



**СИСТЕМА «ЗАРОДЫШ *IN PLANTA*–КАЛЛУС *IN VITRO*»:
ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ (НА ПРИМЕРЕ ПШЕНИЦЫ)**

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, E-mail: Kruglova@anrb.ru

Резюме

Регенерация полноценных растений из морфогенных каллусов *in vitro* – неотъемлемая часть ряда биотехнологий. В качестве эксплантов для получения морфогенных каллусов у злаков особенно перспективны незрелые зародыши. Исследование посвящено выявлению цитофизиологических особенностей системы «незрелый зародыш *in planta*–морфогенный каллус *in vitro*» у яровой мягкой пшеницы. Результаты культивирования *in vitro* разновозрастных зародышей показали, что оптимальными для получения морфогенного каллуса являются незрелые зародыши в стадии начала органогенеза. В таких зародышах заложены примордии щитка и побега, представленные меристематическими клетками. Поступлению индуктора каллусообразования (ауксин 2,4-Д в оптимальной концентрации) благоприятствует отсутствие плотной стенки у этих клеток. Сформировавшиеся на индукционной среде *in vitro* морфогенные каллусы представлены преимущественно меристематическими клетками, объединенными в группы (меристематические очаги). Тем самым в каллусах создаются цитологические предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза *in vitro*. Обсуждается вопрос о морфогенетической компетентности незрелых зародышей как эксплантов для получения морфогенных каллусов. Предложено незрелый зародыш *in planta* на стадии начала органогенеза и индуцированный *in vitro* морфогенный каллус рассматривать как единую систему для биотехнологических исследований хлебных злаков.

Ключевые слова: незрелый зародыш *in planta*, морфогенный каллус *in vitro*, меристематические клетки, ауксин 2,4-Д, пшеница

Цитирование: Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Система «Зародыш *in planta*–каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы) // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 180-189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8

© Авторы

**THE “EMBRYO *IN PLANTA*–CALLUS *IN VITRO*” SYSTEM:
CYTOPHYSIOLOGICAL ASPECTS (BY EXAMPLE OF WHEAT)**

Kruglova N.N., Seldimirova O.A.

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of RAS
450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 69, E-mail: Kruglova@anrb.ru

Resume

Plant regeneration from morphogenic calli *in vitro* is an integral part of several biotechnologies. Immature embryos are particularly promising as explants for obtaining morphogenic calli in cereals. The study is devoted to the identification of cytophysiological features of the "immature embryo *in planta*–morphogenic callus *in vitro*" system in spring bread wheat. The results of culture *in vitro* of different-ages embryos showed that immature embryos at the beginning of organogenesis are optimal for obtaining morphogenic callus. These embryos contain primordia of the scutellum and the shoot, represented by meristematic cells.

The penetration of the inducer of callus formation (auxin 2,4-D in the optimal concentration) is favored by the absence of a dense wall in these cells. Morphogenic calli formed on the induction medium *in vitro* are mainly represented by meristematic cells united in groups (meristematic zones). This creates cytological prerequisites in the calli for the future implementation of various pathways of morphogenesis *in vitro*. The question about morphogenetic competence of immature embryos as the explants for obtaining morphogenic calli is discussed. It is proposed to consider the immature embryo *in planta* at the stage of the beginning of organogenesis and the morphogenic callus induced *in vitro* as a single system for biotechnological researches of cereals.

Keywords: immature embryo *in planta*, morphogenic callus *in vitro*, meristematic cells, auxin 2,4-D, wheat

Citation: Kruglova N.N., Seldimirova O.A. The “embryo *in planta*–callus *in vitro*” system: Cytophysiological aspects (by example of wheat). *Biomics*. 2020. V.12(2). P. 180-189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8 (In Russian)

