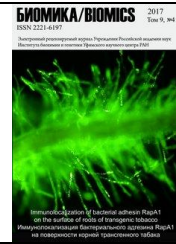




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



**К ВОПРОСУ ОБ УЧАСТИИ АУКСИНОВ В ИНДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ
МОРФОГЕНЕЗА В МОДЕЛЬНОЙ КАЛЛУСНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO*
(НА ПРИМЕРЕ ЗЛАКОВ)**

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдиминова, Д.С. Веселов

Уфимский Институт биологии РАН, Уфа, e-mail: kruglova@anrb.ru

Резюме

Универсальность путей морфогенеза *in vivo*, *in situ* и *in vitro* позволяет выбрать модель для изучения закономерностей и особенностей морфогенетических процессов у растений, в том числе при эмбриональном и раннем постэмбриональном развитии. Перспективные модельные системы в этой области исследования – каллусные культуры *in vitro*. В данной статье представлен краткий обзор литературных и собственных данных, полученных при исследовании фитогормональных (главным образом ауксиновых) особенностей индукции каллусогенеза и путей морфогенеза *in vitro* в каллусах культурных злаков. Показана зависимость между ауксиновым статусом эксплантов и их способностью как к формированию каллусов, так и к морфогенезу каллусов *in vitro*. Методологический подход, состоящий в выявлении и использовании оптимального баланса эндогенных (в составе экспланта) и экзогенных (в составе питательной среды) ауксинов, позволяет приблизиться к процессу управления путями морфогенеза *in vitro* в модельных каллусных системах.

Ключевые слова: морфогенез растений; культура *in vitro*; каллус; фитогормоны; ауксины; культурные злаки

**TO THE QUESTION ABOUT THE INVOLVEMENT OF AUXINS IN INDUCTION AND REGULATION OF
MORPHOGENESIS IN CALLUS MODEL SYSTEM *IN VITRO*
(ON THE EXAMPLE OF CEREALS)**

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

Ufa Institute of Biology of RAS, Ufa, email: kruglova@anrb.ru

Resume

The universality of the pathways of morphogenesis *in vivo*, *in situ* and *in vitro* allows to choose a model for the study of regularities and peculiarities of morphogenetic processes in plants including embryonic and early post-embryonic development. A perspective model systems in this field of study are the callus cultures *in vitro*. This article presents the brief review of the literature and own data obtained during the investigation of phytohormonal characteristics of the induction of callusogenesis and morphogenesis *in vitro* in cereal calli. The dependence between phytohormonal status of explants and their ability to the formation of calli as well as morphogenesis of calli *in vitro* was demonstrated. The methodological technique, consisting in identifying and using the optimal balance of endogenous (in explant) and exogenous (in nutrient medium) auxins, allows to approach the ways of morphogenesis *in vitro* manageable in the callus model systems.

Keywords: plant morphogenesis, culture *in vitro*; callus; phytohormone; auxin; cereals

Сложнейшей фундаментальной проблемой биологии развития остается морфогенез растений – последовательная цепь изменений формы в

онтогенезе, приводящих к созданию высокоспецифичной пространственной структуры (по [Синнот, 1963; Бутенко, 1964; Гилберт, 1995;

Иванов, 2011]). Особенно острое звучание эта проблема приобретает при анализе морфогенеза растений *in vitro* [Бутенко, 1994; Nosov, 1999; Zhuravlev, Omelko, 2008], а также эмбрионального и раннего постэмбрионального развития растений как *in vivo* [Батыгина, 1987, 2000, 2014; Batygina, 1999, 2005], так и *in vitro* [Батыгина и др. 1978; Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Elhiti, Stasolla, 2011; Seldimirova, Kruglova, 2013; Сельдиминова, Круглова, 2014].

Исследования в области морфогенеза растений приобрели особую значимость. Это вызвано рядом причин. Во-первых, растительный морфогенез – весьма пластичный и обратимый процесс, что позволяет достаточно легко манипулировать развитием растения, изучать отдельные стадии развития независимо от других. Кроме того, активно развивающиеся в последнее время практические направления, использование достижений генной инженерии для создания новых форм растений требуют и более фундаментальных знаний и соответственно исследований в области биологии растений, в том числе изучения механизмов их развития. Однако исследования морфогенеза растений затруднены интегральным характером морфогенетических процессов, зависимостью их от многих внутренних и внешних факторов и их взаимодействий.

