ОНТОГЕНЕЗ, 2021, том 52, № 4, с. 237–253

ОБЗОРЫ

УДК 58.085:581.143.6:581.3

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ “ЗАРОДЫШ *IN VIVO* – КАЛЛУС *IN VITRO*” ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

© 2021 г. Н. Н. Круглова[a], *, Г. Е. Титова[b], О. А. Сельдимирова[a], А. Е. Зинатуллина[a]

[a]Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

[b]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 16.02.2021 г.
После доработки 05.03.2021 г.
Принята к публикации 09.03.2021 г.

Важнейшая проблема в исследовании каллусов растений *in vitro* – взаимоотношение эндогенных и экзогенных факторов, влияющих на формирование каллусов (“каллусообразование”) и их развитие на индукционной среде (“каллусогенез”). Особый интерес вызывает такой эндогенный фактор, как цитофизиологический статус эксплантов *in vivo* и каллусов в динамике культивирования *in vitro*. В обзоре на примере хлебных злаков проведен анализ литературных и собственных данных по выявлению гистологических и гормональных особенностей инициальных клеток каллусов в эксплантах – незрелых зародышах *in vivo*, а также формирующихся из них морфогенных каллусов в ходе развития *in vitro*. Рассмотрены представленные в литературе ответы на некоторые дискуссионные вопросы, связанные с индуцированием морфогенетической компетентности и репрограммирования развития инициальных клеток каллусов. Проведенное сравнение каллусообразования и каллусогенеза *in vitro* с некоторыми аналогичными событиями *in vivo* подтверждает правомочность принципа универсальности процессов морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014 и ранее). Обсуждается перспективность использования единой (интегрированной) экспериментальной системы “зародыш *in vivo* – каллус *in vitro*” в качестве модели для изучения сложнейшего биологического феномена – морфогенеза растений.

Ключевые слова: зародыш *in vivo*, каллус *in vitro*, цитофизиология, морфогенез растений, хлебные злаки

DOI: 10.31857/S0475145021040042

ВВЕДЕНИЕ

Первые работы, посвященные получению каллуса из изолированных участков мезофилла листа и изучению каллусогенеза *in vitro*, появились еще в конце XIX–начале XX вв. (по: Ikeuchi et al., 2013; Sugiyama, 2015; Kruglova et al., 2018a), однако однозначной дефиниции этой структуры не предложено. Наиболее детальное определение приведено в работе Т.Б. Батыгиной (2014): 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, которые постепенно преобразуются в систему групп гетерогенных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза (добавим: при этом некоторые пути морфогенеза в условиях *in vitro* приводят к формированию полноценных растений-регенерантов. – *Авт.*).

Предприняты попытки разработать периодизацию формирования и развития каллусов *in vitro*. В этих взаимосвязанных процессах выделяют, например, критические стадии (Kruglova et al., 2018a), фазы индукции и экспрессии (Yu et al., 2019). В целом же этот вопрос остается открытым. По-видимому, можно говорить о формировании каллусов (“каллусообразование”) и усложнении их структуры (“каллусогенез”) на индукционной среде *in vitro* и о развитии групп клеток каллусов по различным путям морфогенеза на регенерационной среде *in vitro*.

Разнообразие каллусов, полученных на индукционных средах *in vitro,* сводится к двум контрастным группам: способные и не способные к морфогенезу на регенерационных средах *in vitro*, иначе говоря – морфогенные и неморфогенные (подробнее: Зинатуллина, 2020). Однако кроме термина “морфогенный” в литературе по отношению к образовавшимся каллусам используются также термины “органогенный”, “эмбриогенный”, “регенерационный (регенерационно спо-

собный)" каллус, хотя при этом фактически речь идет о каллусе, в котором только в дальнейшем будут отмечены пути морфогенеза *in vitro*, в том числе приводящие к формированию регенерантов. На наш взгляд, употребление терминов "органогенный", "эмбриогенный", "регенерационный" по отношению к морфогенным каллусам методически не совсем корректно, поэтому в данной статье мы будем применять только термин "морфогенный каллус" (далее – каллус, если не оговорено специально).

