

Светлой памяти члена-корреспондента РАН
Татьяны Борисовны Батыгиной

КАЛЛУСОГЕНЕЗ КАК ПУТЬ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ЗЛАКОВ

© 2018 г. Н. Н. Круглова^{а, *}, Г. Е. Титова^{б, с}, О. А. Сельдимирова^а

^аУфимский институт биологии РАН,
Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 69

^бБотанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2

^сСанкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

*E-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 10.11.2017 г.

Окончательный вариант получен 23.04.2018 г.

Каллус – интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине тканей); изначально состоит из однородных клеток, постепенно преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток с видоспецифичными морфогенетическими потенциями, которые реализуются различными путями морфогенеза. Анализируются вопросы, посвященные изучению формирования каллусов в условиях культивирования *in vitro* незрелых пыльников и зародышей культурных злаков. Предложено выделение критических стадий каллусогенеза. Рассматриваются особенности гемморизогенеза *in vitro* как типа органогенеза в каллусах. Подтверждена концепция Т.Б. Батыгиной (1987, 1999, 2014; Batygina, 2012) об универсальности процессов морфогенеза растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro*. Обсуждается перспективность подхода к каллусам как модельным системам при изучении различных проблем биологии развития растений.

Ключевые слова: культурные злаки, пыльник, зародыш, каллус, морфогенез *in vitro*

DOI: 10.1134/S0475145018050038

ВВЕДЕНИЕ

Сложнейшей фундаментальной проблемой биологии развития остается морфогенез. Начиная с последней трети прошлого века предложены различные, но в целом не противоречащие друг другу определения морфогенеза: последовательная цепь изменений формы в процессе онтогенеза, приводящая к созданию видоспецифичной пространственной структуры (Бутенко, 1964, 1994); формообразовательный процесс различных структур (не только органов), совершающийся на субмолекулярном, молекулярном, надмолекулярном, клеточном, тканевом (гистогенез) и организменном (эмбриогенез, эмбриоидогенез, гемморизогенез) уровнях (Батыгина, 1987); процесс возникновения новых форм и структур в ходе индивидуального (и, через его посредство, исторического) развития организмов (Белоусов, 1987); совокупность протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тка-

ней и органов (Марченко, 1996); образование и дифференциация тканей и органов многоклеточного организма (по: Журавлев, Омелько, 2008). Подчеркивается интегральный характер морфогенетических процессов, их зависимость от многих взаимодействующих внутренних и внешних факторов (Уоддингтон, 1964 и мн. др.). С позиции теории самоорганизации обсуждается общая схема возникновения новых черт организации в эволюции и онтогенезе организмов, при этом обоснован вытекающий из синергетики методологический принцип распределения морфогенеза на небольшое число дискретных динамических уровней – переменных морфогенеза (Белоусов, 1990). Высказано мнение, что индивидуальное развитие живых организмов, их микро- и макроэволюцию можно рассматривать как реализацию морфогенетического потенциала клеток (Марченко, 1996).

Хорошо известно, что характерная черта морфогенеза сосудистых растений – эволюционно обусловленная способность к регенерации, что вы-

ражается в наличии постоянно функционирующих локализованных меристем и, как следствие, в продолжении морфогенеза в ходе всего онтогенеза (принцип непрерывности морфогенеза, по: Батыгина, 2014) и создании метамерности строения растений (по: Синнот, 1963; Барлоу, 1994; Meristematic tissues., 2002; Журавлев, Омелько, 2008; Чуб, Сянюшин, 2012 и мн. др.). Исследованиями последних лет на примере ряда растений (арабидопсис, томат, табак) идентифицированы ключевые гены, ответственные за процессы поддержания вегетативных и флоральных меристем в недетерминированном состоянии, за детерминацию клеток и органов, за дифференциацию клеток и тканей в листьях и цветках. Успехи, достигнутые в изучении генов-переключателей развития, позволили приблизиться к пониманию как взаимодействия генов развития и пространственно-временной регуляции развития, так и регуляции на уровне экспрессии генов взаимоотношений клеток и тканей в процессе морфогенеза растений. Быстро накапливается информация об организующих центрах морфогенеза и генах, продукты которых могут играть роль индуктивных сигналов морфогенеза растений; о единстве процессов активации и инактивации генов, контролирующих детерминацию и дифференциацию (по: Лутова и др., 2010; Wolfe, Clark, 2015 и мн. др.).

Для исследования морфогенеза растений разрабатываются различные методологические подходы, среди которых можно выделить структурный, физиолого-биохимический, биоинформационный, математический (например, привлечение теории множеств), использование виртуальных растений *in silico*. 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; Батыгина, 2014; Медведев, 2016 и др.). Приблизиться к пониманию закономерностей и особенностей морфогенеза в интактных растениях позволяет модельный подход культуры *in vitro*, дающий возможность изучать детали сложных морфогенетических процессов и механизмов их регуляции в контролируемых экспериментатором условиях (Бутенко, 1964 и др.).

В цикле работ Т.Б. Батыгиной с соавт. (Батыгина и др., 1978; Батыгина, 1987, 1999, 2014; Батыгина и др., 2010; Batygina, 2012) показана перспективность использования комплексного системного и модельного подходов к изучению морфогенеза репродуктивных структур растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro*. При этом проводятся подбор модельных объектов — видов, контрастирующих по жизненным формам, способу репродукции и типу развития генеративных структур; сравнительный анализ развития генеративных структур *in situ*, *in vivo* и *in vitro* в динамике и во взаимосвязи с тканями материнско-

го организма; сопоставление кинетики морфологических и физиолого-биохимических процессов; моделирование условий *in vitro* для разных стадий развития (с учетом данных морфо-биохимического исследования структур *in vivo*). Подчеркивается зависимость морфогенетического потенциала клеток различных видов в условиях *in vitro* от природного потенциала, заложенного в генотипе особей. Такой комплексный подход, лежащий в основе современной теории репродукции растений, позволяет приблизиться к пониманию причин склонности разных видов к определенным способам воспроизведения, размножения и их реализации посредством конкретных путей морфогенеза. Кроме того, использование такого подхода выявило универсальность путей морфогенеза растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro*.

Перспективные модельные системы в области исследования морфогенеза растений — каллусные культуры *in vitro*. Первые работы, посвященные получению каллуса из изолированных 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: Ikeuchi et al., 2013). В своих исследованиях мы придерживаемся следующих понятий: каллус — интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине этих тканей); изначально состоит из однородных клеток, постепенно преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток, имеющих видоспецифичные морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза (по: Батыгина, 1987; Батыгина и др., 2010).

Каллусы, полученные от эксплантов в контролируемых экспериментатором условиях *in vitro*, могут служить модельными системами для изучения реализации различных путей морфогенеза у растений, а также их регуляции в нужном экспериментатору направлении. Основанием для использования таких моделей служит важная роль клетки в процессах морфогенеза растений, поскольку в основе морфогенетических событий у растений, как и при морфогенезе животных (Уоддингтон, 1964; Белоусов, 1987; Исаева, 1994, 2012; Гилберт, 1995; Корочкин, 2002; Patwari, Lee, 2008 и мн. др.), лежат дифференциальная экспрессия генов в клетках, дифференциация и рост клеток, темпы и ориентация клеточных делений, клеточный цикл, поляризация клеток, самоорганизация клеточных систем (Бутенко, 1964; Барлоу, 1994; Носов, 1999; Медведев, Шарова, 2010; Медведев, 2012; Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015 и др.).

Способность к каллусогенезу *in vitro* обнаружена у представителей многих семейств растений (по: Sugiyama, 2015). Особый интерес исследователей вызывают каллусы, полученные из различных эксплантов культурных злаков. Такой интерес обусловлен современным бурным развитием биотехнологических исследований именно этой группы растений.

Как свидетельствует анализ литературных данных, у культурных злаков наиболее изучены каллусы, полученные из отдельных клеток/групп клеток пыльников и зародышей. Следует отметить, что в публикациях по анализируемой теме отсутствуют унифицированные термины. Так, каллусы, полученные в культуре *in vitro* пыльников, называют “андрогенными”, “микроспоральными”, “пыльцевыми”, “андроклинными”, в культуре *in vitro* зародышей – “зародышевыми”, “каллусами зародышевого происхождения”. В данной статье будут использованы термины “пыльниковый каллус”/“зародышевый каллус” соответственно генеративной/эмбриональной структуре, давшей начало каллусу.

Цель данной работы – провести анализ литературных и оригинальных данных, посвященных изучению в условиях *in vitro* главным образом структурных особенностей формирования и развития пыльниковых и зародышевых каллусов у культурных злаков. Такой выбор обусловлен тем, что, по мнению авторов, именно классические структурные (гистологические) данные должны лежать в основе современных исследований молекулярно-генетических (концепция *evo-devo*) и иных регуляторов формирования и развития каллусов. Кроме того, сами каллусы, развивающиеся в контролируемых условиях *in vitro*, представляют собой удобные модельные системы, обеспечивающие, при некотором упрощении, максимальную приближенность к событиям, которые происходят в развивающихся органах растения *in vivo*.