При изучении феномена морфогенеза большое внимание уделяется системному подходу, позволяющему понять функционирование организмов как целостных и динамических систем, не сводимых к простой сумме своих элементов [Берталанфи, 1969; Урманцев, 1979; Gutierrez et al., 2005; Kumar 2013]. Использование системного подхода выявило универсальность путей морфогенеза в естественных условиях *in vivo* и в условиях экспериментов *in situ* и *in vitro* [Батыгина и др. 1978; Батыгина, 2000, 2014; Батыгина и др., 2010; Batygina, 2012; Батыгина, Осадчий, 2015]. Такая универсальность позволяет выбрать более удобную, чем целый организм, модель для изучения закономерностей и особенностей морфогенетических процессов у растений.

Перспективные модельные системы в этой области исследования – каллусные культуры *in vitro*. Основанием для использования каллусных тканей в качестве моделей служит главным образом важная роль клеток в процессах морфогенеза – темпы и ориентация клеточных делений, рост клеток и их дифференциация.

Первые работы, посвященные получению каллуса из сегментов мезофилла листа и изучению каллусогенеза как пути морфогенеза *in vitro*, появились еще в конце XIX-начале XX вв. (по

[Sugiyama, 2015]), однако однозначного определения каллуса не предложено (по [Круглова, Сельдиминова, 2010; Ikeuchi et al., 2013, 2015]). В своих исследованиях мы придерживаемся следующих характеристик каллуса: это изначально гетерогенная интегрированная система, образующаяся в результате пролиферации клеток разных органов; состоит из групп клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза *in vitro* (по [Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдиминова, 2010]).

Особый интерес вызывают каллусы, полученные из различных эксплантов злаков. Такой интерес обусловлен сложностью морфогенетических процессов в культуре *in vitro* у представителей этой группы растений как проявлением изменчивости генома в процессе каллусообразования *in vitro*, которой злаки особенно подвержены в силу незначительной «ювенилизации» генома однодольных (по [Kunakh, 1999]). Немаловажное значение в данном случае имеет и разработка биотехнологических способов получения новых генотипов культурных злаков, в том числе на основе использования каллусов [Основы биотехнологии..., 2017 и др.]

Цель данной статьи – краткий обзор литературных и собственных данных, полученных при исследовании особенностей индукции каллусогенеза и путей морфогенеза *in vitro* в каллусах культурных злаков под воздействием ауксинов.

Хорошо известно, что ауксины (гетероауксин, ИУК, НУК, 2,4-Д) – группа обладающих аттрагирующим эффектом фитогормонов стимулирующего действия, главным образом активирующих деление, растяжение и дифференциацию клеток, а также формирование сосудов и боковых корней [Медведев, Шарова, 2011], т.е. принимающих участие в основных морфогенетических процессах растений. Неудивительно поэтому их активное применение в экспериментах по исследованию различных аспектов морфогенеза *in vitro*, в том числе в каллусных культурах.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что индукция формирования в условиях *in vitro* каллусов различных растений, не только злаков, в значительной степени определяется физиологическим статусом экспланта в момент инокуляции на питательную среду, а также условиями культивирования, важнейшее среди которых – оптимальная концентрация в питательной среде фитогормонов, главным образом ауксинов

[Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011; Segui-Simarro, 2010; Ikeuchi et al., 2013; Gorbatyuk et al., 2015; Doubled haploidy..., 2016; Hisano et al., 2016; Seldimirova et al., 2016b,c; Основы биотехнологии..., 2017 и др.].

Подчеркнем, что оптимальная концентрация ауксинов расценивается как важнейший фактор, определяющий индукцию иных, помимо каллусогенеза, путей морфогенеза *in vitro* в эксплантах злаков – эмбриоидогенеза и полиэмбриоидогенеза [Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011, 2013; Мирошниченко и др., 2012; Сельдимирова, Круглова, 2015; Zur et al., 2015, 2016; Seldimirova et al., 2016b,c; Titova et al., 2016]. Важная роль ауксинов в процессах каллусогенеза *in vitro* обусловлена большим значением этой группы фитогормонов в различных аспектах морфогенеза [Mockaitis, Estelle, 2008; Медведев, Шарова, 2011; Phytohormones..., 2012; Розов и др., 2013; Vykova et al., 2016 и др.] и эмбриогенеза [Hess et al., 2002; Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017] растений.

