структур – морфогенных/неморфогенных каллусов и проростков (всходов) регенерантов.

Проростки в фенофазе 3-го листа переносили на регенерационную среду *in vitro*, составленную по прописи [Blaydes, 1966] с добавлением в качестве гормонального компонента 0.2 мг/л кинетина. Регенеранты в фенофазе кущения переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды и вели наблюдения за их дальнейшим развитием на лабораторной площадке (температура +20...22°C, освещенность 16-18 тыс люкс, 16 час света/8 час темноты) до фенофазы полной спелости зерна.

Развитие донорных растений и регенерантов оценивали визуально согласно фенофазам развития злаков (по [Батыгина, 1987]). Ввели общепринятую лабораторную оценку всхожести зерновок путём их проращивания в чашках Петри в темноте во влажных условиях в течение 3-х сут. Прижизненную съемку регенерантов проводили с применением цифровой камеры “Olympus Camedia C-4000” (“Olympus Optical Co., LTD”, Japan).

Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы

Microsoft Office Excel 2010. В таблицах приведены средние значения со стандартными ошибками.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о следующем.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на **стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, на подстадии 1 стадии органогенеза** при всех концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в безгормональном контроле ответной реакции зародышей всех изученных сортов не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали. При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на **подстадии 2 стадии органогенеза** на всех вариантах сред с 2,4-Д через 5–7 сут культивирования у всех изученных сортов наблюдали формирование неморфогенных обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Пролиферация каллусов была скудной, и в ходе дальнейшего культивирования такие каллусы постепенно дегенерировали. В контрольном безгормональном варианте каллусообразования не наблюдали, экспланты со временем дегенерировали.

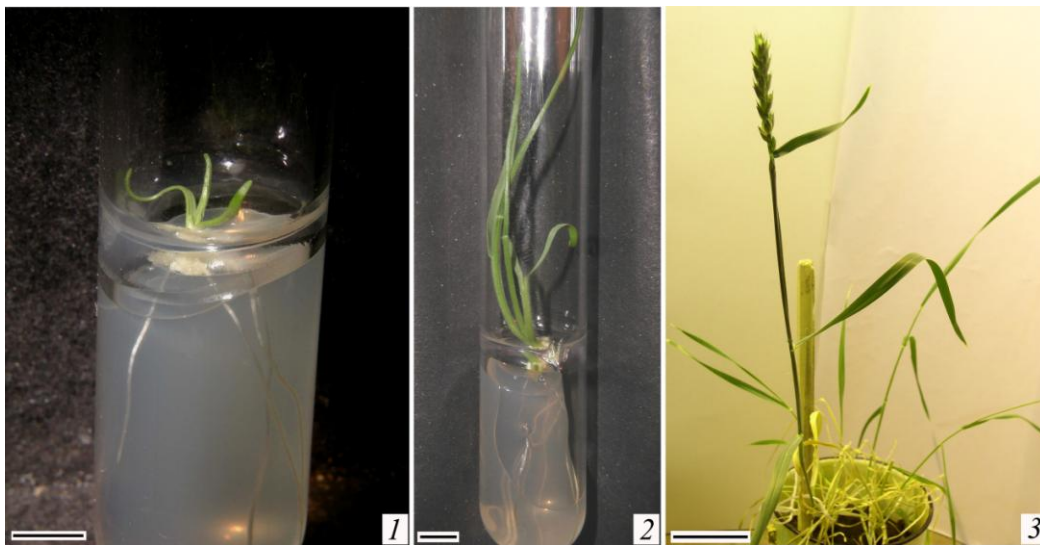


Рис. Развитие регенерантов пшеницы сорта Жница из сформированного зародыша. 1) регенерант в фенофазе 3-го листа, 12 сут культивирования *in vitro* на индукционной среде; 2) регенерант в фенофазе кущения, 7 сут культивирования *in vitro* на регенерационной среде; 3) регенерант в фенофазе полной спелости зерна, 21 сут проращивания в почвенных условиях *ex vitro*. Прижизненная съемка.

Масштаб: 1, 2 – 0.5 см, 3 – 5 см.

Fig. The development of regenerants of wheat cv. Zhnitsa from the formed embryo. 1) the regerant on the phenological stage of 3rd leaf, 12 days of *in vitro* culture on the induction medium; 2) the regerant on the phenological stage of tillering, 7 days of *in vitro* culture on regeneration medium; 3) the regerant on the phenological stage of full ripeness of grain, 21 days of germination on soil conditions *ex vitro*. Lifetime shooting. Scale: 1, 2 – 0.5 cm, 3 – 5 cm.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на **подстадии 3 стадии органогенеза**, через 5–7 сут культивирования при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–4.0 мг/л у всех изученных сортов наблюдали формирование морфогенных каллусов плотной компактной консистенции, матового желтовато-белого цвета, узловой формы. В остальных случаях, в том числе в контрольном безгормональном варианте, формировались неморфогенные каллусы. Зародыши всех изученных сортов, инокулированные на **стадии сформированного зародыша**, при культивировании *in vitro* на среде с добавлением 2,4-Д (все концентрации) через 5–7 сут формировали неморфогенные водянистые

каллусы. Через 10–12 сут культивирования на безгормональной питательной среде (контроль) такие зародыши давали начало проросткам регенерантов.