ФОРМИРОВАНИЕ ПЫЛЬНИКОВЫХ И ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСОВ ЗЛАКОВ НА ИНДУКЦИОННОЙ СРЕДЕ *IN VITRO*

В литературе отсутствует периодизация развития *in vitro* каллусов, хотя отдельные попытки предпринимались (Круглова, Сельдиминова, 2010). Этот вопрос остается открытым, поскольку каллус, изначально состоящий из однородных клеток, постепенно преобразуется в систему групп гетерогенных клеток, при этом каждая из клеточных группировок развивается по своим морфогенетическим закономерностям. По-видимому, можно говорить о формировании каллусов на индукционной среде *in vitro* и о путях морфогенеза клеток каллусов на регенерационной среде *in vitro*.

Одна из принципиальных проблем в этой области исследований – анализ факторов, определяющих

индукцию формирования каллуса инициальной клеткой в условиях *in vitro*, т.е. процессы в клетке, тканях и организме в целом, вызываемые индуктором – веществом-стимулятором этих процессов (по: Корочкин, 2002). В контексте данного обзора в понятие “индуктор” следует включить физиологические (главным образом фитогормональный состав питательной среды) и физические (температура, освещенность, облучение и т.п.) факторы.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что индукция формирования каллусов как путь морфогенеза *in vitro* клеток пыльников и зародышей злаков в значительной степени определяется условиями культивирования, важнейшее среди которых – оптимальный баланс эндогенных (в экспланте в момент инокуляции) и экзогенных (в составе индукционной питательной среды) фитогормонов, а также генотипом донорной особи и физиологическим статусом экспланта в момент инокуляции на питательную среду (Горбунова и др., 2001; Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдиминова, 2010, 2011, 2013; Ikeuchi et al., 2013; Colebrook et al., 2014; Doubled haploidy..., 2016 и др.). Подчеркнем, что баланс эндогенных/экзогенных фитогормонов расценивается как важнейший фактор, определяющий индукцию инога, помимо каллусогенеза, пути морфогенеза *in vitro* в пыльниках и зародышах злаков – прямого эмбриогенеза и его модификации – полиэмбриогенеза (Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдиминова, 2011; Сельдиминова, Круглова, 2014, 2015; Титова и др., 2016; Zug et al., 2016).

Важнейший момент формирования каллусов любого происхождения – инициация процесса. Этот вопрос детально изучен на примере пыльниковых каллусов пшеницы. Экспериментально установлено, что формирование каллуса происходит наиболее эффективно из микроспоры в сильновакуолизированной стадии развития (рис. 1, 1), при этом пыльник находится в периоде созревания (по периодизации: Круглова, 2002), т.е. является незрелым.

Сильновакуолизированная микроспора обладает структурными свойствами меристематических клеток, главным образом наличием крупного ядра (Meristematic tissues..., 2002). Тем самым по признаку “меристематичность” микроспора структурно сходна с ранними яйцеклеткой-зиготой, дающими начало половому зародышу при амфимиксисе, и клетками зародышевого мешка, нуцеллуса и интегумента, образующими адвентивные зародыши при апомиксисе (по: Круглова, Батыгина, 2001; Круглова, 2002). Это позволило сделать вывод о гомологии инициальных клеток при различных системах репродукции растений (Батыгина, Осадчий, 2015).

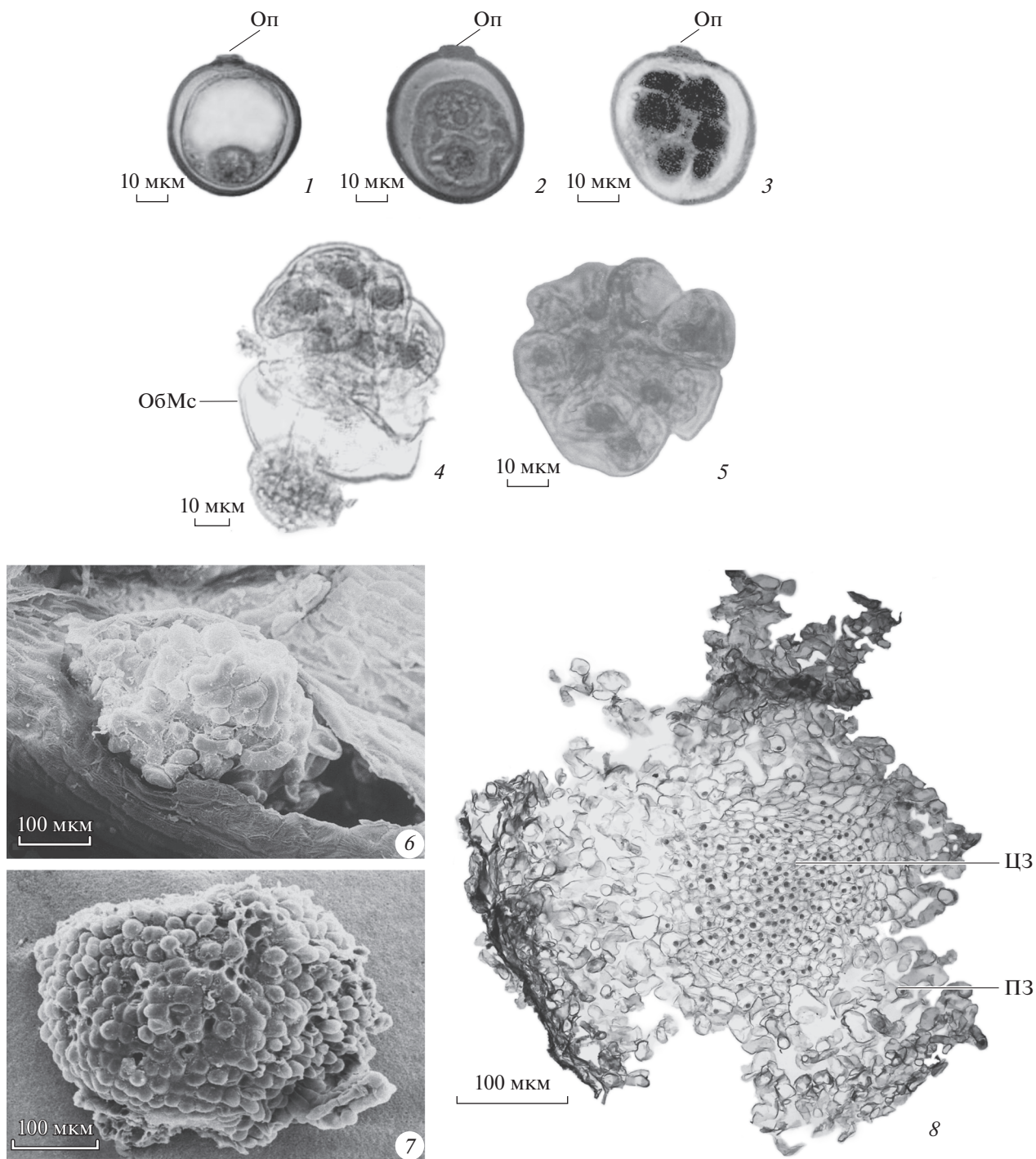


Рис. 1. Последовательные стадии развития морфогенного пыльничкового каллуса пшеницы на индукционной среде *in vitro* (1–5, 8 – световая микроскопия, 6–7 – сканирующая электронная микроскопия). Условные обозначения: ОбМс – оболочка микроспоры, Оп – оперкулум, ПЗ – периферическая зона, ЦЗ – центральная зона. Пояснения в тексте. По: Батыгина и др., 2010.

В оригинальной концепции Т.Б. Батыгиной (Batygina, 2005, 2011; Батыгина, Рудский, 2006; Батыгина и др., 2010; Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015), рассматривается возможность

трактовки сильновакулизированной микроспоры (инициальной клетки каллуса, а также эмбриоида/полиэмбриоида, в зависимости от условий культуры *in vitro*, главным образом гормональ-

ных) как стволовой клетки. По мнению исследователя, образование стволовых клеток растений, производных зиготы, характерно не только для апексов побега и корня (меристема ожидания и покоящийся центр), но и для всех органов (цветок, стебель, лист, корень) и всех этапов жизненного цикла (спорофит, гаметофит), причем их функционирование зависит, прежде всего, от их локализации и назначения. Пластичность в развитии и репродукции растений в первую очередь связана с разносторонней деятельностью клеток тела растения, имеющих свойства стволовых клеток, а именно свойство тотипотентности, т.е. способность к образованию не только разных типов тканей и органов, но и нового индивидуума за счет различных путей морфогенеза (в том числе органогенеза *in vitro* – Авт.); свойство самоподдержания, т.е. создания пула клеток, главным образом, благодаря симметричным делениям и системе межклеточных взаимодействий; способность к пролиферации и образованию клеток-предшественников разных типов тканей (“ниши”) за счет асимметричных делений при действии определенных сигналов; пульсирующий и многоступенчатый характер образования в ткани или органе и способность к переключению программы развития. Как полагает исследователь, микроспоры, способные к переходу с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевых зерен со спермиями) на спорофитный (образование гаплоидного растения, в том числе через формирование каллуса *in vitro*. – Авт.), т.е. способные к переключению способа репродукции с полового на бесполоый, являются стволовыми клетками. В качестве “ниши” в данном случае следует рассматривать клетки стенки пыльника. В то же время, как полагает автор, понятие “стволовая клетка” является чисто функциональным, поскольку для идентификации таких клеток неизвестны какие-либо универсальные генетические или эпигенетические маркеры. В целом, дискуссионная проблема стволовых клеток у растений вызывает большой интерес исследователей (Иванов, 2003, 2007, 2011; Чуб, Синюшин, 2012; Savona et al., 2012; Wendrich et al., 2015; Додуева и др., 2016 и др.).