Способность к образованию каллусов *in vitro* отмечена у эксплантов представителей многих семейств растений. Большой практический интерес в этом отношении вызывают злаки – коммерчески ценная группа растений, у которых с трудом и формируются каллусы *in vitro*, и регенерируют из них растения *in vitro* и *ex vitro*. Вопросы каллусообразования из различных эксплантов злаков и каллусогенеза на индукционных/регенерационных средах *in vitro* проанализированы авторами ранее в обзорной работе (Kruglova et al., 2018a). Однако стремительный рост публикаций в области биотехнологических аспектов использования каллусов злаков заставляет еще раз обратиться к этим вопросам. Важно, на наш взгляд, дать более широкую оценку незрелых зародышей злаков *in vivo* как перспективных эксплантов для получения каллусов *in vitro*, обратив особое внимание на цитофизиологический статус этих эксплантов во время инокуляции на индукционную среду *in vitro*. Этот статус, сопряженный с морфогенетической компетентностью клеток зародыша, отражает взаимодействие структурных (цитогистологических) и функциональных (физиологических, главным образом гормональных) свойств эксплантов. Кроме того, важно с таких же цитофизиологических позиций дать оценку и сформировавшемуся каллусу в динамике развития на индукционной среде *in vitro*. Методологическим подходом авторов данного обзора служит базовый принцип универсальности процессов морфогенеза в растениях *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014).

Цель данной обзорной статьи, являющейся продолжением публикаций авторов по различным проблемам исследования каллусообразования и каллусогенеза растений *in vitro*, – провести анализ литературных и собственных данных по цитофизиологическим особенностям незрелых зародышей злаков как эксплантов для получения каллусов, а также рассмотреть цитофизиологические аспекты инициации формирования зародышевых каллусов на индукционной среде *in vitro*, в сравнении с некоторыми аналогичными событиями *in vivo*.

ИНИЦИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАЛЛУСОВ В НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШАХ ЗЛАКОВ

Проблема морфогенетической компетентности клеток эксплантов in vivo как инициальных клеток каллусов in vitro

Проблема компетентности клеток эксплантов к каллусообразованию *in vitro* была поставлена еще в самых ранних исследованиях этих процессов в работах Хаберландта, выдвинувшего гипотезу тотипотентности любой живой клетки (Haberlandt, 1902, по: Бутенко, 1999). Большое значение решению этой проблемы придается и в современных исследованиях, связанных с анализом различных аспектов регенерации растений в каллусных культурах *in vitro* (например, цикл обзорных работ Ikeuchi et al., 2013–2019).

К настоящему времени многочисленными исследованиями установлено, что в качестве эксплантов для получения каллусов возможно использование различных вегетативных, генеративных и эмбриональных структур. Клетки эксплантов в адекватных условиях *in vitro* проявляют компетентность к образованию не только разных типов тканей и органов (свойство плюрипотентности), но и нового организма за счет различных путей морфогенеза (свойство тотипотентности) (термины приведены по: Батыгина, 2014).

Успех в формировании каллусов определяется комплексом взаимосвязанных эндогенных и экзогенных факторов (обзоры: Ikeuchi et al., 2013; Gaillochet, Lohmann, 2015; Sugiyama, 2015; Kruglova et al., 2018a; Rocha et al., 2018; Feher, 2019; Зинатуллина, 2020 и др.). С позиции терминологии в области биологии развития растений (по: Медведев, Шарова, 2014) эндогенные факторы формирования каллусов можно расценивать как присутствие в эксплантах способных к восприятию индуктора таргетных морфогенетически компетентных клеток (которые можно определить как "инициальные клетки каллусов"), тогда как экзогенные факторы – как индуктор каллусообразования *in vitro* из таких клеток.

Принципиален вопрос: инициальные клетки уже обладают морфогенетической компетентностью в условиях *in vivo* или именно условия предварительного стресса *in situ* и/или культивирования *in vitro* (в зависимости от используемой методики) индуцируют приобретение инициальными клетками свойства такой компетентности?

Ряд исследователей полагают, что образование каллусов связано с функционированием *in vitro* уже существующих в экспланте *in vivo* клеток, обладающих определенными свойствами. Так, значительная роль статуса инициальных клеток в их компетентности к формированию каллусов продемонстрирована в цикле работ, посвященных культуре *in vitro* незрелых пыльников пшеницы. Установлено, что формирование каллусов при

этом происходит из таких клеток пыльников *in vivo*, как микроспоры (Батыгина и др., 2010), а способность микроспор к индукции образования каллусов определяется главным образом их нестабильным предмитотическим состоянием, структурными свойствами (меристематичностью), а в целом – их статусом стволовых клеток, согласно оригинальной концепции Т.Б. Батыгиной (Батыгина, 2014 и ранее).