© The Authors

Введение

Морфогенный каллус *in vitro* – интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей), так и эндогенно (в глубине этих тканей), изначально состоящая из однородных клеток, постепенно преобразующихся в группы гетерогенных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза [Батыгина (Batygina), 2014]. Плюрипотентные клетки каллуса в ходе дальнейшего культивирования способны развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*, включая регенерацию полноценных растений. Многочисленными исследованиями выявлено, что успех в формировании морфогенных каллусов *in vitro* определяется комплексом взаимосвязанных эндогенных (генотип донорного растения, эпигенетические свойства экспланта, тип и возраст экспланта/донорного растения, свойства клеток эксплантов и др.) и экзогенных (условия выращивания донорных растений, предварительное стрессовое воздействие на эксплант/донорное растение, состав индукционной среды, физические условия культивирования *in vitro* и др.) факторов. Эндогенные факторы в целом расцениваются как существование в эксплантах клеток, морфогенетически компетентных к восприятию индукторов инициации каллусогенеза *in vitro*, экзогенные факторы – как сами эти индукторы (см. обзоры [Круглова и др. (Kruglova et al.), 2018б; Feher, 2019; Зинатуллина (Zinatullina), 2020]).

Большой практический интерес вызывают исследования каллусогенеза *in vitro* злаков как коммерчески ценной группы растений. Перспективными эксплантами для получения морфогенных каллусов в биотехнологических целях проявили себя незрелые зародыши злаков [Круглова, Катасонова, 2009; Chu et al., 2016; Seldimirova et al., 2016; Miroschnichenko et al., 2017]. Эти результаты можно объяснить тем, что индукция

каллусообразования предполагает репрограммирование морфогенетически компетентных инициальных клеток эксплантов (см. обзоры [Doll et al., 2017; Ikeuchi et al., 2018, 2019]), к чему более предрасположены клетки онтогенетически молодых органов.

Хорошо известно, что развитие зародыша при такой системе размножения, как зиготическая эмбриогения *in planta*, представляет собой единый процесс, в результате которого из исходной клетки (зиготы) формируется зрелый зародыш [Батыгина (Batygina), 2014; Radoeva et al., 2019]. В то же время в своем морфогенезе зародыш проходит ряд взаимосвязанных стадий, различающихся как по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, так и значению для дальнейшего развития. Каждая из стадий эмбриогенеза направлена на реализацию морфогенетического потенциала зародыша и онтогенетической программы развития особи в целом. Такая стадийность выявлена и при эмбриогенезе злаков (см. обзор [Круглова и др., 2019 (Kruglova et al., 2020)]). Решение проблемы морфогенетической компетентности незрелых зародышей злаков как эксплантов для получения морфогенных каллусов *in vitro* напрямую связано с выявлением их цитологического статуса на оптимальной для этого стадии эмбриогенеза *in planta*.

Важно также дать оценку цитологических особенностей морфогенных каллусов, сформировавшихся из незрелых зародышей на индукционной среде *in vitro*, содержащей гормональный индуктор каллусообразования в оптимальной для этого концентрации.

Данная работа посвящена выявлению цитологических особенностей как незрелых зародышей пшеницы на стадии эмбриогенеза *in planta*, оптимальной для получения морфогенных каллусов *in vitro*, так и полученных из них морфогенных каллусов на оптимизированных по

концентрации гормона 2,4-Д питательных средах, в целях разработки системы «зародыш *in planta* – зародышевый каллус *in vitro*» для биотехнологических исследований хлебных злаков.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили растения яровой мягкой пшеницы сорта Башкирская 28, выведенного в лаборатории селекции яровой пшеницы БашНИИ СХ УФИЦ РАН. Семена любезно предоставлены автором сорта к. с.-х.н. В.И. Никоновым согласно договору о творческом сотрудничестве между УИБ УФИЦ РАН и БашНИИ СХ УФИЦ РАН.

Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). В период активного цветения проводили искусственное опыление 2-х нижних цветков колосков средней трети колоса, семязачатки которых находятся на одной стадии развития [Круглова, Сельдимирова (Kruglova, Seldimirova), 2011].

На питательные среды инокулировали незрелые зародыши, изолированные через определенное время после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза, согласно авторской периодизации [Круглова (Kruglova), 2012]: четырехклеточный зародыш (2-3 сут после опыления), многоклеточный зародыш (4-5 сут после опыления), начало органогенеза (7-9 сут после опыления), активный органогенез (12-15 сут после опыления), завершение органогенеза (17-18 сут после опыления), сформированный зародыш (20-21 сут после опыления).

