

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ У ЯЧМЕНЯ СОРТА СТЕПТОЕ И ЕГО АБК-ДЕФИЦИТНОГО МУТАНТА AZ34

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Веселов Д.С., Яновская А.А.

Уфимский Институт биологии РАН, Уфа, Россия, email: o_seldimirova@mail.ru

Резюме

Изучали влияние состава индукционной питательной среды на эффективность каллусогенеза и последующую способность полученных каллусов к регенерации у ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34. Отмечено значительное влияние ряда веществ на ростовые показатели каллусов и их способность к регенерации. Установлено, что для ячменя сорта Steptoe наиболее эффективно введение в базовую среду Мурасиге-Скуга 0.2 мг/л 24-эпибрассинолида в качестве регулятора роста, стимулирующего синтез эндогенных цитокининов, и повышение содержания сульфата меди до 12.5 мг/л. Для AZ34 требуется дополнительное введение в состав питательной среды АБК в концентрации 0.5 мг/л. Обсуждается возможность использования каллусов гормональных мутантов в качестве моделей для изучения взаимодействия гормонов в ходе развития растений.

Ключевые слова: ячмень, каллус, способность к регенерации, АБК, 24-эпибрассинолид, сульфат меди

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR INDUCTION OF CALLUS FORMATION IN BARLEY CV. STEPTOE AND ITS ABA-DEFICIENT MUTANT AZ34

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

Ufa Institute of Biology, RAS, Ufa, Russia, email: o_seldimirova@mail.ru

Resume

The effect of the induction medium composition on the efficiency of callusogenesis and the subsequent ability of the resulting calli for regeneration in barley cv. Steptoe and its ABA-deficient mutant AZ34 was studied. A strong influence of a number of substances on the growth rates of calli and their ability to regeneration was noted. It has been established that for barley cv. Steptoe the addition of 0.2 mg/l of 24-epibrassinolide as a growth regulator stimulating synthesis of endogenous cytokinins in the Murashige-Skoog base medium and an increase in the copper sulfate content to 12.5 mg/l were more effective. For AZ34 additional supplementation of 0.5 mg/l ABA in induction medium is required. The possibility of using the hormonal mutant calli as models for studying the hormones interaction of in plant development is discussed.

Keywords: barley, callus, regeneration ability, ABA, 24-epibrassinolide, copper sulphate

Введение

Морфогенез растений как совокупность протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тканей и органов [Бутенко, 1999] остается одной из сложнейших проблем биологии развития растений, требующих своего разрешения. Фундаментальность вопроса о механизмах регуляции клеточной дифференциации и клеточных/тканевых взаимодействий в составе целостного организма обуславливает значительный интерес к этой научной проблеме.

Ключевой аспект регуляции морфогенеза растений – гормональный. Широкие возможности для изучения роли гормонов в регуляции морфогенетических процессов представляют гормональные мутанты [Kende, 2001; Gazzarini, Mccourt, 2004]. Следует отметить, что абсолютное большинство исследований посвящено изучению

роли цитокининов [Romanov, 2009; Gupta, Rashotte, 2012] и ауксинов [Bohn-Courseau, 2010; Su et al., 2011; Robert et al., 2015]. В то же время сведения, касающиеся роли АБК в регуляции морфогенетических процессов, весьма ограничены.

Интенсивные исследования морфогенеза растений затруднены интегральным характером морфогенетических процессов, зависимостью их от многих внутренних и внешних факторов и их взаимодействий [Бутенко, 1999]. Удобной моделью для изучения различных аспектов морфогенеза растений может служить каллус, полученный из разнообразных растительных эксплантов и развивающийся в строго контролируемых условиях *in vitro* [Круглова, Сельдимирова, 2010; Круглова, 2011]. Один из основных факторов, определяющий успешное применение такой модели, – эффективность каллусогенеза и последующей регенерации растений.

Для экспериментов *in vitro*, как правило, используют несколько модельных видов растений, к числу которых относится и ячмень [Buck-Sorlin et al., 2008; Carciofi et al., 2012]. Хорошо установлено, что эффективность каллусогенеза *in vitro* и последующей регенерации растений у ячменя, как и других растений, определяется главным образом генотипом и составом питательной среды [Chernobrovkina et al., 2004; Овчинникова и др., 2006; Tanasienko et al., 2009].