Морфогенетически компетентная сильновакуолированная микроспора способна воспринимать воздействие сигнала внешнего индуктора к детерминации и дифференциации. Таким свойством компетентные клетки обладают главным образом благодаря соответствующему состоянию хроматина, которое ассоциируется с отдельными программами экспрессии генов (по: Корочкин, 2002; Журавлев, Омелько, 2008), однако на примере микроспоры эта проблема не изучена. Несмотря на многочисленные экспериментальные данные, не решен однозначно и поставленный еще в 1970–1980-х гг. (например, Ермаков, Матвеева, 1986) вопрос о том, приобретает ли ком-

петентность микроспор к спорофитному развитию именно в условиях *in vitro* или морфологическим эквивалентом таких компетентных клеток являются различного рода аномальные клетки, уже присутствующие в пыльниках *in vivo*, до культивирования, в силу так называемого пыльцевого диморфизма (корректнее – полиморфизма. – Авт.).

Сильновакуолированная микроспора находится в одном из критических периодов развития пыльника (Batygina, Vasilyeva, 2003), возможно, в критической фазе клеточного цикла (“морфогенное окно”) (Круглова, 2002), в контексте разрабатываемой Т.Б. Батыгиной с соавт. (по: Батыгина, 2014) теории критических стадий в онтогенезе растений, затрагивающей все репродуктивные структуры и основывающейся на работах П.Г. Светлова в области критических периодов развития (1960). Действительно, стадия сильновакуолированной микроспоры, обладающей в силу структурных особенностей (крупная центральная вакуоль) и своего нестабильного предмитотического состояния повышенной чувствительностью к действию внешних индукторов (главным образом гормонов) и морфогенетически компетентной к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, соответствует такому предложенному критерию критических стадий развития растений, как повышенная чувствительность к внешним факторам, воздействие которых приводит к переключению программ развития на альтернативные пути.

В целом, по нашему мнению, стадию сильновакуолированной микроспоры как инициальной клетки каллуса следует расценивать как первую критическую стадию пыльникового каллусогенеза.

В то же время далеко не каждая сильновакуолированная микроспора, несмотря на свойства морфогенетической компетентности, меристематичности, тотипотентности, а также стволовости даст начало формированию каллуса *in vitro*. Нельзя не согласиться с высказанным мнением (Журавлев, Омелько, 2008) о том, что к известной мере непредсказуемости морфогенеза растений *in vitro*, в отличие от вполне предсказуемого морфогенеза зиготы *in vivo*, приводят эпигенетический характер компетентности инициальной клетки, “неподходящая” фаза ее клеточного цикла, при которой хроматин не способен к восприятию сигнала, а также низкий уровень специфичности самого сигнала-индуктора. Кроме того, каллус (возможно, раневой) может брать начало и от клеток соматических тканей пыльника, связника или тычиночной нити. Для идентификации каллусов соматического происхождения на примере перца предложено использовать морфологические маркеры, а избавляться от таких каллусов предварительным воздей-

ствием на пыльники тепловым шоком (Parra-Vega et al., 2013). В целом этот вопрос мало изучен.

Инициальные клетки зародышевого каллуса злаков изучены не так детально. В немногих работах приведены данные о гистологическом статусе незрелых зародышей в той стадии эмбриогенеза *in vivo*, которая оптимальна для получения каллуса *in vitro* под действием внешних индукторов, главным образом гормональных. У пшеницы такой зародыш характеризуется обособлением зачатков органов (щиток, зародышевый корень, колеориза, эпибласт, лигула, первый лист), представленных активно делящимися меристематическими клетками (Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, 2012), в которых отмечено интенсивное иммуногистохимическое окрашивание на ИУК (Сельдиминова и др., 2017а). Крайне немногочисленны и сведения о клеточных и тканевых механизмах формирования *in vitro* каллусов из органов незрелых зародышей злаков. У пшеницы (Круглова, Сельдиминова, 2011) и ячменя (Slesak et al., 2013) каллус берет начало от группы инициальных клеток, расположенных в семядоле — щитке: либо от эпидермальных клеток, не покрытых плотной клеточной оболочкой, либо от субэпидермальных клеток. Кроме того, у пшеницы формирование зародышевого каллуса, помимо клеток щитка, отмечено и от клеток формирующихся проводящих пучков (Спивак и др., 2014). На примере апельсина (De Almeida et al., 2006) и тмина (Ebrahimie et al., 2007) выявлено, что на путь каллусогенеза *in vitro* вступают менее дифференцированные клетки зародыша, имеющие статус меристематических (к сожалению, авторы не указывают, в клетках какого именно органа зародыша индуцируется формирование каллуса). Можно полагать, что все указанные инициальные клетки обладают признаком тотипотентности, поскольку их производные — клетки каллуса — в условиях культивирования на регенерационной среде реализуют различные пути морфогенеза *in vitro*.

Стадию развития зародыша, клетки органов которого служат инициальными клетками зародышевого каллуса, как и в случае инициации пыльниково-го каллусогенеза, следует анализировать в контексте теории критических стадий в онтогенезе растений с применением рассмотренного выше такого критерия, как повышенная чувствительность к внешним факторам, воздействие которых приводит к переключению программ развития на альтернативные пути (по: Батыгина, 2014). Однако этот вопрос практически не изучен, несмотря на то, что понятие “критическая стадия” детально разработано для оценки сопряженности морфогенетических и морфофизиологических процессов в развитии зародыша растений *in vivo* (Batygina, Vasilyeva, 2003; Батыгина и др., 2010). Можно полагать, что именно степень дифференциации клеток в зародыше определяет их восприимчивость к экзоген-

ным гормонам и тот альтернативный путь морфогенеза *in vitro*, на который они вступят.

Таким образом, стадию инициальных клеток, входящих в различные органы незрелого зародыша, можно оценивать как первую критическую стадию развития зародышевого каллуса. В целом же, стадию инициальных клеток следует выделить как первую критическую стадию каллусогенеза *in vitro* любого происхождения.

Далее при инициации формирования каллуса сильновакуолизованный микроспора пшеницы претерпевает симметричное митотическое деление с образованием двух равных клеток (рис. 1, 2) (в отличие от двух неравных клеток при гаметофитной программе развития, формирующихся в результате асимметричного митоза). При этом происходит реорганизация такой микроспоры — ее девакуолизация (Круглова, 2002). Аномальные симметричные деления сильновакуолизованных микроспор как ранняя стадия формирования каллуса выявлены и у других злаков (по: Круглова, Сельдиминова, 2010).

Дальнейшие симметричные деления двух образовавшихся клеток с последовательным заложением клеточных оболочек ведут к формированию в пределах оболочки микроспоры пшеницы многоклеточного (10–15 клеток) каллуса, согласно светооптическим (рис. 1, 3) и ультраструктурным данным представленного системой меристематических клеток сходных размеров и одинаковой морфологии (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010).

Далее многоклеточный каллус пшеницы, исходно однородный по характеристикам составляющих клеток, интенсивно наращивает массу путем многократных митотических делений клеток. По-видимому, можно говорить о том, что такой многоклеточный каллус набирает свою “критическую массу”. Каллус механически разрывает оболочку микроспоры и стенку пыльника, оказываясь на поверхности пыльника (рис. 1, 4–8).