Для индукции каллусообразования использовали питательную среду, составленную по полной прописи [Murashige, Skoog, 1962], pH 5.8, с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в следующих концентрациях: 0.0 (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Зародыши, размещенные на среде щитком вниз, инкубировали в темноте при +27°C до ответной реакции эксплантов или их деградации. Вели визуальную оценку морфологических показателей каллусов с выявлением морфогенных/неморфогенных каллусов согласно ранее разработанным критериям [Круглова, Сельдимирова (Kruglova, Seldimirova), 2011].

Прижизненную съемку морфогенных каллусов вели с применением цифровой камеры “Olympus Camedia C-4000” (“Olympus Optical Co., Ltd”, Japan).

Использовали предложенные нами

гистологические (светооптические) методы, модифицированные применительно к биотехнологическим исследованиям [Круглова и др. (Kruglova et al.), 2013]. Гистологические препараты незрелых зародышей и морфогенных каллусов анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL 10×/0.3. Фотографирование изображений вели с помощью цифровой фотокамеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 (Carl Zeiss, Germany).

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблице приведены средние значения со стандартными ошибками.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, реакция незрелых зародышей пшеницы на условия культуры *in vitro* при прочих равных условиях определялась стадией эмбриогенеза и концентрацией 2,4-Д в индукционной среде (табл.). При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, при всех концентрациях 2,4-Д в среде и в безгормональном контроле ответной реакции зародышей не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали.

Культивирование *in vitro* зародышей, инокулированных на стадии начала органогенеза, при концентрациях 2,4-Д в 1.0-5.0 мг/л, приводило к формированию каллусов, представляющих собой структуры плотной компактной консистенции, светлых, узловой формы. Такие каллусы по морфологическим признакам отнесены к морфогенным. В контрольном безгормональном варианте, а также при повышенных (6.0-8.0 мг/л) концентрациях 2,4-Д из зародышей на стадии начала органогенеза формировались оводненные каллусы темно-желтого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Такие каллусы по их морфологическим признакам отнесены к неморфогенным.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях активного органогенеза и завершения органогенеза, на всех вариантах сред с 2,4-Д наблюдали формирование неморфогенных каллусов. В контрольном безгормональном варианте каллусообразования не наблюдали, а зародыши постепенно дегенерировали.

Влияние стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в индукционной среде на реакцию *in vitro* незрелых зародышей пшеницы сорта Башкирская 28
Table. Effect of the stage of embryogenesis and the concentration of 2,4-D in the induction medium on the *in vitro* reaction of immature wheat embryos of the Bashkirskaya 28 variety

Стадия эмбриогенеза Stage of embryogenesis	Сутки после опыления Days after pollination	Концентрация 2,4-Д в индукционной среде <i>in vitro</i> Concentration of 2,4-D in the induction medium <i>in vitro</i>									
		0.0 мг/л (контроль)	1.0 мг/л	2.0 мг/л	3.0 мг/л	4.0 мг/л	5.0 мг/л	6.0 мг/л	7.0 мг/л	8.0 мг/л	
Четырехклеточный зародыш Four-cellular embryo	2-3	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D
Многоклеточный зародыш Multicellular embryo	4-5	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D	Д D
Начало органогенеза Beginning of organogenesis	7-9	НМК NMC	МК MC	МК MC	МК MC	МК MC	МК MC	МК MC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC
Активный органогенез Active organogenesis	12-15	Д D	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC
Завершение органогенеза Finishing of organogenesis	17-18	Д D	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC
Сформированный зародыш Formed embryo	20-21	П P	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC	НМК NMC

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

Legends: MC – formation of morphogenic callus, NMC – formation of nonmorphogenic callus, P – formation of plantlet, D – degeneration of explant

Сформированные зародыши при культивировании *in vitro* на всех вариантах сред с добавлением 2,4-Д формировали неморфогенные каллусы. При культивировании на безгормональной среде (контроль) такие зародыши давали начало проросткам регенерантов. Аналогичные данные были получены нами ранее при культивировании незрелых зародышей ряда генотипов пшеницы с целью выявления стадии относительной автономности зародышей, способных к самостоятельному развитию на безгормональной среде [Круглова (Kruglova), 2013; Круглова и др. (Kruglova et al.), 2018a]. Таким образом, стадия сформированного зародыша соответствует стадии относительной автономности эмбриогенеза (обзор этой проблемы дан нами в работе [Круглова и др. (Kruglova et al.), 2020]).