Регенеранты развивались согласно фенофазам, сходным по продолжительности с фенофазами донорных растений *in planta* в полевых условиях: на индукционной среде *in vitro* – всходы, 3-й лист (рис., 1), на регенерационной среде *in vitro* – кущение (рис., 2), в почвенных условиях *ex vitro* – стеблевание, выход в трубку, колошение, цветение, молочная, восковая и полная спелость зерна (рис., 3).

Полученные данные представлены в табл. 1 на примере отзывчивости незрелых зародышей сорта Жница.

Таблица 1

Влияние стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в питательной среде на отзывчивость зародышей пшеницы сорта Жница в культуре *in vitro*
The effect of stage of embryogenesis and the concentration of 2,4-D in nutrient medium on the responsiveness of embryos of wheat cv. Zhnitsa in culture *in vitro*

Стадия эмбриогенеза Stage of embryogenesis	Сутки после опыления Days after pollination	Отзывчивость зародышей на концентрацию 2,4-Д в питательной среде <i>in vitro</i> Responsiveness of embryos on the concentration of 2,4-D in nutrient medium								
		0.0 мг/л (контроль) 0.0 mg/l (control)	1.0 мг/л 1.0 mg/l	2.0 мг/л 2.0 mg/l	3.0 мг/л 3.0 mg/l	4.0 мг/л 4.0 mg/l	5.0 мг/л 5.0 mg/l	6.0 мг/л 6.0 mg/l	7.0 мг/л 7.0 mg/l	8.0 мг/л 8.0 mg/l
		Четырехклеточный зародыш Four-cell embryo	2.5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Многоклеточный зародыш Multicellular embryo	4.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 1 стадии органогенеза Substage 1 of stage of organogenesis	8.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 2 стадии органогенеза Substage 2 of stage of organogenesis	12.0	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Подстадия 3 стадии органогенеза Substage 3 of stage of organogenesis	17.0	НМК	МК	МК	МК	МК	НМК	НМК	НМК	НМК
Сформированный зародыш Formed embryo	20.0	П	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК

Условные обозначения: Д – дегенерация экспланта; П – формирование проростка; НМК – формирование неморфогенного каллуса; МК – формирование морфогенного каллуса

Conventional signs: Д – degeneration of the explant; П – formation of the plantlet; НМК – formation of non-morphogenic callus; МК – formation of morphogenic callus

Достаточно высокое качество зерновок регенерантов, полученных из сформированных зародышей, подтверждается их лабораторной всхожестью (табл. 2).

Таблица 2

Лабораторная всхожесть зерновок регенерантов пшеницы различных сортов яровой мягкой пшеницы
Grain laboratory germination of regenerants of various cultivars of spring bread wheat

Сорт Cultivar	Лабораторная всхожесть зерновок, % Grain laboratory germination
Жница	87.1±4.2
Салават Юлаев	83.1±1.4
Скала	82.8±3.6
Башкирская 26	82.4±3.7
Экада 70	78.7±2.3

Таким образом, сформированный зародыш следует оценивать как автономный у пшеницы изученных сортов.

Полученные результаты подтвердили высказанное нами [Круглова, 2013] предположение о том, что оценку автономности зародыша *in planta* следует давать не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка фертильного растения в условиях *ex vitro*.

Эти данные могут иметь определённое значение в биотехнологической практике, когда цель технологии состоит в получении регенерантов при минимизации соматической изменчивости, с образованием на конечном этапе *ex vitro* полноценных фертильных регенерантов.

Автономный сформированный зиготический зародыш *in planta* имеет определённый уровень эндогенных гормонов, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшее нормальное прорастание. В литературе представлены работы, посвященные выявлению эндогенных гормонов в зиготических зародышах у разных видов растений [Etienne et al., 1993; Hess et al., 2002; Gusakovskaya et al., 2005; Cheng et al., 2013; Robert et al., 2015; Vykova et al., 2016; Сельдимирова и др., 2017], однако без связи с проблемой автономности. В то же время выявление уровня эндогенных гормонов зародыша в стадии автономности, начиная с которой зародыш способен завершить эмбриогенез вне материнского организма с формированием полноценного растения, представляет значительный интерес с позиций исследования функционального взаимодействия эндогенных гормонов в процессах эмбрионального развития растений.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ №17-04-01477. В работе использовано оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