Большинство же исследователей считают, что формирование каллуса – это результат индуцированного репрограммирования изначально "нормальных" клеток эксплантa в плюри-/тотипотентное состояние в условиях предварительной стрессовой обработки *in situ* или на начальном этапе культивирования *in vitro* (Ikeuchi et al., 2016, 2018, 2019; Feher, 2019; Li et al., 2019). В работе, посвященной обзору исследований генной регуляторной сети при регенерации растений, продемонстрирована роль ряда транскрипционных факторов в клеточном репрограммировании при образовании каллуса, предваряющем регенерацию (Ikeuchi et al., 2018). У некоторых мутантов *Arabidopsis* в условиях *in vivo* идентифицированы гены и транскрипционные факторы, участвующие в образовании каллуса *in vitro* (Cheng et al., 2015). Аналогичные результаты получены при индуцировании формирования каллуса из паренхимной ткани *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2018) и из проростков *Nicotiana* sp. (Li et al., 2019), при этом также выявлено участие систем ряда генов. Вопрос репрограммирования инициальных клеток каллуса решается и в контексте общей проблемы изменчивости генома растений в культуре *in vitro* (Ikeuchi et al., 2015; Pykalo, Dubrovna, 2018), и в связи с изменениями транскрипционных профилей этих клеток (Pasternak, Dudits, 2019). В инициальных клетках каллусов отмечены высокие уровни накопления микроРНК (Chu et al., 2016; Alejandri-Ramirez et al., 2018; Juarez-Gonzalez et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019) – ключевых регуляторов проявления тотипотентности клеток растений и дифференциации их развития (Singh et al., 2018).

Безусловно, морфогенетически компетентные клетки эксплантов способны воспринимать воздействие сигнала индуктора к приобретению плюри-/тотипотентности благодаря соответствующему модифицированному состоянию хроматина (Maury et al., 2019), которое ассоциируется с отдельными программами экспрессии генов (Ojolo et al., 2018; Hajheidari et al., 2019). На примере инициальных клеток каллуса это направление исследований, однако, не представлено в доступной литературе, хотя важная роль модификаций хроматина продемонстрирована для различных растений в индукции такого пути морфогенеза *in vitro*, как соматический эмбриогенез (Duarte-Ake et al., 2019; Mendez-Hernandez et al., 2019).

Чрезвычайно важным является вопрос о дедифференциации специализированных инициальных клеток эксплантa – их переходу к пролиферации при формировании каллуса *in vitro*. Еще Скуг и Миллер (Skoog, Miller, 1957) высказывали мнение, что понятие "дедифференциация клеток" теснейшим образом связано с понятием "каллусообразование"; более того, сама структура была названа "каллусом" из-за сходства с мозолью (лат. callus – мозоль) – неорганизованно растущей массой дедифференцированных клеток. Каллус с этих позиций традиционно рассматривается как пролиферирующая масса дедифференцированных клеток (Бутенко, 1999; Wang et al., 2011; Motte et al., 2014; Gaillochet, Lohmann, 2015; Iwase et al., 2015; Raizada et al., 2017; Lopez-Ruiz et al., 2019; Popielarska-Konieczna et al., 2020). Заметим, что о важности дедифференциации сообщается и в работах по сигналингу в клетках эксплантов соматического эмбриогенеза *in vitro* (Mendez-Hernandez et al., 2019). Высказано, однако, мнение о том, что дедифференциация в строгом смысле является реверсией дифференциации, поэтому образование каллуса – это результат трансдифференциации клеток, приводящей к повышению потенции развития и/или пролиферации клеток (Sugimoto et al., 2011). В качестве альтернативы термину "дедифференциация" предложен удачный, на наш взгляд, термин "клеточное перепрограммирование" (Ikeuchi et al., 2018). В целом, несмотря на длительную историю изучения, вопрос о дедифференциации клеток до настоящего времени также остается дискуссионным (подробно этот вопрос и используемая терминология проанализированы в работе: Feher, 2019).

Следует подчеркнуть, что далеко не каждая клетка эксплантa, даже обладающая *in vivo* свойствами плюри- и тотипотентности, станет инициальной и даст начало каллусу *in vitro*. Высказано мнение, что к известной мере непредсказуемости морфогенеза (при любом пути, не только при каллусогенезе. – *Авт.*) инициальной клетки в условиях *in vitro*, в отличие от вполне предсказуемого морфогенеза зиготы в условиях *in vivo*, приводят эпигенетический характер ее компетентности, "неподходящая" фаза клеточного цикла, при которой хроматин не способен к восприятию сигнала-индуктора, а также низкий уровень специфичности самого сигнала-индуктора (Журавлев, Омелько, 2008). С этим мнением следует согласиться.

В целом, вопрос о морфогенетической компетентности и связанные с этим вопросы репрограммирования и дифференциации/дедифференциации инициальных клеток эксплантов *in vivo*, дающих начало каллусу *in vitro*, следует отнести к дискуссионным.