Накоплен достаточный экспериментальный материал по изучению влияния ауксинов на индукцию формирования каллусов в культуре *in vitro* таких эксплантов злаков, как пыльники, зародыши, апикальная меристема побега, семена [Круглова, Катасонова, 2009; Cha-um et al., 2009; Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011; Lee, Huang, 2013; Slesak et al., 2013; Bevitori et al., 2014; Delporte et al., 2014; Gorbatyuk et al., 2015; Doubled haploidy..., 2016; Hisano et al., 2016; Mohd Din et al., 2016 и др.]. Установлено, что в ходе культивирования *in vitro* на индукционной среде происходит дедифференциация исходных специализированных или меристематических клеток экспланта с переходом их в состояние каллусных. Этот процесс связан со структурной перестройкой исходных клеток и индукцией в них способности к последовательным делениям с итоговой пролиферацией клеток. В целом, вопрос репрограммирования клеток каллуса решается в контексте общей проблемы изменчивости генома в процессе дедифференциации и каллусообразования *in vitro* [Kunakh, 1999; Дубровная, Бавол, 2011; Sugiyama, 2015].

После переноса на регенерационную среду в каллусах злаков выявлены различные пути морфогенеза *in vitro*: эмбриоидогенез (формирование эмбриоида – зародышеподобной структуры), органогенез по типам геммогенеза (формирование почек), ризогенеза (формирование корней), гемморизогенеза (формирование и почек, и корней), а также гистогенез (формирование различных тканей). Установлено, что в случае органогенеза *in vitro* к формированию растений приводит

гемморизогенез, в ряде случаев – геммогенез после фитогормонального индуцирования ризогенеза в том же самом каллусе, тогда как ризогенез представляет собой «тупик» морфогенеза [Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011, 2013; Батыгина и др., 2010; Segui-Simarro, 2010; Slesak et al., 2013; Основы биотехнологии..., 2017 и др.].

Индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* в каллусах злаков, как и в случае индукции формирования каллуса, также во многом детерминирована физиологическим статусом экспланта и условиями культивирования, главным образом, оптимальной концентрацией фитогормонов [Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011, 2013 и др.]. Однако морфогенетические потенции клеток каллуса могут меняться в зависимости от характера связей между группами клеток в каллусе, что, в свою очередь, обусловлено формой и размером каллуса и иными факторами.

Предприняты попытки найти место фитогормонов в прохождении путей морфогенеза в каллусах *in vitro*. Еще в 1957 г. Ф. Скуг и К. Миллер [Skoog, Miller, 1957], изучив влияние экзогенных фитогормонов на морфогенез в каллусе, полученном из сердцевинной паренхимы стебля табака, предложили концепцию, согласно которой морфогенетические реакции тканей и органов регулируются количественным соотношением экзогенных ауксинов и цитокининов. Данная концепция доминирует в области культивирования эксплантов *in vitro* до настоящего времени.

Важен вопрос о содержании и распределении в клетках каллусов в процессе органогенеза *in vitro* эндогенных фитогормонов. Один из способов оценки содержания гормонов в клетках основан на использовании искусственных конструкций, в которых репортерный ген ставится под контроль промотора, чувствительного к тому или иному гормону. У растений, трансформированных с помощью такой конструкции, искомые гормоны активируют экспрессию трансгенов, кодирующих или белки ферменты, или флюоресцирующие белки, присутствие которых в клетках можно обнаружить визуально. Выявлено, например, распределение и взаимодействие эндогенных ауксинов и цитокининов в клетках каллусов арабидопсиса в процессе органогенеза *in vitro* [Cheng et al. 2013]. Однако использование этого подхода для каллусов злаков ограничено сложностями трансформации однодольных растений.

Использование иммуногистохимического метода [Vysotskaya et al., 2007; Kudoyarova et al., 2014] позволило внести определенную ясность в сложный вопрос изменения в распределении ауксинов и цитокининов при индукции

формирования каллуса и процесса гемморизогенеза *in vitro* у злаков на примере пшеницы [Seldimirova et al., 2016a]. Обнаружено значительное иммуоокрашивание обоих гормонов в пролиферирующем каллусе и особенно в тех его зонах, клетки которых участвуют в формировании органов; интенсивное иммуоокрашивание обоих гормонов было также обнаружено в местах каллуса, где иницируются апексы побега и корня. В ходе дальнейшего развития апексы побегов значительно окрашивались на цитокинины, тогда как иммуоокрашивание на ауксины было более интенсивным в местах инициации примордиев листьев. В развивающихся корнях интенсивность иммуоокрашивания обоих гормонов достигала максимума в апексе корня и постепенно снижалась по мере удаления от него. Клетки развивающихся прокамбиальных тяжей также интенсивно окрашивались на цитокинины и ауксины. Как полагают авторы, полученные данные свидетельствуют о значительном сходстве распределения изученных гормонов в органах *in vitro* и *in vivo*.