Данные цитологического анализа незрелого зародыша пшеницы на стадии начала органогенеза, способного к формированию морфогенного каллуса, представлены на рис. 1. В таком зародыше выявляются примордии органов – щитка (семядоли) и побега, представленные меристематическими клетками. Формирующийся щиток занимает терминальное положение, а формирующаяся апикальная меристема побега по отношению к щитку расположена латерально. В зоне инициации апикальной меристемы побега образуется бороздка, разделяющая щиток и апикальную меристему побега. В основании апикальной части побега заметна зона таблитчатых меристематических клеток. Формируется суспензор.

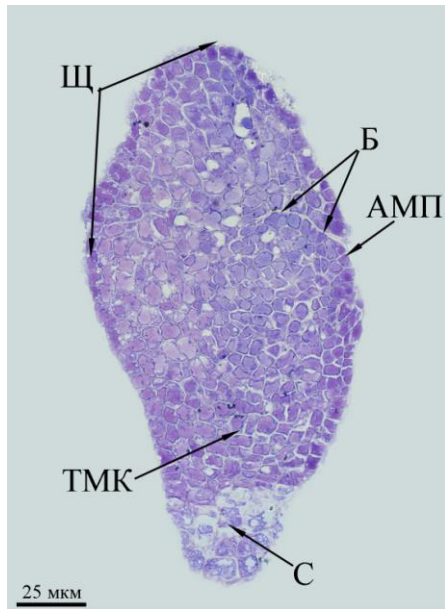


Рис. 1. Зародыш пшеницы на стадии начала органогенеза по данным световой микроскопии.
 Условные обозначения: АПМ – апикальная меристема побега, Б – бороздка, Щ – щиток, С – суспензор, ТМК – таблитчатые меристематические клетки.
 Fig. 1. Wheat embryo at the stage of beginning of organogenesis according to light microscopy data.
 Legend: АПМ – shoot apical meristem, Б – furrow, С – суспензор, ТМК – tabular meristematic cells.

Важен тот факт, что меристематические клетки этих формирующихся органов еще не покрыты плотной целлюлозной стенкой. Особенно это важно в случае клеток щитка, по данным многих авторов дающих начало морфогенному каллусу у злаков. Неслучайно в биотехнологических протоколах рекомендуется размещать зародыши злаков на агаризованной среде щитком вниз, в тесном контакте со средой (см. обзор [Круглова и др. (Kruglova et al.), 2018б]). Пограничное (зародыш/среда) положение клеток щитка способствует индуцированию в них каллусогенеза *in vitro*, при этом успешному поступлению индуктора морфогенного каллуса (главным образом экзогенного гормона, в нашем случае синтетического ауксина 2,4-Д) способствует отсутствие плотной стенки.

В результате ранее выполненных нами ультраструктурных исследований незрелых зародышей пшеницы на стадии начала органогенеза в клетках щитка выявлены митохондрии с хорошо развитыми внутренними мембранами, амилопласты с крахмальными зернами, цистерны комплекса Гольджи с везикулами, липидные капли, агранулярный эндоплазматический ретикулум [Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2017б]. Всё это свидетельствует о высокой метаболической активности клеток щитка, обусловленной активным морфогенезом в таких незрелых зародышах.