Важно, что к этому моменту наблюдается становление гистологической зональности строения каллуса и гетерогенности его клеток по форме, размерам и строению (рис. 1, 6–8). При этом происходит выделение так называемых морфогенетических очагов (Сельдиминова и др., 2011), располагающихся в толще каллуса. Такой очаг представлен двумя зонами клеток: центральная зона относительно мелких слабовакволизованных клеток, сохраняющих меристематическую активность и находящихся в состоянии пролиферации, и периферическая зона крупных, рыхло расположенных сильновакуолизованных клеток, утративших меристематическую активность (рис. 1, 8). Наличие морфогенетических очагов подтверждено применением комплексного морфолого-гистологического подхода, позволяющего сопоставить

пространственные характеристики каллусов, выявленные путем электронного сканирования поверхности, с их гистологическим статусом. Установлено, в частности, что появившиеся на поверхности пыльников каллусы пшеницы, по данным сканирующей электронной микроскопии представляющие собой комплексы однородных плотно расположенных мелких клеток полусферической формы, согласно светооптическим данным характеризуются наличием участков меристематических клеток (центральная зона морфогенетического очага) и участков вакуолизованных клеток паренхиматозной природы (периферическая зона морфогенетического очага) (Сельдиминова и др., 2016). Тем самым в пыльниковых каллусах создаются гистологические предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза на регенерационной среде *in vitro*. Один из решающих факторов в данном случае – это межклеточные взаимодействия. Внутри различных тканевых участков каллуса формируются специализированные межклеточные контакты, необходимые как для функционирования клеток, так и для координации деятельности клеток в составе таких участков. Ряд исследователей (Marzec, Kurczynska, 2014) полагают, что будущий путь морфогенеза зависит от того, сможет ли группа клеток установить и поддерживать скоординированное поведение в качестве интегрированной единицы, при этом универсальным механизмом, контролирующим процессы дифференциации клеток, является формирование симпластических взаимодействий. С этим мнением следует согласиться. Действительно, тесные межклеточные симпластные взаимодействия посредством плазмодесм в центральной меристематической зоне морфогенетического очага отличаются от таковых в окружающей паренхиматозной периферической зоне, где плазмодесмы сильно редуцированы (Сельдиминова, Круглова, 2013). Симпластный транспорт обеспечивает надежный обмен клеток центральной зоны морфогенетического очага гормонами и питательными веществами, что позволяет рассматривать такую зону как интегрированную структуру.

Гистологические особенности инициации формирования *in vitro* зародышевых каллусов злаков изучены не настолько подробно. Установлено, что каллус злаков наиболее эффективно берет начало от группы инициальных клеток незрелого зародыша. Однако авторы, как правило, не сообщают, на какой именно стадии развития находится инокулируемый на питательную среду незрелый зародыш, указывая лишь такие показатели, как длина извлеченного из зерновки зародыша и время, прошедшее после искусственного опыления. Анализ литературных данных свидетельствует о вариабельности показателей оптимальной длины зародыша и промежутка времени после опыления у

одних и тех же видов злаков, что можно объяснить использованием в экспериментах их различных сортов и гибридных линий, т.е. генотипическим эффектом (по: Круглова, Сельдиминова, 2011).

Следует отметить, что при анализе структурных особенностей начальных этапов формирования зародышевых каллусов злаков возникает пока больше вопросов, чем ответов. В частности, в доступной литературе приводятся единичные гистологические данные о формировании гетерогенности в зародышевых каллусах на индукционной среде *in vitro*. Так, на примере пшеницы установлено, что эпидермальные клетки щитка дают начало морфогенетическому очагу зародышевого каллуса пшеницы, представленного, как и морфогенетический очаг пыльникового каллуса, центральной и периферической зонами клеток (Круглова, Катасонова, 2009; Сельдиминова и др., 2011).

В целом, стадию морфогенетического очага, когда каллусы приобретают гистологические предпосылки и морфогенетическую компетентность к альтернативным путям морфогенеза *in vitro*, следует отнести ко второй критической стадии каллусогенеза.

Морфологические показатели каллусов, появившихся на поверхности культивируемых пыльников или зародышей злаков на заключительных этапах культивирования *in vitro* на индукционной среде и способных к морфогенезу при дальнейшем культивировании на регенерационной среде (так называемые морфогенные каллусы), достаточно сходны: это компактные, узловатые, плотные структуры, как правило, белого цвета (Круглова и др., 2005; Chaum et al., 2009; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдиминова, 2011; Slesak et al., 2013; Sun et al., 2013; Мирошниченко и др., 2014 и др.). Аналогичные данные получены при исследовании каллусов иного происхождения (по: Ikeuchi et al., 2013). Сканирование поверхности морфогенных пыльниковых (Круглова и др., 2001; Сельдиминова и др., 2016) и зародышевых (Narciso, Hattori, 2010; Zuraida et al., 2011; Bevitoni et al., 2014; Mohd Din et al., 2016) каллусов ряда злаков подтвердило их узловатую бугорчатую форму.

Методом трансмиссионной электронной микроскопии выявлены ультраструктурные характеристики клеток морфогенных пыльниковых и зародышевых каллусов пшеницы, свидетельствующие о наличии в клетках предпосылок для энергетических затрат в ходе дальнейших активных клеточных делений: увеличение числа полисом, диктиосом и липидных включений наряду с наличием в митохондриях развитых крист, а в пластидах – крахмальных зерен (Konieczny et al., 2007; Круглова, Сельдиминова, 2011; Сельдиминова, Круглова, 2013). Отметим, что аналогичные данные получены и при ультраструктурном анали-

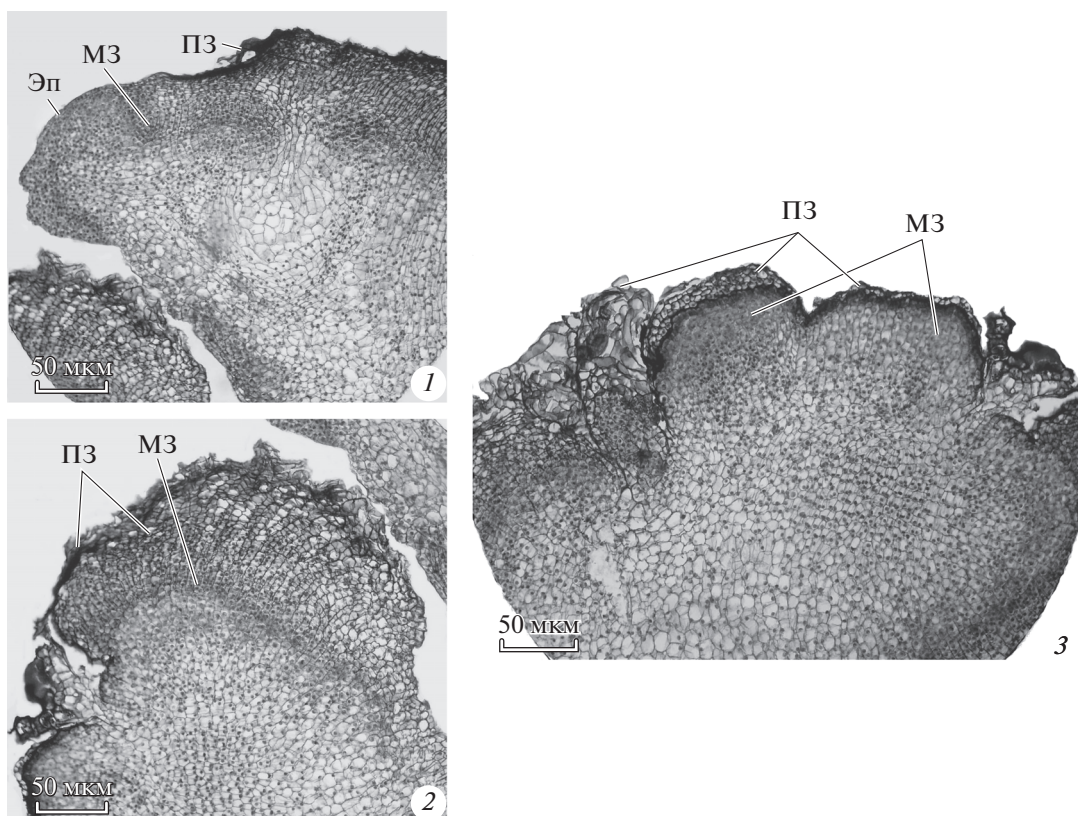


Рис. 2. Начальные стадии развития морфогенного пыльничкового каллуса пшеницы на регенерационной среде *in vitro* (световая микроскопия). Условные обозначения: МЗ – меристематическая зона, ПЗ – периферическая зона, Эп – эпидермис. Пояснения в тексте. По: Батыгина и др., 2010.

зе формирующихся эмбрионидов пшеницы микроспориального происхождения *in vitro* (Сельдимирова и др., 20176).

ОРГАНОГЕНЕЗ В ПЫЛЬНИКОВЫХ И ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСАХ ЗЛАКОВ НА РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СРЕДЕ *IN VITRO*

Морфогенные пыльничковые и зародышевые каллусы злаков переносят на регенерационную среду *in vitro*. В ходе развития на такой среде происходят постепенное увеличение размеров каллусов, усложнение организации и процессы органогенеза в них.