Однако ставшая классической концепция Скуга-Миллера рядом авторов оценивается скорее как эмпирическая закономерность. Л.Р. Сайб и М.К. Карабаев [Сайб, Карабаев, 1991], исходя из общей теории онтогенеза, предложили свою модель фитогормональной регуляции морфогенеза растений. Формирование органов при этом рассматривается как пространственная организация дифференциации. Этот процесс, по мнению исследователей, можно объяснить с помощью теории морфогенетических полей Чайлда, согласно которой вдоль развивающейся системы должен существовать градиент некоторых свойств (метаболический, морфогенетического потенциала и т.п.). При этом апикальный или дистальный район системы, образующийся автономно или являющийся доминантным, вырабатывает поле определенной протяженности, которое контролирует морфогенетические процессы в системе. Повидимому, такая концепция имеет право на существование, однако требует экспериментальных подтверждений.

Кроме того, концепция Скуга-Миллера, разработанная на примере табака, не всегда «работает» на других видах растений. Выявлено, например, что морфогенез *in vitro* в каллусах ряда злаков зависит от концентрации иных, помимо ауксинов и цитокининов, экзогенных фитогормонов: этилена [Kiviharju et al., 2005], гибберелловой кислоты [Colebrook et al., 2014], абсцизовой кислоты [Zur et al., 2015].

На наш взгляд, при анализе путей морфогенеза *in vitro* клеток каллуса применима концепция эпигенетической изменчивости растений [Медведев, Шарова, 2010; Ashapkin et al., 2016]. Вполне вероятно, что в рассматриваемых случаях происходит реализация эпигеномных подпрограмм развития компетентных к морфогенезу *in vitro* клеток каллуса. В случаях с каллусами, полученными в культуре пыльников, ситуация усложняется тем, что каллусные клетки, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием эмбрионидов, органов или тканей, берут начало от одной клетки – микроспоры, реализующей в данном случае свою эпигеномную спорофитную подпрограмму развития. Более того, в зависимости от условий культивирования (главным образом, от ауксинового состава индукционной среды) микроспора может развиваться по спорофитной подпрограмме с образованием растения-регенеранта не только через этап формирования каллуса, но и альтернативно – через этап формирования эмбриоида.

Абсолютное большинство исследователей для определения оптимального гормонального состава питательной среды как для индукции формирования каллуса, так и для индукции конкретного пути морфогенеза *in vitro* в нем используют эмпирический перебор широкого диапазона различных комбинаций и концентраций фитогормонов. В результате подбор оптимальной концентрации фитогормонов оказывается достаточно трудоемким и дорогостоящим. Необходим поиск надежного подхода к прогнозированию этого параметра на основе эндогенных физиологических показателей эксплантов. Учитывая большое значение эндогенных фитогормонов в определении тотипотентности [Phytohormones., 2012], можно предположить, что морфогенетическая компетентность эксплантов и каллусов обусловлена содержанием в них эндогенных фитогормонов.

В литературе вопрос о соотношении эндогенных фитогормонов (в составе экспланта) и экзогенных фитогормонов (в составе питательной среды) как в индукции формирования каллусов, так и в регуляции путей морфогенеза *in vitro* в каллусах злаков поставлен достаточно давно [Gorbunova et al., 2001; Jimenez, Bangerth, 2001], однако исследований на эту тему выполнено сравнительно немного (например [Huang et al., 2012; Hisano et al., 2016]). Основная причина этого – сложность и трудоемкость традиционных методов определения содержания эндогенных фитогормонов в эксплантах. Избежать этих трудностей позволяет метод твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) растительных

образцов [Иммуноанализ..., 2000] для предварительного анализа эксплантов.

Используя метод ИФА, а также методологический подход, предложенный В.Ю. Горбуновой и др. [Gorbunova et al., 2001], нами на пшенице показана возможность индукции формирования пыльниковых каллусов и регуляции путей морфогенеза *in vitro* в них путем выявления для каждого сорта адекватного баланса между содержанием эндогенной ИУК в пыльниках донорных растений при инокуляции на питательную среду и концентрацией экзогенного ауксина в составе питательной среды. Так, методом ИФА было выявлено, что ряд изученных сортов пшеницы, отнесенных к группе высокоауксиновых, содержали в пыльниках сравнительно высокое количество эндогенного ауксина ИУК: сорт Скала – 324,8±38,1; сорт Башкирская 26 – 276,9±3,7; сорт Омская 35 – 429,5±6,3 нг/г сухого веса. Индукция формирования каллусов наблюдалась у этих сортов при использовании питательной среды, содержащей синтетический ауксин 2,4-Д в сравнительно низких концентрациях – 1,0 мг/л у сорта Омская 35 и 1,0-1,5 мг/л у сортов Скала и Башкирская 26. Другие изученные сорта, отнесенные к группе низкоауксиновых, характеризовались сравнительно низким эндогенным содержанием ауксина ИУК в пыльниках: сорт Салават Юлаев – 71,4±6,5; сорт Жница – 59,4±10,3; сорт Дуэт – 45,8±2,3 нг/г сухого веса. К индукции формирования каллуса у этих сортов приводило использование питательной среды со сравнительно высокими концентрациями 2,4-Д – 1,5 мг/л у сортов Жница и Дуэт и 1,5-2,0 мг/л у сорта Салават Юлаев [Seldimirova et al., 2016c].