Для индукции каллусогенеза у ячменя используют различные питательные среды, но чаще всего – среду по прописи Мурасиге-Скуга [1962], дополненную 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) в качестве ауксина и 6-безиламинопурином (6-БАП) в качестве цитокининов [Chernobrovkina et al., 2004; Овчинникова и др., 2006; Tanasienko et al., 2009; Shirokikh et al., 2014]. Имеются сведения о том, что стимулирующее влияние на частоту каллусообразования и прирост биомассы каллусов ячменя оказывает повышение содержания в среде сульфата меди [Chernobrovkina et al., 2004; Tanasienko et al., 2009]. Показано, что стимулирующее влияние на каллусообразование оказывает и использование 24-эпибрассинолида (24-ЭБ) в качестве стимулятора роста, индуцирующего синтез эндогенных цитокининов [Seldimirova et al., 2017]. В целом же абсолютное большинство исследователей сходятся во мнении, что разные генотипы предъявляют неодинаковые требования к виду и концентрации в среде элементов питания, поэтому в каждом случае необходимо экспериментальным путем определять оптимальный состав среды для каждого генотипа.

В связи с этим цель работы заключалась в оптимизации состава питательной среды, обеспечивающей эффективный каллусогенез и способность полученных каллусов к дальнейшей регенерации растений у ячменя.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили ячмень сорта Steptoe и его АБК-дефицитный мутант AZ34. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии РАН (Уфимский район). В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши на 13-15 сутки после массового цветения. Базовой питательной средой для индукции каллусогенеза служила среда, содержащая макро- и микросоли (за исключением сульфата меди) и витамины по прописи Мурасиге-Скуга (МС) [1962],

содержащая в качестве ауксина 2,4-Д в концентрации 2.0 мг/л и дополненная другими регуляторами роста и сульфатом меди ($\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) в различных концентрациях. В качестве цитокининов использовали 6-БАП или добавляли 24-ЭБ, способный индуцировать синтез эндогенных цитокининов. Для сорта Steptoe были использованы следующие варианты: (1) 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (2) 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (3) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (4) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$. Для AZ34 были дополнительно использованы два варианта питательной среды, содержащие абсцизовую кислоту (АБК): (5) 0.5 мг/л 6-БАП, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК и (6) 0.2 мг/л 24-ЭБ, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК. Для оценки влияния вариантов состава индукционной питательной среды на способность каллусов к регенерации полученные каллусы переносили на регенерационную среду (базовую питательную среду МС, содержащую также кинетин и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0.2 мг/л). Влияние различных вариантов питательных сред на каллусогенез оценивали по частоте каллусообразования и приросту сухой массы каллусов, как описано нами ранее [Seldimirova et al., 2017]. Способность каллусов к регенерации оценивали визуально через 7 суток культивирования *in vitro* на регенерационной среде. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения и ошибки средних.

Результаты и обсуждение

В ходе выполнения экспериментов было установлено, что зародыши как ячменя сорта Steptoe, так и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 характеризуются высокой отзывчивостью к условиям культуры *in vitro* на всех протестированных вариантах питательных сред (табл.). Хорошо известно, что отзывчивость злаков и особенно ячменя зависит от генотипа [Chernobrovkina et al., 2004; Tanasienko et al., 2009]. Полученные данные позволяют рассматривать изучаемый генотип как перспективный для биотехнологических исследований. Результаты по оценке влияния состава питательной среды на прирост сухой массы каллусов приведены на рис. 1.

Таблица

Влияние состава питательной среды на частоту каллусообразования

Генотип	Варианты питательной среды для индукции каллусогенеза			
	1*	2*	3*	4*
Steptoe	86.3±4.8	85.6±5.4	90.9±6.8	92.7±3.6
AZ34	83.3±2.9	86.8±6.3	87.2±4.6	93.4±3.1

*(1) 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (2) 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (3) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, (4) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Из приведенных на рис. 1а данных видно, что у ячменя сорта Steptoe максимальный прирост сухой массы каллусов наблюдается на среде, содержащей 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, а минимальный – на среде, содержащей 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$. Увеличение прироста массы каллусов при добавлении brassinosteroids в культуральную среду было отмечено и в других работах [Hu et al., 2000; Lu et al., 2003; Cheon et al., 2010; Seldimirova et al., 2017]. Такой эффект может быть следствием сочетания у 24-ЭБ ярко выраженного рост-стимулирующего и антистрессового действий [Phytohormones ..., 2012; Vrijet et al., 2012], что способствует снижению уровня повреждающего влияния неблагоприятных факторов, в качестве одного из которых можно рассматривать и условия культивирования *in vitro*.