Структурные особенности каллусогенеза *in vitro* на регенерационной среде подробно изучены на примере пыльничкового каллуса пшеницы. Установлено, что в начале культивирования (1–23 сут) морфогенетический очаг каллуса увеличивается в размерах за счет активных делений меристематических клеток центральной зоны, при этом клетки рыхлой периферической зоны подвергаются постепенной деструкции. Под дегенерирующей периферической зоной наблюдается оформление эпидермального слоя, параллельно поверхности которого из клеток центральной зоны дифферен-

цируется меристематическая зона, представленная клетками таблитчатой формы, сходными по строению с клетками прокамбия. Происходит дальнейшее интенсивное нарастание массы каллуса и формирование многочисленных инвагинаций на его поверхности (рис. 2, 1–3).

Гистологическими методами выявлено, что именно с деятельностью клеток поверхностной меристематической зоны связана дальнейшая реализация различных путей морфогенеза *in vitro* как в пыльничковых (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010), так и зародышевых (Круглова, Сельдимирова, 2011; Сельдимирова и др., 2011) каллусах пшеницы. Выявлено значение изменения содержания углеводов и белков в становлении морфогенетической компетентности клеток поверхностной меристематической зоны каллусов злака *Brachypodium distachyon* (Oliveira et al., 2017).

Принципиально важным, на наш взгляд, является тот факт, что у растений и в условиях *in vivo* многие начальные морфогенетические процессы, например, разметка и закладка листовых примордиев, также происходят в периферической зоне апикальной меристемы, функционально отграниченной от центральной зоны и меристемы ожидания; установлена роль потока ауксинов из поверх-

ностных слоев к формирующимся примордиям и идентифицированы участвующие в этом процессе гены (по: Ежова, 2003; Быкова и др., 2016).

Показано, что в качестве молекулярного маркера морфогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы возможно использование пролиферативного антигена инициалей, обнаруженного только в морфогенных каллусах и характеризующего процесс перехода клеток морфогенетического очага к морфогенезу (Евсеева и др., 2007). Авторы делают вывод о том, что клетки морфогенетического очага выполняют функцию, аналогичную инициальным клеткам в апикальных меристемах стебля и корня пшеницы *in vivo*. Этот вопрос интересен и с позиции изучения покоящегося центра меристемы корня растений. Известно, что под влиянием различных повреждающих действий может произойти активация делений нижнего слоя клеток (возможно, ствольных) такого центра в сторону чехлика, что приводит к “открыванию” меристемы (Быстрова и др., 2015). Возможно, и в случае морфогенетического очага происходит такая же активация части его клеток, например, под действием экзогенных гормонов.

Предположено, что последовательность развития морфогенетических очагов отражает метаморфоз каллусов, а каждый этап развития морфогенетического очага представляет собой особый тип каллусных тканей (Бишимбаева, 2007). Мы, однако, полагаем, что этапы развития морфогенетических очагов представляют собой последовательные события одного и того же процесса, а формирование очага и его дальнейшее преобразование в поверхностную меристематическую зону — общий начальный этап, характерный для разных путей морфогенеза *in vitro* в различных типах каллусов. Универсальность такого начального этапа лишней раз подтверждает концепцию универсальности путей морфогенеза *in situ*, *in vivo* и *in vitro* в различных системах размножения растений, предложенную и разработанную Т.Б. Батыгиной (1987, 1999, 2014; Batygina, 2012). В целом, стадию формирования из центральной зоны морфогенетического очага поверхностной меристематической зоны, клетки которой являются инициальными при различных путях морфогенеза *in vitro*, можно оценивать как третью критическую стадию каллусогенеза.

На последующих этапах культивирования *in vitro* на регенерационной среде в пыльниковых и зародышевых каллусах злаков выявлены различные пути морфогенеза *in vitro* их клеток/групп клеток: непрямой эмбриоидогенез (формирование эмбриоида — зародышеподобной структуры), органогенез по типам геммогенеза (формирование почек), ризогенеза (формирование корней), гемморизогенеза (формирование и почек, и корней), а также ги-стогенез (формирование различных тканей).

Стадию морфогенного каллуса, способного к реализации различных путей морфогенеза *in vitro*, мы предлагаем отнести к четвертой, заключительной критической стадии каллусогенеза. Несомненно, все четыре выделенные критические стадии взаимосвязаны.

При анализе разнообразия путей морфогенеза *in vitro* клеток пыльникового каллуса, по-видимому, применима концепция эпигенетической изменчивости растений (Медведев, Шарова, 2010; Ашапкин и др., 2016; Ikeuchi et al., 2015 и др.). Вполне вероятно, что в рассматриваемом случае происходит реализация эпигеномных подпрограмм развития компетентных к морфогенезу *in vitro* клеток каллуса. Ситуация усложняется тем, что сами каллусные клетки, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием эмбриоидов, органов или тканей, берут начало от одной клетки — микроспоры, реализующей в данном случае спорофитную программу развития. Более того, в зависимости от условий культивирования (главным образом, от гормонального состава индукционной среды) микроспора может развиваться по спорофитному пути не только через этап формирования каллуса, но и альтернативно — через этап формирования эмбриоида/полиэмбриоида (пути прямого эмбриоидогенеза и прямого полиэмбриоидогенеза).

Сложность протекания такого пути морфогенеза в каллусах, как органогенез *in vitro* различных типов, вызывает к нему большой интерес исследователей. Так, выявлена несомненная связь органогенеза *in vitro* с предшествующими делениями клеток каллуса: переход клетки/группы клеток каллуса к формированию дифференцированного органа может произойти только после прохождения 2–3 циклов их деления, контролируемых ауксинами (Rebilas, Rebilas, 2008). Иначе говоря, для репрограммирования каллусной клетки необходимо несколько циклов репликации ДНК, как это показано на примере зародышевого каллуса масличной пальмы (Jaligot et al., 2000). В целом, вопрос репрограммирования клеток каллуса решается в контексте общей проблемы изменчивости генома в процессе дедифференциации и каллусообразования *in vitro* (по: Sugiyama, 2015).

Индукция конкретного типа органогенеза *in vitro* в пыльниковых и зародышевых каллусах злаков во многом детерминирована как генотипом донорной особи и физиологическим статусом экспланта, так и условиями культивирования, главным образом, оптимальным балансом эндогенных и экзогенных фитогормонов (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдмирова, 2010, 2011, 2013; Huang et al., 2012; Hisano et al., 2016). Однако морфогенетические потенциалы клеток каллуса могут меняться в зависимости от характера связей между группами клеток в каллусе, что, в

свою очередь, обусловлено формой и размером (критической массой) каллуса (Батыгина, 1987; Батыгина и др., 2010) и иными факторами. В результате даже соблюдение баланса экзогенных и эндогенных фитогормонов не всегда приводит к формированию органов в каллусе. Перспективные направления в этой области исследования, на наш взгляд, — экспериментальная регуляция активности генов на различных этапах формирования органов в каллусах злаков *in vitro*, как это показано на примере арабидопсиса (Che et al., 2006; Tuagi et al., 2010), а также изучение пространственно-временной ко-экспрессии генов во время формообразовательных процессов в каллусах (в работе Kurdyukov et al., 2014 такой подход продемонстрирован на примере раннего эмбриогенеза люцерны).

Еще один выявленный фактор, влияющий на становление типов органогенеза *in vitro* в каллусах, — биохимический, а именно метаболизм углеводов. Установлено, что уровень метаболизма сахарозы играет важную роль в эффективности геммогенеза в зародышевых каллусах риса, будучи связанным с сигналингом эндогенных гормонов, что, в свою очередь, служит триггером последующего органогенеза *de novo* (Lee, Huang, 2013).

В регуляции морфогенеза растений как *in vivo*, так и *in vitro* важная роль принадлежит выполняющим функции сигнальных молекул арабиногалактановым белкам (АГБ), вовлеченным в межклеточные взаимодействия и дифференцировку клеток (Ellis et al., 2010). Методами иммуногистохимии эпитопы АГБ, связанные с синтезом поверхностной сети внеклеточного матрикса (ПСВМ), обнаружены именно в поверхностной меристематической зоне пыльниковых каллусов пшеницы и зачатках апексов побегов, формирующихся на поверхности такой меристематической зоны (Konieczny et al., 2007). Авторами сделан вывод о том, что ПСВМ участвует в интеграции и распознавании каллусных клеток на ранних стадиях дифференциации органов, а формирование каллусами ПСВМ рассматривается как общий признак регенерационной способности каллусов.

Важен вопрос о клеточных и тканевых механизмах действия эндогенных фитогормонов в процессе органогенеза *in vitro* в каллусах. Механизмы влияния гормонов на морфогенез растений нельзя понять не располагая информацией о содержании и распределении гормонов в клетках. Один из наиболее распространенных способов оценки содержания гормонов в клетках базируется на использовании искусственных конструкций, в которых репортерный ген ставится под контроль промотора, чувствительного к тому или иному гормону. У растений (как правило, представителей двудольных), трансформированных с помощью такой конструкции, искомые гормоны активируют экспрессию

трансгенов, кодирующих или белки ферменты, или флюоресцирующие белки, присутствие которых в клетках можно обнаружить визуально. Такой подход позволил выявить распределение и взаимодействие эндогенных цитокининов и ауксинов в клетках каллусов арабидопсиса в процессе органогенеза (Cheng et al. 2013). Однако использование этого подхода для каллусов злаков ограничено из-за сложности трансформации однодольных растений. Альтернативой использования репортерных конструкций для оценки уровня гормонов в клетках является применение иммуногистохимического метода с использованием специфических антител к ауксинам и цитокининам. Так, сопоставление данных по иммуногистохимии эндогенных цитокининов и ауксинов в клетках зародышевых каллусов пшеницы с результатами их гистологического анализа показало, что гормоны локализуются преимущественно в клетках активно развивающихся морфогенетических очагов (Seldimirova et al., 2016), по-видимому, участвуя в создании позиционных сигналов для возникновения органов в определенных клеточных “нишах” каллусов.