На примере этих же сортов пшеницы нами показана возможность регуляции путей морфогенеза *in vitro* в пыльниковых каллусах при культивировании на питательной среде с различной концентрацией экзогенного ауксина ИУК. Приведем в качестве примера индуцирование таких важных в биотехнологическом отношении путей морфогенеза в каллусах, как эмбриоидогенез и гемморизогенез. Выявлено, что эмбриоидогенез в каллусах высокоауксиновых сортов пшеницы индуцируется при концентрации экзогенной ИУК 0.1 мг/л, а в каллусах низкоауксиновых сортов – 0.5 мг/л. К гемморизогенезу в каллусах высокоауксиновых сортов приводило использование концентрации экзогенной ИУК 0.5 мг/л, а в каллусах низкоауксиновых сортов – 1.5 мг/л [Сельдиминова, Круглова, 2015].

Анализ приведенных экспериментальных данных свидетельствуют о том, что баланс между содержанием эндогенного ауксина ИУК в экспланте и концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в

питательной среде для индукции формирования каллуса и ИУК для индукции путей морфогенеза *in vitro* в каллусах состоит в обратной зависимости между этими показателями. На наш взгляд, определяющую роль в таком балансе играет генотип донорного растения, детерминирующий признак «уровень эндогенных гормонов в экспланте».

Взаимодействие эндогенных и экзогенных фитогормонов и в частности ауксинов в культуре *in vitro* до настоящего времени остается на уровне констатации феномена. Это можно объяснить множественным действием на эксплант одного и того же гормона (например [Colebrook et al., 2014; Zur et al., 2015; Hisano et al., 2016]), поэтому очень трудно связать воедино механизм действия гормона и клеточный ответ на него. Тем не менее, предложенный подход предварительного выявления для каждого сорта пшеницы адекватного баланса между содержанием эндогенных ауксинов в эксплантах при инокуляции на питательную среду и концентрацией экзогенных ауксинов в составе питательной среды позволяет оптимизировать процесс биотехнологии тиражирования регенерантов на основе индукции нужного для этого пути морфогенеза *in vitro* в каллусах (как правило, это гемморизогенез [Seldimirova et al., 2016a]). В целом, широкий спектр физиологической активности ауксинов и достигнутые с их помощью успехи в реализации морфогенетического потенциала каллусных клеток позволяют считать именно баланс эндогенных и экзогенных ауксинов одним из основных факторов управления морфогенезом *in vitro*.

Таким образом, для злаков хорошо установлено участие ауксинов как в формировании каллусов, так и в регуляции путей морфогенеза в каллусах *in vitro*. Методологический подход, состоящий в выявлении и использовании оптимального баланса эндогенных (в составе экспланта) и экзогенных (в составе питательной среды) ауксинов, позволяет приблизиться к процессу управления путями морфогенеза *in vitro* в модельных каллусных системах.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ №17-04-01477.

Литература

1. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с. [Batyigina T.B. Hlebnoe zerno. L.: Nauka, 1987. 103 s.]
2. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 35–39.