Литература / References

1. Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А. Основы эмбриогенеза злаков. Киев: Наукова думка, 1991. 176 с. [Bannikova V.P., Khvedynich O.A., Kravets E.A. Osnovy embriogeneza zlakov. Kiev: Naukova dumka, 1991. 176 s.]
2. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с. [Batygina T.V. Khlebnoe zerno. L.: Nauka, 1987. 103 s.]
3. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 528–538. [Batygina T.V. Embryogenesis of cereals // Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. V. 2: Seed / T.V. Batygina (ed.). St.Petersburg: World and Family, 1997. P. 528–538]
4. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с. [Batygina T.V. Biologiya razvitiya rastenii. Simfoniya zhizni. SPb.: DEAN, 2014. 764 s.]
5. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с. [Dospikhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoi obrabotki rezultatov issledovaniy). M.: Agropromizdat, 1985. 351 s.]
6. Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012. № 2. С. 21–24. [Kruglova N.N. Periodizatsiya razvitiya zarodisha pshenitsy kak metodologicheskii aspect biotekhnologicheskikh razrabotok // Izvestia Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN. 2012. № 2. S. 21–24.]
7. Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2013. № 1. С. 42–45. [Kruglova N.N. Vyavlenie kriticheskoi stadii avtonomnosti zarodysya pshenitsy v culture *in vitro* // Izvestia Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN. 2013. № 1. S. 42–45.]
8. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. биохим. культ. растений. 2009. Т. 41. С. 124–131. [Kruglova N.N., Katsasonova A.A. Nezrelyi zarodysh kak morfogeneticheski kompetentnyi eksplant // Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rastenii. 2009. T. 41. S. 124–131.]
9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с. [Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Regeneratsiya pshenitsy *in vitro* i *ex vitro*. Ufa: Gilem, 2011. 124 s.]
10. Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в

- развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2017. № 3(1). С. 114–118. [Seldimirova O.A., Galin I.R., Kruglova N.N., Veselov D.S. Raspredelenie IUK i ABK v razvivayuschikhsya zarodyshakh pshenitsy *in vivo* // Izvestia Ufinskogo Nauchnogo Tsentra RAN. 2017. № 3(1). S. 114–118]
11. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. 824 с. [Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. V. 2: Seed / T.B. Batygina (ed.). St.Petersburg: World and Family, 1997. 824 p.]
12. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 2000. 652 с. [Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. V. 3: Reproductive systems / T.B. Batygina (ed.). St.Petersburg: World and Family, 2000. 652 p.]
13. Batygina T.B. Embryogenesis and morphogenesis of zygotic and somatic embryos // Russ. J. Plant Physiol. 1999. V. 46. P. 774–788.
14. Batygina T.B. Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 2005. V. 47. P. 51–60. doi: 10.1007/s00709-014-0704-2
15. Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. P. 107–120.
16. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // Physiol. Plant. 1966. V. 19. P. 748–753. doi: 10.1111/j.1399-3054.1966.tb07060.x
17. Bykova E.A., Chergintsev D.A., Vlasova T.A., Choob V.V. Effect of the auxin polar transport inhibitor on the morphogenesis of leaves and generative structures during fasciation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Russ. J. Develop. Biol. 2016. V. 47. P. 207–215. doi: 10.1134/S1062360416040032
18. Cheng Z.J., Wang L., Sun W. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3 // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 240–251. doi: 10.1104/pp.112.203166
19. Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 1493–1509. doi: 10.1093/jxb/48.8.1493
20. Elhiti M., Stasolla C. The Use of Zygotic Embryos as Explants for In Vitro Propagation: An Overview // Plant Embryo Culture: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). V. 170 / Eds Thorpe T.A., Yeung E.C. New York: Humana Press, 2011. P. 229–255. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8_17
21. Etienne H., Sotta B., Montoro P. et al. Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) during ontogenesis // Plant Sci. 1993. V. 92. P. 111–119. doi: 10.1016/0168-9452(93)90071-7
22. Gusakovskaya M.A., Blintsov A.N., Bobkova A.F. Spatiotemporal Distribution of Free and Bound Forms of Abscisic Acid in Ovaries of *Triticum aestivum* L. and *Taraxacum officinale* Web. at the Beginning of Embryogenesis // Dokl. Biochem. Biophys. 2005. V. 403. P. 266–268. doi: 10.1007/s10628-005-0088-5
23. Hess J.R., Carman J.G., Banowitz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony // J. Plant Physiol. 2002.V. 159. P. 379–86. doi: 10.1078/0176-1617-00718
24. Kruglova N.N. Periodization of wheat embryo structure development on the basis of anatomical and morphological criteria // Modern Phytomorphology. 2013. V. 4. P. 181–183.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
26. Raghavan V. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997. 609 p. doi: 10.1017/CBO9780511574528.001
27. Raghavan V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. 2003. V. 39. P. 437–442. doi: 10.1079/IVP2003436
28. Robert H.S., Khaitova L.C., Mroue S., Benkova E. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 5029–5042. doi: 10.1093/jxb/erv256