Заметим, что концепция позиционной информации при морфогенезе (Wolpert, 1969) воспринимается неоднозначно, вплоть до оценки ее как формальной, редуционно-механистической (по: Jaeger et al., 2008). По-видимому, этот вопрос следует отнести к категории дискуссионных. Однако несомненно, на наш взгляд, положительная роль данной концепции в попытках понять пространственно-временную организацию морфогенеза (по: Чуб, 2010), т.е. вопроса о том, из каких именно клеток/групп клеток, в каком месте и в какой конкретно форме образуется тот или иной орган в системе целостного организма, тем более что пути морфогенеза как в экспериментах *in situ* и *in vitro*, так и при развитии *in vivo* могут варьировать.

В результате многочисленных исследований выявлено, что к формированию регенерантов из пыльниковых и зародышевых каллусов злаков приводит гемморизогенез, в ряде случаев — геммогенез после фитогормонального индуцирования ризогенеза в том же самом каллусе, тогда как ризогенез представляет собой “тупик” морфогенеза (Круглова и др., 2005; Круглова, Катасонова, 2009; Батыгина и др., 2010; Segui-Simarro, 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011, 2013; Slesak et al., 2013; Merks, Guravage, 2013 и др.).

Рассмотрим подробнее структурные особенности такого типа органогенеза *in vitro*, как гемморизогенез. Детальными гистологическими исследованиями пыльниковых и зародышевых каллусов пшеницы установлено, что процесс складывается из двух этапов: сначала вблизи поверхности каллуса экзогенно формируется почка, затем в толще каллуса эндогенно — корни (Круглова и др., 2005;

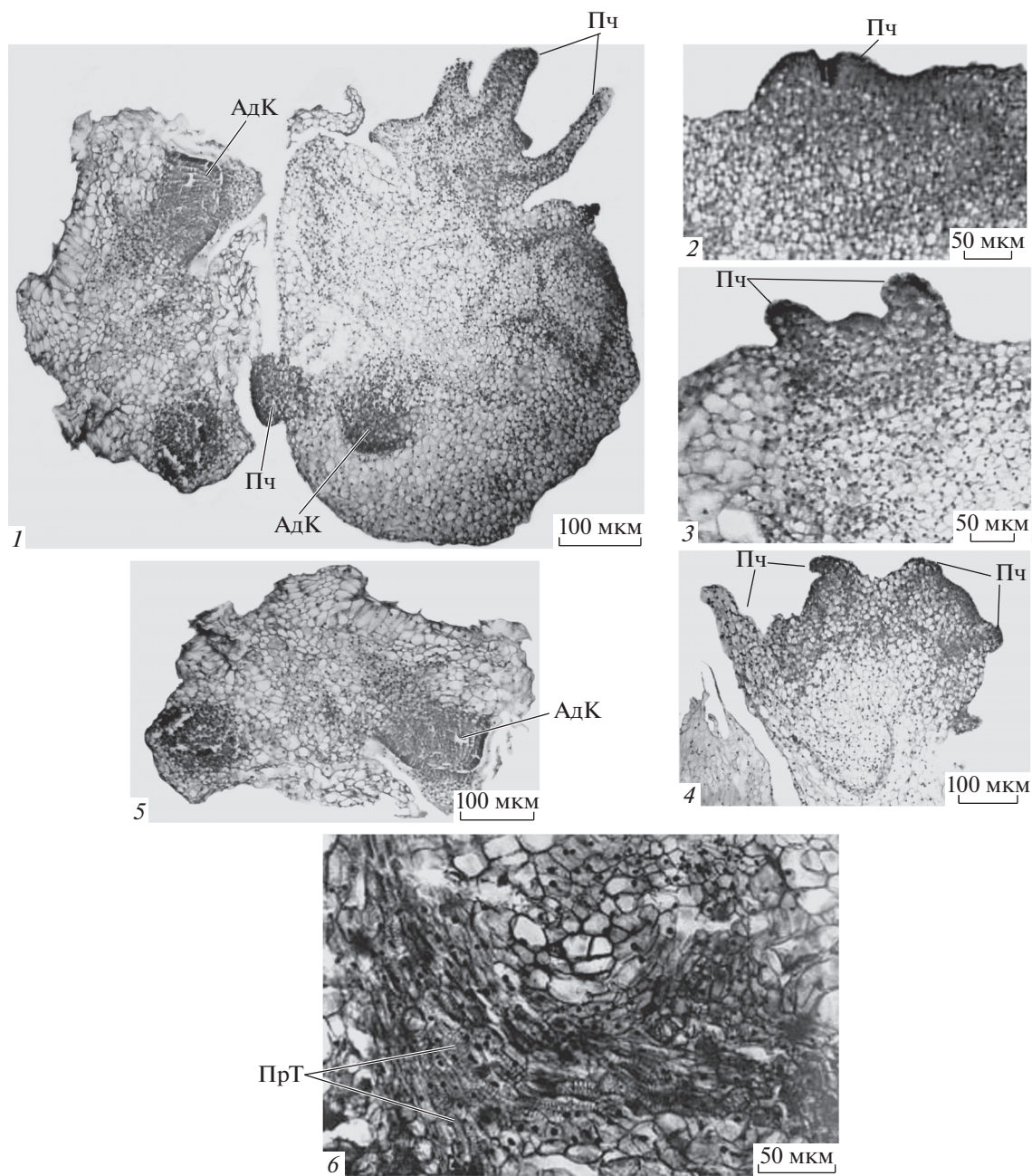


Рис. 3. Последовательные стадии гемморизогенеза *in vitro* в пыльниковом каллусе пшеницы на регенерационной среде *in vitro* (световая микроскопия). Условные обозначения: АдК – адвентивный корень, ПрТ – проводящая ткань, Пч – почка. Пояснения в тексте. По: Батыгина и др., 2010.

Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011; Сельдимирова, Круглова, 2013). Первоочередное по сравнению с корнями формирование почки при гемморизогенезе *in vitro* отмечено при изучении каллусов различного происхождения, полученных не только из клеток пыльника и зародыша.

Последовательное прохождение гемморизогенеза *in vitro* в пыльниковом каллусе пшеницы приведено на рис. 3.

Гемморизогенез начинается с заложения на поверхности каллуса меристематических очагов, деятельность клеток которых приводит к образованию апексов побегов с зачатками листьев, т.е. почек (рис. 3, 1–4). Заложение апексов корней происходит позднее, как правило, в базальной и средней части каллуса (рис. 3, 1, 5), по-видимому, независимо от заложения почек. По мере развития почек и корней между ними постепенно уста-

навливается связь путем формирования в толще каллуса элементов проводящей ткани (рис. 3, б).

Следует отметить, что в западной литературе термин “гемморизогенез *in vitro*” не применяется (возможно, потому, что при истинном гемморизогенезе корень инициируется в основании почки непосредственно), а исследователи сообщают об образовании в каллусе побегов и корней *de novo* (Elhiti, Stasolla, 2011; Ikeuchi et al., 2013; Delporte et al., 2014 и др.). Как бы то ни было, подчеркнем, что сформировавшиеся в каллусе *in vitro* почки и корни имеют типичное для злаков строение.

Иммуногистохимическими методами выявлено, что эндогенные гормоны — цитокинины и ауксины — локализируются преимущественно в клетках апексов формирующихся в зародышевых каллусах пшеницы почек и корней (Seldimirova et al., 2016). Как и в случае морфогенетических очагов в каллусе, это можно расценивать как проявление позиционной информации.

Хорошо развитые почки, объединенные с корнями элементами сосудистой системы в единое целое, названы гемморизогенными структурами (Круглова, Сельдимирова, 2011).

Независимо от типа каллуса (пыльниковый или зародышевый), гемморизогенные структуры в оптимальных условиях *in vitro* и *ex vitro* формируют проростки обычного для злаков строения (Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011; Seldimirova et al., 2016 и др.). Формирование нормальных проростков из гемморизогенных структур можно рассматривать как проявление системы надежности онтогенеза с поливариантностью решения задач (Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015). В результате гемморизогенеза *in vitro* формируется новая полноценная особь, что позволило выделить гемморизогению как отдельную категорию вегетативного размножения растений (Батыгина, 2000, 2014).