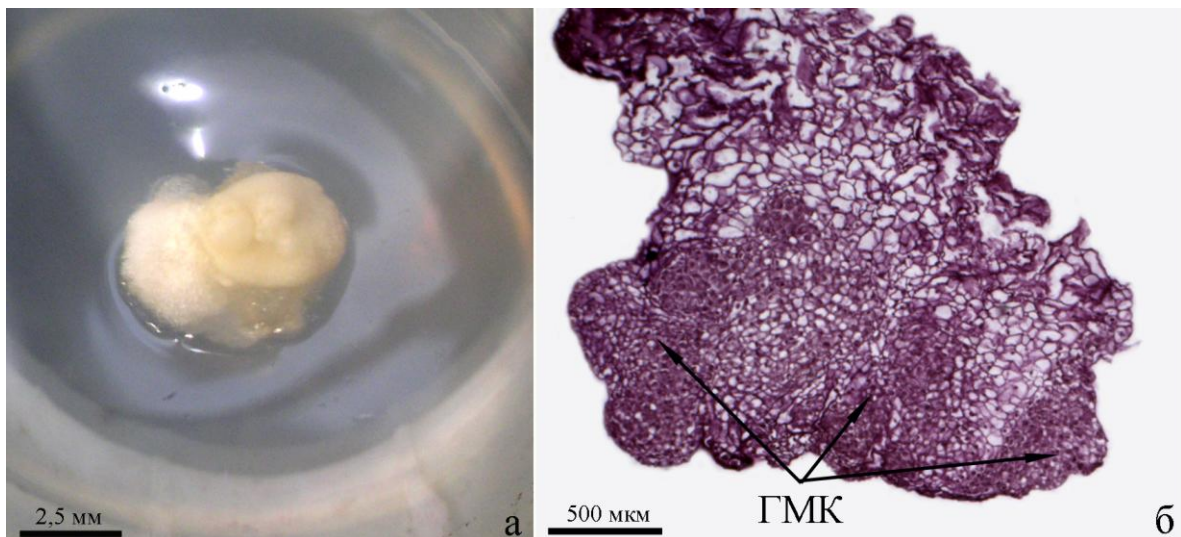


Рис. 2. Морфогенный каллус пшеницы по морфологическим (а) и цитологическим (б) данным. Условные обозначения: ГМК – группа меристематических клеток.
 Fig. 2. Wheat morphogenic callus according to morphological (a) and cytological (б) data.
 Legend: ГМК – group of meristematic cells.

Активными морфогенетическими процессами в зародышах на стадии начала органогенеза можно объяснить и увеличение содержания ключевых гормонов морфогенеза – ИУК и цитокининов – в зерновках пшеницы [Hess et al., 2002; Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2017a] и ячменя [Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2018б; Seldimirova et al., 2019] на 7 сут после опыления в сравнении с аналогичными показателями на 0 сут. В зародышах кукурузы цитокинины на 8 сут после опыления выявлены в месте инициации апикальной меристемы побега [Chen et al., 2014]. Снижение содержания АБК в зерновках пшеницы [Hess et al., 2002; Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2017a] и ячменя [Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2018б; Seldimirova et al., 2019] на 7 сут после опыления по сравнению с 0 сут после опыления можно объяснить тем, что этот гормон не оказывает существенного влияния на развитие зародышей на ранних стадиях. Более того, нами выявлено, что такие «ранние» зародыши нормально развивались в АБК-дефицитных зерновках ячменя [Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2018a,б; Seldimirova et al., 2019].

По морфологическим показателям морфогенные каллусы, сформировавшиеся, как правило, к 7 сут культивирования *in vitro* незрелых зародышей на индукционной среде, представляют собой структуры плотной компактной консистенции, светлые, узловатой формы (рис. 2а). Гистологический анализ показал, что клетки таких каллусов плотно прилегают друг к другу. По таким признакам, как правильная изодиаметрическая форма, незначительная вакуолизация и наличие крупных ядер, занимающих центральное положение, большинство клеток каллуса можно характеризовать как меристематические, согласно критериям [Meristematic cells ..., 2002]. Часть меристематических клеток объединена в группы (рис. 2б).

Формирование групп меристематических клеток (в литературе называемых меристематическими очагами) в морфогенных каллусах, по нашему мнению, важный факт, свидетельствующий о становлении в каллусах гистологической зональности. Сведения о формировании таких очагов в морфогенных каллусах получены на примере различных растений, в том числе злаков [Евсеева и др. (Evseeva et al.), 2007; Seldimirova et al., 2016; Ijaz et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019]. Обсуждается вопрос о возможном молекулярном маркере клеток меристематических очагов каллусов – пролиферативном антигене инициалей; при этом высказано предположение, что меристематические клетки морфогенетического очага выполняют функцию, аналогичную инициальным

клеткам в апикальных меристемах побега и корня *in planta* [Евсеева и др. (Evseeva et al.), 2007].

В целом, важно подчеркнуть, что в морфогенных каллусах на индукционной среде создаются гистологические предпосылки для будущей реализации путей морфогенеза *in vitro*, ведущих к формированию полноценных регенерантов (эмбриодогенез, гемморизогенез), после переноса каллусов на регенерационную среду.