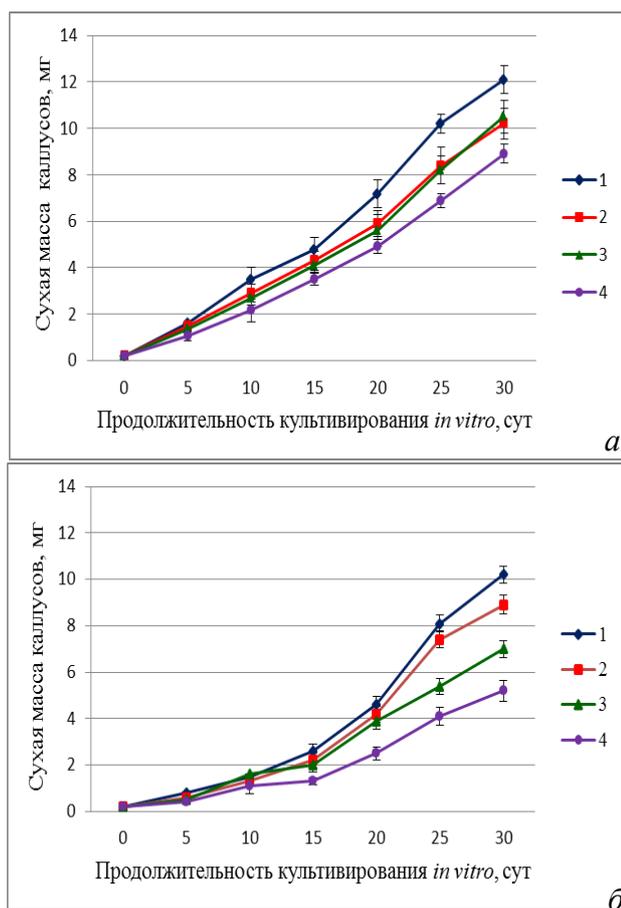


Рис. 1. Прирост сухой массы каллусов ячменя сорта Steptoe (а) и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 (б), культивируемых *in vitro* на среде МС, содержащей 2.0 мг/л 2,4-Д и дополненной другими регуляторами роста и сульфатом меди ($\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) в различных вариантах: (1) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (2) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (3) 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (4) 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Интересно, что на среде, содержащей 6-БАП и повышенную концентрацию сульфата меди, и на среде, содержащей 24-ЭБ и пониженную концентрацию сульфата меди, отмечены примерно

одинаковые значения прироста массы каллусов, что, возможно, свидетельствует о стимулирующем эффекте повышенного содержания сульфата меди на деление клеток. Также можно предположить, что сочетание этих двух факторов в питательной среде оказывает синергетическое действие на активность клеточных делений. По-видимому, этим и объясняются самые высокие показатели прироста массы каллусов на среде с 24-ЭБ и повышенным содержанием сульфата меди.

У АБК-дефицитного мутанта AZ34 повышение содержания в питательной среде сульфата меди также усиливало прирост сухой массы каллусов как в варианте с 24-ЭБ, так и в варианте с 6-БАП (рис. 1б), что еще раз подтверждает положительное влияние повышенных концентраций меди в питательной среде на ростовые показатели каллусов. В отличие от ячменя сорта Steptoe, у AZ34 на вариантах среды, содержащих 24-ЭБ, прирост сухой массы был выше, чем на вариантах среды, содержащих 6-БАП (рис. 1б).