Таким образом, в результате анализа литературных и оригинальных данных по генезису пыльниковых и зародышевых каллусов злаков в условиях *in vitro* и на основании выявленных гистологических особенностей каллусогенеза нами предложено выделение в этом процессе нескольких критических стадий развития. Первая стадия — инициальные клетки каллуса (сильно-вакуолизированная микроспора незрелого пыльника/клетки заложившихся органов незрелого зародыша), вторая стадия — возникновение из исходно однородных клеток каллуса морфогенетического очага, третья стадия — формирование в каллусе поверхностной меристематической зоны, четвертая стадия — морфогенный каллус, способный к реализации различных путей морфогенеза *in vitro* (в ходе первых трех критических стадий возможно переключение программ развития каллусных клеток на альтернативные пути).

Известно, что благодаря эволюционно обусловленной способности растений к регенерации, в условиях культивирования *in vitro* проявляется значительно более широкий круг их морфогенетических потенций, чем в природных условиях *in vivo*. В зависимости от соотношения внутренних и внешних факторов, определяющих начальные условия, в ходе культивирования возможна реализация различных морфогенетических сценариев (Носов, 1999; Круглова и др., 2005; Журавлев, Омелько, 2008; Батыгина и др., 2010; Batygina, 2011, 2012; Wang et al., 2011; Merks, Guravage, 2013; Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015 и др.), что порождает трудности исследования морфогенеза растений *in vitro*. Можно полагать, что именно гистологические данные и выделенные на основе теории критических периодов Т.Б. Батыгиной критические стадии каллусогенеза могут послужить базой для дальнейших физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований каллусов как моделей морфогенеза *in vitro*. В частности, использование предложенного нами подхода к изучению каллусов может оказаться перспективным при исследовании важнейшего свойства морфогенеза растений *in vitro* — плюри- и тотипотентности клеток как проявления надежности их развития *in vitro* посредством “включения” не востребуемых *in vivo* программ морфогенеза, а также в регуляции различных морфогенетических сценариев в нужном экспериментатору направлении.

Эти проблемы особенно интересно решать именно на примере злаков, относящихся к группе трудно регенерирующих из каллуса *in vitro* растений. Причину таких трудностей следует искать, по-видимому, в контексте общей проблемы изменчивости генома растений в процессе каллусообразования *in vitro* (по: Кунах, 1999; Лутова и др., 2010; Дубровная, Бавол, 2011; Ikeuchi et al., 2013, 2015 и др.). Действительно, индукция каллусообразования предполагает перепрограммирование генома и его возврат в состояние, характерное для пролиферирующих клеток, т.е. “ювенилизацию” генома. Поэтому, исходя из общепринятых эволюционных терминов, каллусогенез относится к регрессивным путям развития клеток. Не все виды растений и не все типы их клеток способны к регрессивной эволюции. У злаков, считающихся эволюционно продвинутой группой однодольных, способность к “ювенилизации” генома выражена слабо (по: Кунах, 1999), и индукция каллусообразования *in vitro*, вероятно, возможно лишь из клеток онтогенетически молодых органов (в рассмотренных нами случаях это незрелые пыльники и незрелые зародыши. — *Авт.*). Еще труднее у злаков индуцируются органогенез и регенерация растений в каллусах *in vitro*. По-видимому, это связано именно с отсутствием генетической детерминации процессов “ювенилизации” генома у злаков, что в условия *in vitro* не

всегда способствует полной реализации тотипотентности. В этом ключе изучение различных аспектов каллусогенеза *in vitro* на клеточном и тканевом уровнях с использованием в качестве модельных систем каллусов злаков, выявление связей локальных и интегральных событий в создании пространственной организации и смены пространственных паттернов во времени представляются особенно актуальными при разработке фундаментальных и прикладных аспектов морфогенеза и онтогенеза.

Авторы искренне благодарны своему учителю — члену-корреспонденту РАН Татьяне Борисовне Батыгиной (1927–2015), внесшей значительный вклад в решение проблем биологии развития растений, в том числе морфогенеза в условиях *in vitro*.

Работа выполнена в рамках программы Президента РФ “Ведущие научные школы РФ” (проект НШ-5282.2014.4, лидер — Т.Б. Батыгина), а также тем государственных заданий № АААА-А18-118022190099-6 и № 01201255606.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф.* Эпигенетическая изменчивость у растений: наследуемость, адаптивность, эволюционное значение // Физиол. раст. 2016. Т. 63. № 2. С. 191–204.
- Барлоу П.У.* Деление клеток в меристемах и значение этого процесса для органогенеза и формообразования у растений // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 5. С. 5–27.
- Батыгина Т.Б.* Хлебное зерно: атлас. Л.: Наука, 1987. 103 с.
- Батыгина Т.Б.* Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Батыгина Т.Б.* Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 35–39.
- Батыгина Т.Б.* Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б.* Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбриогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. 1978. Т. 63. № 1. С. 87–111.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др.* От микроспоры — к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Батыгина Т.Б., Осадчий Я.В.* Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур // Успехи совр. биол. 2015. Т. 135. № 4. С. 337–345.
- Батыгина Т.Б., Рудский И.В.* Роль ствольных клеток в морфогенезе растений // ДАН. 2006. Т. 410. № 5. С. 1–3.
- Белоусов Л.В.* Биологический морфогенез. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. 338 с.
- Белоусов Л.В.* О возникновении новизны в эволюции и онтогенезе // Журн. общ. биол. 1990. Т. 51. № 1. С. 107–115.
- Берталанфи Л.* Общая теория систем — критический обзор // Исследования по общей теории систем. М.: Прогресс, 1969. С. 23–82.
- Бишимбаева Н.К.* Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков: Автореф. ... д-ра биол. наук. Алматы, 2007. 37 с.
- Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
- Бутенко Р.Г.* Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. Пушкино: Пушкинский НЦ, 1994. С. 7–26.
- Быкова Е.А., Чергинцев Д.А., Власова Т.А., Чуб В.В.* Влияние ингибитора полярного транспорта ауксина на морфогенез листа и генеративных структур при фасциации у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 4. С. 235–243.
- Быстрова Е.И., Жуковская Н.В., Ракутин В.Ю., Иванов В.Б.* Роль этилена в активации деления клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 2. С. 82–86.
- Гилберт С.* Биология развития. Т. 3. М.: Мир, 1995. 352 с.
- Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н.* Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Изв. РАН. Серия биол. 2001. № 1. С. 31–36.
- Додуева И.Е., Творогова В.Е., Азарахи М. и др.* Ствольные клетки растений: единство и многообразие // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 4. С. 441–458.
- Дубровная О.В., Бавол А.В.* Изменчивость генома пшеницы в культуре *in vitro* // Цитология и генетика. 2011. Т. 45. № 5. С. 76–84.
- Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. и др.* Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 2. С. 306–311.
- Ежова Т.А.* Генетический контроль морфогенеза и устойчивости растений к стрессовым факторам: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2003. 48 с.
- Ермаков И.П., Матвеева Н.П.* Диморфизм пыльцы и андрогенез в культуре пыльников и микроспор // Вестник Моск. ун-та. Серия 16: Биология. 1986. № 3. С. 28–40.
- Журавлев Ю.Н., Омелько А.М.* Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. 2008. Т. 55. № 5. С. 643–664.
- Иванов В.Б.* Проблема ствольных клеток у растений // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 4. С. 253–261.
- Иванов В.Б.* Ствольные клетки в корне и проблема ствольных клеток у растений // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 406–419.
- Иванов В.Б.* Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с.
- Исаева В.В.* Клетки в морфогенезе. М.: Наука, 1994. 224 с.
- Исаева В.В.* Самоорганизация биологических систем // Изв. РАН. Серия биол. 2012. № 2. С. 144–153.

- Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. 264 с.
- Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. ... д-ра биол. наук. СПб., 2002. 48 с.
- Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимского научн. центра РАН. 2012. № 2. С. 21–24.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Стресс как фактор индукции андроклинии у злаков. Компетентный объект стрессового воздействия // Успехи соврем. биол. 2001. Т. 121. № 1. С. 67–78.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.
- Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н. и др. Андрогенные эмбриониды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Изв. РАН. Серия биол. 2001. № 2. С. 191–197.
- Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. и биохим. культ. раст. 2009. Т. 41. № 2. С. 124–131.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинических каллусах злаков: цито-гистологические особенности // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130. № 3. С. 247–257.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинического каллуса пшеницы // Физиол. раст. и генетика. 2013. Т. 45. № 5. С. 382–389.
- Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дифференцировки и каллусообразования // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 919–929.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений / Под ред. Инге-Вечтомова С.Г. СПб.: Издательство Н-Л, 2010. 432 с.
- Марченко А.О. Реализация морфогенетического потенциала растительных организмов // Успехи соврем. биол. 1996. Т. 116. Вып. 3. С. 306–319.
- Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 543–556.
- Медведев С.С. Системная биология растений // Материалы V междунар. школы для молодых ученых, посв. памяти Т.Б. Батыгиной. СПб., 2016. С. 130.
- 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.
- Мирошниченко Д.Н., Соколов Р.Н., Аликина О.В. и др. Скрининг регенерационного потенциала ди-, тетра- и гексаплоидных сортов и видов пшеницы в культуре *in vitro* // Биотехнология. 2014. № 1. С. 38–51.
- Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии. М.; Л.: АН СССР, 1960. С. 263–285.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфимского РАН. 2017а. № 3(1). С. 114–118.
- Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. 2011. Т. 43. № 4. С. 297–306.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 565–573.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Андроклинический эмбриогенез *in vitro* у злаков // Успехи соврем. биол. 2014. Т. 134. № 5. С. 476–487.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклинических каллусах пшеницы *in vitro* // Изв. Уфимского РАН. 2015. № 1. С. 33–39.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е. и др. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспоральных эмбрионидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // Онтогенез. 2017 б. Т. 48. № 3. С. 220–233.
- Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Изв. РАН. Серия биол. 2016. № 2. С. 155–161.
- Синнот Э. Морфогенез растений. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. 603 с.
- Спивак В.А., Минликаева К.И., Евсеева Н.В. и др. Особенности морфогенеза структурных элементов незрелых зародышей линий пшеницы, культивируемых *in vitro* // Бюлл. Бот. сада Саратовского ун-та. 2014. Вып. 12. С. 188–197.
- Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. и др. Феномен “сиамских зародышей” у злаков *in vivo* и *in vitro*: ключевая полиэмбриония и фасциации // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 3. С. 152–169.
- Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. М.: Мир, 1964. 259 с.
- Урманцев Ю.А. Системный подход к проблеме устойчивости растений // Физиол. раст. 1979. Т. 26. № 4. С. 762–777.
- Чуб В.В. Роль позиционной информации в регуляции развития органов цветка и листовых серий побегов. М.: Бином, 2010. 263 с.
- Чуб В.В., Синюшин А.А. Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 574–590.
- Batygina T.V. Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 2005. V. 47. № 1. P. 51–60.

- Batygina T.B.* Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants // *Stem Cell Res. J.* 2011. V. 3. № 1–2. P. 45–120.
- Batygina T.B.* Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // *Intern. J. Plant Reprod. Biol.* 2012. V. 4. № 2. P. 107–120.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2003. V. 45. № 1. P. 27–36.
- 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. № 5. P. 545–554.
- Chaum 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.
- Che P., Lall S., Nettleton D., Howell S.H.* Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. № 2. P. 620–637.
- 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. № 1. P. 240–251.
- Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L. et al.* The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress // *J. Exp. Biol.* 2014. V. 217. P. 67–75.
- De Almeida W.A.B., de Mourao F.F., Mendes B.M.J. et al.* Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis* // *Biol. Plantarum.* 2006. V. 50. № 3. P. 321–325.
- 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. № 6. P. 1455–1470.
- Doubled Haploidy in Model and Recalcitrant Species / Ed. Segui-Simarro J.M. Lausanne: Frontiers Media, 2016. 119 p.
- 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.
- Ellis M., Egelund J., Schultz C.J., Bacic A.* Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. № 2. P. 403–419.
- Ebrahimie E., Naghavi M.R., Hosseinzadeh A. et al.* Induction and comparison of different *in vitro* morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material // *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 2007. V. 90. № 3. P. 293–311.
- Gutierrez R.A., Shasha D.E., Coruzzi G.M.* Systems biology for the virtual plant // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 550–554.
- Hisano H., Matsuura T., Mori I.C. et al.* Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // *Plant Physiol. and Biochem.* 2016. V. 99. P. 66–72.
- 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. № 2. P. 257–263.
- Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A.* Plant callus: mechanisms of induction and repression // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3159–3173.
- Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K.* Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // *Current Opinion in Plant Biology.* 2015. V. 28. P. 60–67.
- Jaeger J., Irons D., Monk N.* Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information // *Development.* 2008. V. 135. № 19. P. 3175–3183.
- Jaligot E., Rival A., Beule T. et al.* Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 684–690.
- Konieczny R., Swierczynska J., Czaplicki A.Z., Bohdanowicz J.* Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. № 3. P. 355–363.
- Kumar V.* Systems biology approaches towards the prediction of prospective novel plant system-derived products or services // *Biol. Syst. Open Access.* 2013. V. 2. № 4. P. 119. doi 10.4172/2329-6577.1000119
- Kurdyukov S., Song Y., Sheahan M.B. et al.* Transcriptional regulation of early embryo development in the model legume *Medicago truncatula* // *Plant Cell Rep.* 2014. V. 33. № 2. P. 349–362.
- 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. № 5. <http://www.as-botanicals-tudies.com/content/54/1/5>.
- Marzec M., Kurczynska E.* Importance of symplasmic communication in cell differentiation // *Plant Signaling & Behavior.* 2014. 9: e 27931. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.27931>.
- Meristematic Tissues in Plant Growth and Development / Eds. McManus M.T., Veit B. Sheffield: Sheffield Acad. Press, 2002. 301 p.
- Merks R.M.H., Guravage M.A.* Building Simulation Models of Developing Plant Organs // Ed. De Smet I. *Plant Organogenesis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, V. 959. New York: Springer Science + Business Media, 2013. P. 333–352.
- 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. № 1. Suppl. P. 69–77.
- Narciso J.O., Hattori K.* Genotypic differences in morphology and ultrastructures of callus derived from selected rice varieties // *Philippine Sci. Lett.* 2010. V. 3. № 1. P. 59–65.
- Oliveira E.J., Koehler A.D., Rocha D.I. et al.* Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon* // *Protoplasma.* 2017. V. 254. № 5. P. 2017–2034.

- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A. et al. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2013. V. 112. № 3. P. 353–360.
- Patwari P., Lee R.T. Mechanical control of tissue morphogenesis // Circulation Research. 2008. V. 103. № 3. P. 234–243.
- Rebilas K., Rebilas A. Auxin concentration control of the average DNA content in cells of *in vitro* cultures: a theoretical model and comparison to experimental data for *Allium cepa* and *Allium sativum* // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 2008. V. 95. № 1. P. 89–99.
- Savona M., Mattioli R., Nigro S. et al. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 1. P. 471–488.
- Segui-Simarro J.M. Androgenesis Revisited // Bot. Rev. 2010. V. 76. P. 377–404.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. 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. № 3. P. 251–264.
- Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. et al. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. № 1. P. 30–37.
- Sugiyama M. Historical review of research on plant cell de-differentiation // J. Plant Research. 2015. V. 128. № 5. P. 349–359.
- Sun L., Wu Y., Zou H. et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2013. V. 113. P. 103–119.
- Tyagi N., Dahleen L.S., Bregitzer P. Candidate genes within tissue culture regeneration QTL revisited with a linkage map based on transcript-derived markers // Crop Sci. 2010. V. 50. № 5. P. 1697–1707.
- Wang X., Nolan K.E., Irwanto R.R. et al. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells // Ann. Bot. 2011. V. 107. P. 599–609.
- Wendrich J.R., Moller B.K., Uddin B. et al. A set of domain-specific markers in the *Arabidopsis* embryo // Plant Reprod. 2015. V. 28. P. 153–160.
- Wolfe N.W., Clark N.L. ERC analysis: web-based inference of gene function *via* evolutionary rate covariation // Bioinformatics. 2015. V. 31. № 23. P. 3835–3837.
- Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation // J. Theor. Biol. 1969. V. 25. № 1. P. 1–47.
- Zur I., Dubas E., Krzewska M. et al. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis // Doubled haploidy in model and recalcitrant species. Front. Plant Sci., 2016. P. 110–109.
- Zuraida A.R., Naziah B., Zamri Z. et al. Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR 219 and 232 *via* somatic embryogenesis system // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 1913–1921.

Callusogenesis as an In Vitro Morphogenesis Pathway in Cereals

N. N. Kruglova^{1, *}, G. E. Titova^{2, 3}, and O. A. Seldimirova¹

¹Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

²Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia

³St. Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Received November 10, 2017; in final form, April 23, 2018

Callus is an integrated system formed both exogenously (as a result of proliferation of surface cells of different plant tissues) and endogenously (deep in tissues). Initially, callus consists of homogeneous cells gradually transforming into a system of groups of heterogeneous cells with species-specific morphogenetic potencies, which are realized via various pathways of morphogenesis. In this review, issues associated with studying the formation of calli in *in vitro* cultures of immature anthers and embryos of cultivated cereals are analyzed. Distinguishing the critical stages of callusogenesis is proposed. The features of hemmorhizogenesis *in vitro* as a type of organogenesis in calli are considered. The concept of the versatility of the processes of plant morphogenesis *in vivo*, *in situ*, and *in vitro* proposed by T.B. Batygina (1987, 1999, 2012, 2014) is confirmed. The prospects of the approach to calli as model systems for studying various problems of plant developmental biology are discussed.

Keywords: cultivated cereals, anther, embryo, callus, morphogenesis *in vitro*