Заключение

Формирование морфогенного каллуса в условиях выполненных экспериментов на примере сорта пшеницы Башкирская 28 отмечено только при культивировании *in vitro* незрелых зародышей, инокулированных на стадии начала органогенеза (7–9 сут после опыления). В таких зародышах наблюдаются активные морфогенетические процессы в меристематических клетках формирующихся органов (семядоля-щиток, побег).

Полученные данные позволяют включиться в дискуссию о соотношении эндогенных и экзогенных факторов индукции каллусогенеза в эксплантах *in vitro*. При прочих равных условиях морфогенетическая компетентность клеток незрелого зародыша пшеницы *in planta* изученного сорта к формированию морфогенного каллуса *in vitro* определяется не столько воздействием индуктора – синтетического ауксина 2,4-Д в оптимальной концентрации (экзогенный фактор), сколько статусом клеток экспланта в момент инокуляции (эндогенный фактор), а именно – их меристематичностью, связанной, скорее всего, со способностью к репрограммированию в плюрипотентное состояние в начале культивирования *in vitro*. По нашему мнению, по крайней мере, для злаков именно природа экспланта является основным эндогенным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток к формированию морфогенного каллуса *in vitro*. Концентрация 2,4-Д также играет определенную роль в индукции формирования морфогенного каллуса, однако, на нашем мнению, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде вариантов отзывчивость экспланта не зависела от наличия 2,4-Д в индукционной среде.

Светооптический анализ показал, что сформировавшиеся морфогенные каллусы представлены преимущественно меристематическими клетками, часть которых объединена в группы (меристематические очаги). Формирование таких клеточных групп свидетельствует о становлении в каллусах цитологических предпосылок для будущей

реализации путей морфогенеза *in vitro*, ведущих к формированию полноценных регенерантов.

В целом, зародыш пшеницы *in planta* на стадии начала органогенеза и индуцированный *in vitro* морфогенный каллус можно рассматривать как единую систему, удобную в биотехнологических исследованиях. Уникальность развития зародышей злаков, позволившая выделить отдельный тип их эмбриогенеза – Graminad [Батыгина (Batygina), 2014], позволяет сделать вывод о возможности экстраполяции системы «зародыш *in planta* – зародышевый каллус *in vitro*» пшеницы на биотехнологические исследования всех представителей этого семейства.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6.

В работе использована приборная база Центра коллективного пользования “Агидель” УФИЦ РАН.

Литература

- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В., Фадеева И.Ю., Щеголев С.Ю. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // *Физиол. раст.* 2007. Т. 54(2). С. 306–311.
- Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // *Успехи соврем. биол.* 2020. Т. 140(2). С. 183–194. doi: 10.31857/S0042132420020040
- Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // *Изв. Уфимского науч. центра РАН.* 2012. № 2. С. 21–24.
- Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // *Изв. Уфимского науч. центра РАН.* 2013. № 1. С. 42–45.
- 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.
- Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // *Физиол. биохим. культ. раст.* 2009. Т. 41(2). С. 124–131.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // *Успехи соврем. биол.* 2019. Т. 139(4). С. 326–337. doi: 10.1134/S0042132419040057
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Критическая стадия автономности зародыша пшеницы *in planta* // *Биомика.* 2018а. Т. 10(1). С. 1–6. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs2018-1
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // *Онтогенез.* 2018б. Т. 49(5). С. 273–288. doi: 10.1134/S0475145018050038
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков) // *Онтогенез.* 2020. Т. 51(1). С. 3–18. doi: 10.31857/S0475145020010024
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // *Изв. Уфимского науч. центра РАН.* 2017а. № 3(1). С. 114–118.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Влияние АБК на созревание зародышей ячменя *in vivo*: результаты изучения дефицитного по АБК мутанта // *Экобиотех.* 2018а. Т. 1(4). С. 203–211. doi: 10.31163/2618-964X-2018-1-4-203-211
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // *Экобиотех.* 2018б. Т. 1(3). С. 134–142. doi: 10.31163/2618-964X-2018-1-3-134-142
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспоридиальных эмбрионов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // *Онтогенез.* 2017б. Т. 48(3). С. 220–233. doi: 10.7868/S0475145017030119
- Chen J., Lausser A., Dresselhaus T. Hormonal responses during early embryogenesis in maize // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. P. 325–331. doi: 10.1042/-BST20130260