- [Batygina T.B. Vosproizvedenie, razmnozhenie i vozobnovlenie rasteniy // Embriologiya cvetkovuh rasteniy. Terminologiya i koncepcii. T. 3: Sistemy reprodukcii / Red. T.B. Batygina. SPb.: Mir i Semya, 2000. S. 35–39]
3. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с. [Batygina T.B. Biologiya razvitiya rasteniy. Simfoniya zhizni. SPb.: DEAN, 2014. 764 s.]
 4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбриодогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. 1978. Т. 63. С. 87–111. [Batygina T.B., Vasiljeva V.E., Mametjeva T.B. Problemy morfogenesa *in vivo* i *in vitro* (embrioidogenes u pokrytosemennyh) // Botan. zhurn. 1978. T. 63. S. 87–111]
 5. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с. [Batygina T.B., Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. Ot mikrospory – k sorty. M.: Nauka, 2010. 174 s.]
 6. Батыгина Т.Б., Осадчий Я.В. Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур // Успехи совр. биол. 2015. Т. 135. С. 337–345. [Batygina T.B., Osadchiy Ya.V. Vyyavlenie gomologii kletochnyh elementov reproductivnyh i formoobrazovatelnyh struktur // Uspehi sovr. biol. 2015. T. 135. S. 337–345.]
 7. Берталанфи Л. Общая теория систем – критический обзор // Исследования по общей теории систем. М.: Прогресс, 1969. С. 23–82. [Bertalanfi L. Obcsnaya teoriya sistem – kriticheskij obzor // Issledovaniya po obcshey teorii sistem. M.: Progress, 1969. S. 23–82]
 8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с. [Butenko R.G. Kultura izolorovannyh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy. M.: Nauka, 1964. 272 s.]
 9. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. Пушино: Пушинский НЦ, 1994. С. 7–26. [Butenko R.G. Kletochnye i molekulyarnye aspekty morfogeneza rasteniy *in vitro* // I Chailahjanovskie chteniya. Puchshino: Puchshinskiy NC, 1994. S. 7–26.]
 10. Гилберт С. Биология развития. Т. 3. М.: Мир, 1995. 352 с. [Gilbert S. Biologiya razvitiya. T. 3. M.: Mir, 1995. 352 s.]
 11. Дубровная О.В., Бавол А.В. Изменчивость генома пшеницы в культуре *in vitro* // Цитология и генетика. 2011. Т. 45. С. 76–84. DOI: 10.3103/S0095452711050033 [Dubrovnaaya O.V., Bavol A.V. Izmenchivost genoma pshenicy v culture *in vitro* // Citologia i genetika. 2011. T. 45. S. 76–84. DOI: 10.3103/S0095452711050033]
 12. Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии / Под ред. Г.Р. Кудояровой. Уфа: АН РБ, 2000. 223 с. [Immunoanalisis regulyatorov rosta v reshenii problem fiziologii rasteniy, rastenievodstva i biotehnologii / pod red. G.R. Kudoyarovoy]
 13. Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с. [Ivanov V.B. Kletochnye mehanizmy rosta rasteniy. M.: Nauka, 2011. 104 s.]
 14. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии у пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с. [Kruglova N.N., Batygina T.B., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. Embriologicheskie osnovy androklinii u pshenicy. M.: Nauka, 2005. 99 s.]
 15. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. биохим. культ. раст. 2009. Т. 41. С. 124–131. [Kruglova N.N., Katasonova A.A. Nezrelyi zarodysh pshenicy kak morfogeneticheski kompetentnyi eksplant // Fiziol. bihim. kult. rast. 2009. T. 41. S. 124–131]
 16. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинных каллусах злаков: цитогистологические особенности // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130. С. 247–257. [Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Morfogenes v androklinnnyh kallusah zlakov: citogistologicheskie osobennosti // Uspehi sovr. biol. 2010. T. 130. S. 247–257]
 17. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с. [Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Regeneraciya pshenicy *in vitro* i *ex vitro*: cito-gistologicheskie aspekty. Ufa: Gilem, 2011. 124 s.]
 18. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинного каллуса пшеницы // Физиол. раст. и генетика. 2013. Т. 45. С. 382–389. [Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Puti morfogeneza *in vitro* kletok androklinnogo kallusa pshenicy // Fiziol. rast. i genetika. 2013. T. 45. S. 382–389]
 19. Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия биол. 2010. № 3. С. 109–129. [Medvedev S.S., Sharova E.I. Geneticheskaya i epigeneticheskaya regulaciya razvitiya rastitelnyh organizmov (obzor) // Zhurnal Sib. feder. un-ta. Seriya biol. 2010. № 3. S. 109–129]
 20. Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. В 2-х т. Т. 1. Начала биологии

- развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2011. 253 с. [Medvedev S.S., Sharova E.I. *Biologiya razvitiya rasteniy*. V 2-h t. T. 1. Nachala biologii razvitiya rasteniy. Fitogormony. SPb.: Izd-vo S.-Peterb. un-ta, 2011. 253 s.]
21. Мирошниченко Д.Н., Филиппов М.В., Долгов С.В. Оптимизация условий для эффективного соматического эмбриогенеза и регенерации растений *in vitro* яровых сортов мягкой пшеницы // Доклады РАСХН. 2012. № 6. С. 22-26. [Miroshnichenko D.N., Filippov M.V., Dolgov S.V. Optimizaciya usloviy dlya effektivnogo somaticheskogo embriogenesa i regeneracii rasteniy *in vitro* yarovykh sortov myagkoi pshenicy // Doklady RASHN. 2012. № 6. S. 22-26]
22. Основы биотехнологии растений / Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с. [Osnovy biotehnologii rasteniy / B.R. Kuluev, N.N. Kruglova, A.A. Zaripova, R.G. Farhutdinov. Ufa: RIC BashGU, 2017. 244 s.]
23. Розов С.М., Загорская А.А., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Ауксин: биосинтез, метаболизм, транспорт // Успехи соврем. биол. 2013. Т. 133. С. 50-62. [Rozov S.M., Zagorskaya A.A., Deineko E.V., Shumnyi V.K. Auksin: biosintez, metabolizm, transport // Uspehi sovrem. biol. 2013. T. 133. S. 50-62]
24. Сайб Л.Р., Карабаев М.К. Фитогормональная регуляция регенерации растений: качественная модель // Изв. АН КазССР. Серия биол. 1991. № 3. С. 15-22. [Saib L.R., Karabaev M.K. Fitogormonalnaya regulaciya regeneracii rasteniy: kachestvennaya model // Izv. AN KazSSR. Seriya biol. 1991. № 3. S. 15-22]
25. Сельдиминова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. 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 razvivayuschihsy zarodushah pshenicy *in vivo* // Izv.Ufimskogo NC RAN. 2017. № 3(1). S. 114-118]
26. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Андроклиный эмбриогенез *in vitro* у злаков // Успехи совр. биол. 2014. Т. 134. С. 476-487. [Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Androklinni embrioidogenes *in vitro* u zlakov // Uspehi sovrem. biol. 2014. T. 134. S. 476-487]
27. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2015. № 1. С. 33-39. [Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Balans endogennyh i ekzogennyh gormonov i puti morfogenesa v androklinnuh kallusah pshenicy *in vitro* // Izv.Ufimskogo NC RAN. 2015. № 1. S. 33-39]
28. Синнот Э. Морфогенез растений. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. 603 с. [Sinnot E. Morfogenes rasteniy. M.: Izd-vo inostr. lit-ry, 1963. 603 s.]
29. Урманцев Ю.А. Системный подход к проблеме устойчивости растений // Физиол. раст. 1979. Т. 26. С. 762-777. [Urmancev Yu.A. Sistemnyi podhod k problem ustoichivosti rasteniy // Fiziol. rast. 1979. T. 26. S. 762-777]
30. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Epigenetic variability in plants: heritability, adaptability, evolutionary significance // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 181-192. DOI: 10.1134/S1021443716020059
31. Batygina T.B. Embryogenesis and morphogenesis of zygotic and somatic embryos // Russ. J. Plant Physiol. 1999. V 46. P. 774-788.
32. 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
33. Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. P. 107-120.
34. Bevitori R., Popielarska-Konieczna M., dos Santos E.M. et al. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 545-554. DOI: 10.1007/s00709-013-0553-4
35. 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
36. Cha-um S., Srianan B., Pichakum A. et al. An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp. indica) // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2009. V. 45. P. 171-179. DOI: 10.1007/s11627-009-9203-0
37. 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
38. Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. P. 67-75. DOI: 10.1242/jeb.089938
39. Delporte F., Pretova A., du Jardin P. et al. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1455-1470. DOI 10.1007/s00709-014-0647-7