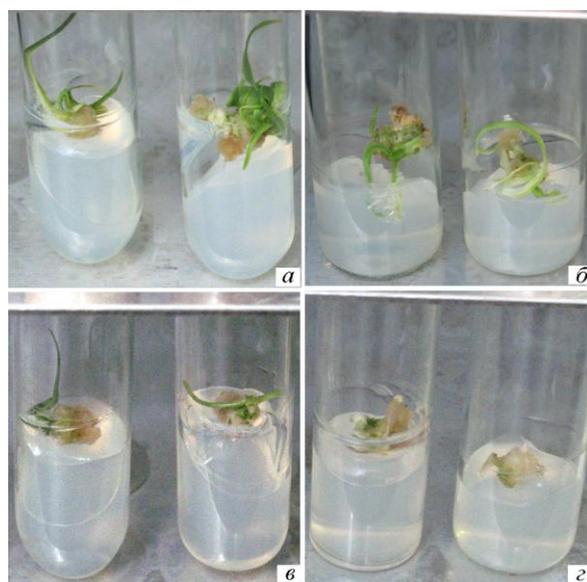


Рис. 2. Регенерация в каллусах ячменя сорта Steptoe (на 7 сут культивирования *in vitro* на регенерационной среде), полученных на разных вариантах среды МС, дополненной 2.0 мг/л 2,4-Д, а также: (а) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (б) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (в) 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (г) 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Известно, что АБК активирует ферменты, катализирующие распад цитокининов, и ингибирует экспрессию генов биосинтеза цитокининов, что, в свою очередь, приводит к снижению активности клеточных делений и торможению ростовых процессов [Vysotskaya et al., 2010; Veselov et al., 2017]. Кроме того, на каллусах пшеницы показано, что при введении в питательную среду 24-ЭБ не наблюдалось повышения содержания в каллусах эндогенной АБК, в то время как уровень эндогенных цитокининов увеличивался вдвое по сравнению с контролем [Seldimirova et al., 2017]. Усиление

синтеза эндогенных цитокининов под воздействием 24-ЭБ наблюдалось также и в проростках пшеницы [Yuldashev et al., 2012]. Возможно, что более высокие показатели прироста сухой массы каллусов на средах, содержащих 24-ЭБ, объясняются повышением уровня эндогенных цитокининов на фоне дефицита АБК, что, в свою очередь, приводит к усилению активности клеточных делений.

Таким образом, установлено, что наиболее эффективной из протестированных сред для индукции каллусогенеза является базовая среда МС, содержащая 0.2 мг/л 2,4-Д, 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Далее проводили визуальную оценку влияния состава питательных сред на способности каллусов к регенерации, для чего полученные каллусы переносили на регенерационную среду. Полученные результаты отражены на рис. 2 и 3.

Согласно визуальной оценке, у ячменя сорта Steptoe наиболее эффективная регенерация наблюдается в каллусах, полученных на варианте среды, содержащей 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о положительном влиянии на регенерацию повышенного содержания меди у ячменя [Chernobrovkina et al., 2004] и 24-ЭБ у пшеницы [Seldimirova et al., 2017].

Из приведенных на рис. 3а, б, г, д данных видно, что каллусы АБК дефицитного мутанта AZ34, полученные на описанных выше вариантах индукционной среды, обладают весьма слабой способностью к регенерации. В связи с этим были проведены дополнительные эксперименты по получению каллусов на среде МС, содержащей 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 2.0 мг/л 2,4-Д в качестве ауксина, 0.5 мг/л 6-БАП в качестве цитокинина или 0.2 мг/л 24-ЭБ, как регулятора роста, стимулирующего синтез эндогенных цитокининов, а также 0.5 мг/л АБК.

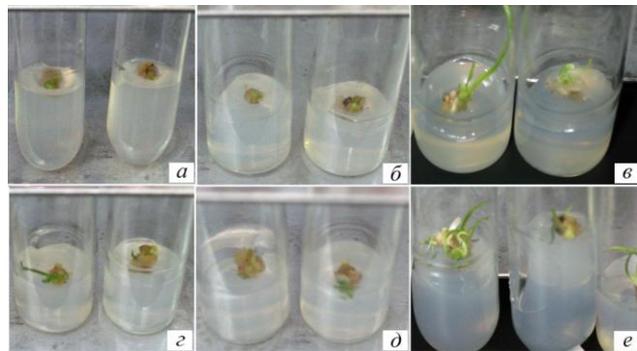


Рис. 3. Регенерация в каллусах ячменя AZ34 (на 7 сут культивирования *in vitro* на регенерационной среде), полученных на разных вариантах среды МС, дополненной 2.0 мг/л 2,4-Д, а также: (а) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (б) 0.2 мг/л 24-ЭБ и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (в) 0.2 мг/л 24-ЭБ, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК; (г) 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (д) 0.5 мг/л 6-БАП и 1.25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; (е) 0.5 мг/л 6-БАП, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК.

Согласно полученным результатам, показатели прироста сухой массы у каллусов АБК-дефицитного мутанта AZ34 (рис. 4), культивируемых на питательной среде с добавлением 0.5 мг/л АБК, сопоставимы с таковыми каллусов ячменя сорта Steptoe (рис. 1а). Возможно, такие данные свидетельствуют о вовлечении АБК в ростовые процессы, как, например, показано в работе [Ding, De Smet, 2013]. Более того, установлено, что именно каллусы AZ34, полученные на среде с добавлением АБК, способны к дальнейшей регенерации при переносе их на регенерационную среду (рис. 3в, е).