18. Chu Z., Chen J., Xu H., Dong Z., Chen F., Cui D. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* cultures // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01302
19. Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M., Widiez T. Signaling in early maize kernel development // *Mol. Plant.* 2017. V. 10. P. 375–388. doi: 10.1016/j.molp.2017.01.008
20. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? // *Front. Plant Sci.* 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.00536
21. Hess J.R., Carman J.G., Banowitz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony // *J. Plant Physiol.* 2002. V. 159. P. 379–386. doi: 10.1078/0176-1617-00718
22. Ijaz B., Sudiro C., Hyder M.Z., Hyder M.Z., Malik S.I., Farrakh S., Schiavo F.L., Yasmin T. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2019. V.55. P.569–580. doi: 10.1007/s11627-019-09974-6
23. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. Molecular mechanisms of plant regeneration // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434
24. Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B., Iwase A., Bagman A.-M., Watt L., Coleman D., Favero D., Takahashi T., Ahnert S., Brady S.M., Sugimoto K. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // *Plant Cell Physiol.* 2018. V. 59. P. 770–782. doi: 10.1093/pcp/pcy013
25. Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E., Dinkova T.D. Development-related miRNA expression and target regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of Tuxpeno VS-535 maize cultivar // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. doi: 10.3390/ijms20092079
26. Meristematic tissues in plant growth and development / Eds McManus M.T., Veit B. Sheffield: Sheffield Acad. Press, 2002. 301 p. doi: 10.1023/A:1024904818215
27. Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M., Dolgov S. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species // *PLoS ONE.* 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0173533
28. 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
29. Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z., Weijers D. Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis // *Dev. Cell.* 2019. V. 50. P. 533–543. doi: 10.1016/j.devcel.2019.07.011
30. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 251–264. doi: 10.1007/s11627-016-9767-4
31. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // *Seed Sci. Res.* 2019. V.29(4). P.261-269. doi: 10.1017/S0960258519000229

References

1. Batygina T.B. Biologija razvitija rastenij. SPb.: DEAN, 2014. 764 s. [Biology of plant development]. (In Russian).
2. Chen J., Lausser A., Dresselhaus T. Hormonal responses during early embryogenesis in maize. *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. P. 325–331. doi: 10.1042/BST20130260
3. Chu Z., Chen J., Xu H., Dong Z., Chen F., Cui D. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* cultures. *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01302
4. Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M., Widiez T. Signaling in early maize kernel development. *Mol. Plant.* 2017. V. 10. P. 375–388. doi: 10.1016/j.molp.2017.01.008
5. Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Lobachev Ju.V., Fadeeva I.Ju., Shhegolev S.Ju. Biohimicheskaja ocenka morfogeneticheskogo potenciala kallusnyh kletok pshenicy *in vitro*. *Fiziol. rast.* 2007. T. 54(2). S. 306–311. [Biochemical evaluation of the morphogenetic potential of wheat callus cells] (In Russian).
6. Feher A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front. Plant Sci.* 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.00536
7. Hess J.R., Carman J.G., Banowitz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony. *J.*