40. Doubled haploidy in model and recalcitrant species / ed. J.M. Segui-Simarro. Lausanne: Frontiers Media, 2016. 119 p. DOI: 10.3389/978-2-88919-783-5
41. Elhiti M., Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview // Plant embryo culture: Methods and protocols / Eds Thorpe T.A., Yeung E.C. New York: Humana Press, 2011. P. 229–255. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_17
42. Gorbatyuk I.R., Bavol A.V., Holubenko A.V., Morgun B.V. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka // Biotechnologia Acta. 2015. V. 8. P. 56–62. DOI: 10.15407/biotech8.01.056
43. Gorbunova V.Yu., Kruglova N.N., Abramov S.N. The induction of androgenesis *in vitro* in spring soft wheat. Balance of exogenous and endogenous phytohormones // Biol. Bull. 2001. V. 28. P. 25–30. DOI: 10.1023/A:1026602603527
44. Gutierrez R.A., Shasha D.E., Coruzzi G.M. Systems biology for the virtual plant // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 550–554. DOI: 10.1104/pp.104.900150
45. 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
46. Hisano H., Matsuura T., Mori I.C. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 99. P. 66–72. DOI: 10.1038/s41598-017-03907-2
47. Huang W.-L., Lee Ch.-H., Chen Y.-R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2012. V. 108. P. 257–263. DOI: 10.1007/s11240-011-0038-0
48. Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // Curr. Opinion in Plant Biol. 2015. V. 28. P. 60–67. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.09.004
49. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159–3173. DOI: 10.1105/tpc.113.116053
50. Jimenez V.M., Bangerth F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001. V. 67. P. 37–46. DOI: 10.1023/A:1011671310451
51. Kiviharju E., Moisander S., Laurila J. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2005. V. 81. P. 1–9. DOI: 10.1007/s11240-004-1560-0
52. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Y., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Y. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 2287–2294. DOI: 10.1093/jxb/eru113
53. Kumar V. Systems biology approaches towards the prediction of prospective novel plant system-derived products or services // Biol. Syst. Open Access. 2013. V. 2. P. 119. DOI:10.4172/2329-6577.1000119
54. Kunakh V.A. Plant genome variation in the course of *in vitro* dedifferentiation and callus formation // Russ. J. Plant Physiol. 1999. V. 46. P. 808–817.
55. Lee S.-T., Huang W.-L. Cytokinin, auxin, and abscisic acid affects sucrose metabolism conduce to *de novo* shoot organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) callus // Botan. Studies. 2013. V. 54. DOI: doi.org/10.1186/1999-3110-54-5
56. Mockaitis K., Estelle M. Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2008. V. 24. P. 55–80. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123214
57. Mohd Din A.R.J., Ahmad F.I., Wagiran A. et al. Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas) // Saudi J. Biol. Sci. 2016. V. 23. Suppl. P. 69–77. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.10.022
58. Nosov A.V. Plant cell culture: unique system, model, and tool // Russ. J. Plant Physiol. 1999. V. 46. P. 731–738.
59. Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants / Eds Khan N.A., Nazar R., Iqbal N., Anjum N.A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012. 306 p. DOI: 10.1017/S0014479712000555
60. Segui-Simarro J.M. Androgenesis Revisited // Bot. Rev. 2010. V. 76. P. 377–404. DOI: 10.1098/rstb.2015.0534
61. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin // Biol. Bull. 2013. V. 40. P. 447–454. DOI: 10.1134/S1062359013050154
62. 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. Develop. Biol. 2017. V. 48. P. 185–197. DOI: 10.1134/S1062360417030109
63. 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.* 2016a. V. 52. P. 251-264. DOI: 10.1007/S11627-016-9767-4
64. Seldimirova O.A., Titova G.E., Kruglova N.N. A complex morpho-histological approach to the *in vitro* study of morphogenic structures in a wheat anther culture // *Biol. Bull.* 2016b. V. 43. P. 121–126. DOI: 10.1134/S1062359016020084
65. Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Galin I.R., Kruglova N.N. Phytohormonal regulation of *in vitro* formation of wheat androgenic structures // Научный результат. Серия физиология. 2016с. Т. 2. С. 3-8. DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-3-8
66. Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // *Sympos. Soc. Exp. Biol.* 1957. V. 11. P. 118.
67. Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // *Cent. Eur. J. Biol.* 2013. V. 8. P. 30–37. DOI: 10.2478/s11535-012-0113-5
68. Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation // *J. Plant Research.* 2015. V. 128. P. 349–359. DOI: 10.1007/s10265-015-0706-y
69. Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Galin I.R., Batygina T.B. Phenomenon of “Siamese embryos” in cereals *in vivo* and *in vitro*: Cleavage polyembryony and fasciations // *Russ. J. Develop. Biol.* 2016. V. 47. P. 122–137. DOI: 10.1134/S1062360416030061
70. Vysotskaya L.B., Veselov S.Y., Veselov D.S., Filippenko V.N., Ivanov E.A., Ivanov I.I., Kudoyarova G.R. Immunohistological localization and quantification of IAA in studies of root growth regulation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. P. 827–832. DOI: 10.1134/S1021443707060167
71. Zhuravlev Yu.N., Omelko A.M. Plant morphogenesis *in vitro* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2008. V. 55. P. 579–596. DOI: 10.1134/S1021443708050014
72. Zur I., Dubas E., Krzewska M. et al. Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticale (*xTriticosecale* Wittm.) anther cultures // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 47–62. DOI: 10.3389/fpls.2015.00424
73. Zur I., Dubas E., Krzewska M. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis // Doubled haploidy in model and recalcitrant species. *Front. Plant Sci.*, 2016. P. 110-109. DOI: 10.3389/978-2-88919-783-5