Такие результаты также свидетельствуют в пользу того, что регенерация, возможно, происходит путем эмбриогенеза, поскольку хорошо известно, что именно АБК играет важную роль в созревании и прорастании эмбрионов (соматических зародышей) [Jimenez, Thomas, 2006]. Однако для подтверждения этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

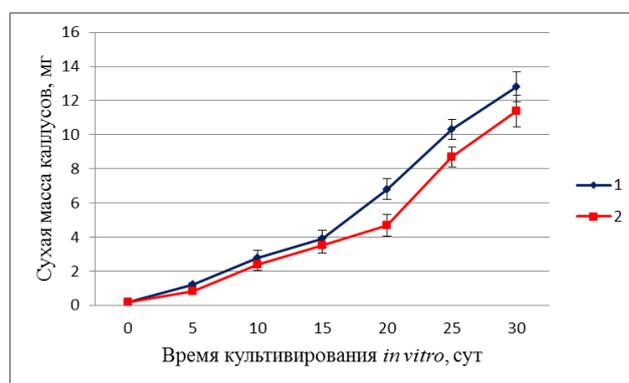


Рис. 4. Прирост сухой массы каллусов ячменя AZ34, культивируемых *in vitro* на среде МС, содержащей 2.0 мг/л 2,4-Д и дополненной другими регуляторами роста и сульфатом меди ($\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) в различных вариантах: (1) 0.2 мг/л 24-ЭБ, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК; (2) 0.5 мг/л 6-БАП, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК.

Таким образом, выявлен оптимальный состав питательных сред для индукции каллусогенеза у ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34, а именно: базовая среда МС, дополненная 2.0 мг/л 2,4-Д, 0.2 мг/л 24-ЭБ и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – для сорта Steptoe и базовая среда МС, дополненная 2.0 мг/л 2,4-Д, 0.2 мг/л 24-ЭБ, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК – для AZ34.

Роль гормонов, в том числе АБК (например [De Smet et al., 2013; Su et al., 2013]), в развитии растений несомненна. Полученные данные позволяют использовать каллусы гормональных мутантов как перспективные модели для изучения взаимодействия гормонов в процессах роста и развития растений.