- Plant Physiol.* 2002. V. 159. P. 379–386. doi: 10.1078/0176-1617-00718
8. Ijaz B., Sudiro C., Hyder M.Z., Hyder M.Z., Malik S.I., Farrakh S., Schiavo F.L., Yasmin T. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2019. V.55. P.569–580. doi: 10.1007/s11627-019-09974-6
 9. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. Molecular mechanisms of pPlant regeneration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434
 10. Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B., Iwase A., Bagman A.-M., Watt L., Coleman D., Favero D., Takahashi T., Ahnert S., Brady S.M., Sugimoto K. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. *Plant Cell Physiol.* 2018. V. 59. P. 770–782. doi: 10.1093/pcp/pcy013
 11. Kruglova N.N. Periodizacija razvitija zarodysha pshenicy kak metodologicheskij aspekt biotehnologicheskikh razrabotok. *Izv. Ufinskogo nauch. centra RAN.* 2012. No 2. S. 21–24. [Periodization of wheat embryo development as a methodological aspect for biotechnological researches]. (In Russian).
 12. Kruglova N.N. Vyjavlenie kriticheskoj stadii avtonomnosti zarodysha pshenicy v kulture *in vitro*. *Izv. Ufinskogo nauch. centra RAN.* 2013. No 1. S. 42–45. [Identification of the critical stage of wheat embryo autonomy in *in vitro* culture]. (In Russian).
 13. Kruglova N.N., Egorova O.V., Seldimirova O.A., Zajcev D.Yu., Zinatullina A.E. Svetovoj mikroskop kak instrument v biotehnologii rastenij. Ufa: Gilem, Bashk. jencikl., 2013. 128 s. [Light microscope as a tool in plant biotechnology]. (In Russian).
 14. Kruglova N.N., Katasonova A.A. Nezrelyj zarodysh pshenicy kak morfogeneticheski kompetentnyj jeksplant. *Fiziol. biohim. kult. rast.* 2009. T. 41(2). S. 124–131. [Immature wheat embryo as a morphogenetically competent explant]. (In Russian).
 15. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Regeneracija pshenicy *in vitro* i *ex vitro*. Ufa: Gilem, 2011. 124 s. [Wheat regeneration *in vitro* and *ex vitro*]. (In Russian).
 16. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals. *Biol. Bull. Rev.* 2020. V. 10. P. 115–126. doi: 10.1134/S2079086420020048
 17. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. Kriticheskaja stadija avtonomnosti zarodysha pshenicy in planta. *Biomics.* 2018a. T. 10(1). S. 1–6. [Critical stage of wheat embryo autonomy *in planta*]. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs2018-1 (In Russian).
 18. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. P. 245–259. doi: 10.1134/S106236041805003X
 19. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals). *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 1–15. doi: 10.1134/S1062360420010026
 20. Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E., Dinkova T.D. Development-related miRNA expression and target regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of Tuxpeno VS-535 maize cultivar. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. doi: 10.3390/ijms20092079
 21. Meristematic tissues in plant growth and development. Eds McManus M.T., Veit B. Sheffield: Sheffield Acad. Press, 2002. 301 p. doi: 10.1023/A:1024904818215
 22. Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M., Dolgov S. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species. *PLoS ONE.* 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0173533
 23. 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
 24. Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z., Weijers D. Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis. *Dev. Cell.* 2019. V. 50. P. 533–543. doi: 10.1016/j.devcel.2019.07.011
 25. Seldimirova O.A., Galin I.R., Kruglova N.N., Veselov D.S. Raspredelenie IUK i ABK v razvivajushhihsja zarodyshah pshenicy *in vivo*. *Izv. Ufinskogo nauch. centra.* 2017a. № 3(1). S. 114–118. [Distribution of IAA and ABA in developing wheat embryo *in vivo*]. (In Russian).
 26. Seldimirova O.A., Galin I.R., Kudojarova G.R., Kruglova N.N., Veselov D.S. Vlijanie ABK na sozrevanie zarodyshej jachmenja *in vivo*: rezul'taty izuchenija deficitnogo po ABK mutanta. *Ecobiotech.* 2018a. T. 1(4). S. 203–211. [The effect of ABA on the maturation of barley embryos *in vivo*: results of the study of a mutant

- deficient in ABA]. doi: 10.31163/2618-964X-2018-1-4-203-211 (In Russian).
27. Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Sravnitel'naja ocenka urovnja IUK, ABK i citokininov v jembriogeneze in vivo jachmenja sorta Steptoe i ego ABK-deficitnogo mutanta AZ34. *Ecobioteh.* 20186. T. 1(3). С. 134–142. [Comparative evaluation of the level of IAA, ABA and cytokinins in *in vivo* embryogenesis of Steptoe barley and its ABA-deficient mutant AZ34]. doi: 10.31163/2618-964X-2018-1-3-134-142 (In Russian).
 28. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 251–264. doi: 10.1007/s11627-016-9767-4
 29. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar. *Seed Sci. Res.* 2019. V.29(4). P.261-269. doi: 10.1017/S0960258519000229
 30. Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Titova G.E., Batygina T.B. Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo* zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development. *Russ. J. Dev. Biol.* 20176. V. 48. P. 185–197. doi: 10.1134/S1062360417030109
 31. Zinatullina A.E. Citofiziologicheskie osobennosti kontrastnyh tipov kallusov *in vitro*. *Uspehi sovrem. biol.* 2020. T. 140(2). S. 183–194. [Cytophysiological features of contrasting types of callus *in vitro*] doi: 10.31857/S0042132420020040 (In Russian).