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

Литература

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 152 с. [Butenko R. G. *Biologiya kletok vysshih rasteniy in vitro i biotehnologii na ih osnove*. M.: FBK-PRESS, 1999. 152 s.]
2. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского НЦ РАН. 2011. № 3-4. С. 17–22. [Kruglova N.N. Kallus kak model' dlya izucheniya formirovaniya struktury vyshego rasteniya // *Izvestia Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN*. № 3-4. S. 17–22.]
3. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Морфогенез в андроклиновых каллусах злаков: цитогистологические особенности. Успехи современной биологии. 2010. Т. 130. С. 247–257. [Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Morphogenes v Androclinnyh kallusah zlakov: Tsyto-Gistologicheskiye osbennosti // *Uspehi sovremennoy biologii*. 2010. T. 130. S. 247–257.]
4. Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Мелик-Саркисов О.С., Харченко П.Н., Майсуриян А.Н., Щербачев В.В., Мартиросян Ю.Ц. Индукция каллусообразования и регенерации растений ячменя *Hordeum vulgare* L. в культуре зародышей // Сельскохозяйственная биология. 2006. № 1. С. 74–79. [Ovchinnikova V.N., Varlamova N.V., Melik-Sarkisov O.S., Kharchenko P.N., Maisuryan A.N., Shcherbachev V.V., Martirosyan Yu. Ts. Induktsiya kallusoobrazovaniya i regeneratsii rasteniy yachmenya *Hordeum vulgare* L. v culture zarodyshei // *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2006. № 1.S. 74–79.]
5. Bohn-Courseau I. Auxin: A major regulator of organogenesis // *C R Biologies*. 2010. V. 333. P. 290–296. DOI: 10.1016/j.crv.2010.01.004
6. Buck-Sorlin G., Hemmerling R., Kniemeyer j., Burema B., Kurth W. A rule-based model of barley morphogenesis, with special respect to shading and gibberellic acid signal transduction // *Ann Bot*. 2008. V. 101. P. 1109–1123. DOI: 10.1093/aob/mcm172
7. Carciofi M., Blennow A., Nielsen M.M., Holm P.B., Hebelstrup K.H. Barley callus: a model system for bioengineering of starch in cereals // *Plant Methods*. 2012. V. 8: 36. DOI: 10.1186/1746-4811-8-36
8. Cheon J., Park S.-Y., Schulz B., Choe S. Arabidopsis brassinosteroid biosynthetic mutant *dwarf7-1* exhibits slower rates of cell division and shoot induction // *BMC Plant Biology*. 2010. V. 10: 270. DOI: 10.1186/1471-2229-10-270
9. Chernobrovkina M.A., Karavaev Ch.A., Kharchenko P.N., Melik-Sarkisov O.S. Somatic embryogenesis and morphogenetic potential of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) in the system of technological genetic transformation // *Biology Bulletin*. 2004. V. 31. P. 332–336. DOI: 10.1023/B:BIBU.0000036935.80745.6c
10. Ding Z., De Smet I. Localised ABA signalling mediates root growth plasticity // *Trends in Plant Sci*. 2013. V. 18. P. 533–535. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.08.009
11. Gazzarini S., Mccourt P. Cross-talk in plant hormone: What arabidopsis mutant are telling us // *Ann Bot*. 2004. V. 91. P. 605–612. DOI: 10.1093/aob/mcg064
12. Gupta S., Rashotte A. M. Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant // *Plant Cell Rep*. 2012. V. 31. P. 801–812. DOI: 10.1007/s00299-012-1233-0
13. Hu Y.X., Bao F., Li J.Y. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct Cyc D3-induction pathway in *Arabidopsis* // *Plant J*. 2000. V. 24. P. 693–701. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x
14. Jiménez V.M., Thomas C. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis // *Somatic Embryogenesis* / Eds. A. Muji, J. Šamaj. Springer, 2006. P. 103–118. DOI: 10.1007/7089_034
15. Kende H. Hormone response mutants. A plethora of surprises // *Plant Physiol*. 2001. V. 125. P. 81–84. DOI: 10.1104/pp.125.1.81
16. Lu Z., Huang M., Ge D.-P., Yang Y.-H., Cai X.-N., Qin P., She J.-M. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae) // *Plant Cell, Tiss Organ Cult*. 2003. V. 73. P. 87–89. DOI: 10.1023/A:1022665210113
17. 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
18. Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants / Eds. N.A. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Anjum. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. 306 p. DOI: 10.1007/978-3-642-25829-9
19. Robert H. S., Khaitova L. C., Mroue S., Benková 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
20. Romanov G. A. How do cytokinins affect the cell? // *Rus J Plant Physiol*. 2009. V. 56. P. 268–290. DOI: 10.1134/S1021443709020174
21. Seldimirova O.A., Bezrukova M.V., Galin I.R., Lubyanova A.R., Shakirova F.M., Kruglova N.N. 24-epibrassinolide effects on in vitro callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance // *Russ. J. Plant Physiol*. 2017. V. 64. P. 919–929. DOI: 10.1134/S1021443717060085
22. Shirokikh I.G., Bakulina A.V., Batalova G.A. Induction of morphogenesis in barley callus culture // *Russ. Agricult. Sci*. 2014. V. 40. P. 237–241. DOI: 10.3103/S1068367414040144
23. Su Y.-H., Liu Y.-B., Zhang X.-S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development // *Mol. Plant*. 2011. V. 4. P. 616–625. DOI: 10.1093/mp/ssr007
24. Su Y.H., Su Y.X., Liu Y.G., Zhang X.S. Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in *Arabidopsis* // *Plant Growth Regul*. 2013. V. 69. P. 167–176. DOI: 10.1007/s10725-012-9759-2
25. Tanasienko I.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Estimation of the callus formation and regeneration efficiency in spring varieties of barley zoned in Ukraine // *Cytol. Genet*. 2009. V. 43. P. 230–236. DOI: 10.3103/S0095452709040021

26. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Role of cytokinins in stress resistance of plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 15–27. DOI: 10.1134/S1021443717010162
27. Vriet C., Russinova E., Reuzeau C. Boosting crop yields with plant steroids // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 842–857. DOI: 10.1105/tpc.111.094912
28. Vysotskaya L.B., Aval'baev A.M., Yuldashev R.A., Shakirova F.M., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Regulation of cytokinin oxidase activity as a factor affecting the content of cytokinins // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. P. 494–500. DOI: 10.1134/S1021443710040060
29. Yuldashev R., Avalbaev A., Bezrukova M., Vysotskaya L., Khripach V., Shakirova F. Cytokinin oxidase is involved in the regulation of cytokinin content by 24-epibrassinolide in wheat seedlings // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. V. 55. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.03.004