На примере представителей многих семейств растений, как покрытосеменных, так и голосеменных, установлено, что экспланты, формирующие каллус *in vitro,* должны находиться, как правило, на ранних стадиях развития. Так, данные о преимуществе в индукции каллусообразования эксплантов более ранних стадий развития получены при исследовании незрелых пыльников пшеницы (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Сельдимирова и др., 2016) и риса (Sahoo et al., 2019), семядолей *Arabidopsis* (Raizada et al., 2017), тканей "молодых" корней и надземных органов *Arabidopsis* (Sugimoto et al., 2010), "молодых" листьев *Boea hygrometrica* (Sun et al., 2019), а также апикальных меристем побегов многих растений. Эти результаты можно объяснить тем, что индукция образования каллуса предполагает репрограммирование инициальных клеток, к чему, по-видимому, более предрасположены клетки молодых органов. Такие клетки, возможно, способны к более легкому стимулированию дедифференциации в плюри-/тотипотентное состояние путем эпигенетической модификации ДНК и специфических факторов транскрипции.

Цитофизиологический статус незрелых зародышей злаков в стадии эмбриогенеза in vivo, оптимальной для индукции формирования каллусов in vitro

Незрелые зародыши злаков как перспективные экспланты для получения каллуса изучаются уже достаточно длительное время (Бутенко и др., 1986 и др.). Исследованиями, специально посвященными сравнительной оценке в индукции каллусообразования *in vitro* зрелых и незрелых зародышей пшеницы (Круглова, Катасонова, 2009; Dagustu, 2014; Бычкова и др., 2016; Круглова и др., 2019а) и кукурузы (Ali et al., 2014; Juarez-Gonzalez et al., 2019), показано, что при прочих равных условиях наибольшим каллусогенным потенциалом обладают именно незрелые зародыши.

Для выявления цитофизиологического статуса незрелых зародышей злаков, оптимальных для формирования каллусов *in vitro,* необходимо знать, на какой стадии эмбриогенеза они находятся.

Хорошо известно, что зиготический эмбриогенез растений *in vivo* представляет собой единый процесс, в результате которого из исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения. Зародыш развивается согласно определенным паттернам клеточных делений, а выявленные эмбриогенетические законы (закон происхождения, закон чисел, закон расположения, закон экономии) отражают сложность этого процесса (Эмбриология цветковых, 1997, 2000; Батыгина, 2014; De Vries, Weijers, 2017 и др.). В то же время, в своем морфогенезе зародыш проходит ряд взаимосвязанных стадий (в терминологии различных авторов, периодов, фаз, этапов), различающихся как по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, так и значению для дальнейшего развития. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию морфогенетического потенциала зародыша и онтогенетической программы развития особи в целом, а зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов (Батыгина, 2014).

Выявление стадии развития незрелого зародыша злаков *in vivo*, оптимальной для получения каллуса *in vitro*, осложнено тем, что при биотехнологических исследованиях представителей этого семейства не используется единая унифицированная периодизация эмбриогенеза. Отсутствие такой периодизации во многом обусловлено особенностями как процесса эмбриогенеза, так и строения зрелого зародыша злаков. Своеобразный дорсовентральный способ развития зародыша начиная с зиготы, специфика органогенеза и уникальное строение высокодифференцированных органов зрелого зародыша дали основание выделить особый тип эмбриогенеза пшеницы – Graminad (Батыгина, 2014 и ранее). Правомочность выделения Graminad-типа эмбриогенеза подтверждается исследованиями эмбриогенеза различных видов злаков (по: Kruglova et al., 2020). Уникальность эмбриогенеза злаков усложняет выделение четких морфологических критериев стадий их развития. В практике культивирования *in vitro* незрелых зародышей злаков большинство авторов в качестве экспланта указывают "незрелый зародыш", без детализации.

Для решения этой проблемы предложена периодизация эмбриогенеза злаков, достаточно удобная в биотехнологической практике (Круглова, 2012). Автор на основании времени после искусственного опыления предлагает выделять в эмбриогенезе злаков этап недифференцированного зародыша (стадии: зигота, двуклеточный зародыш, четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш), этап морфологической дифференциации зародыша (стадии начала органогенеза, активного органогенеза, завершения органогенеза) и этап дифференцированного зародыша (стадии сформированного зародыша и зрелого зародыша).

Эта периодизация была использована при детальных сравнительных исследованиях формирования каллуса незрелыми зародышами многочисленной группы генотипов пшеницы. Инокулирование в условия культуры *in vitro* незрелых зародышей в выделенных стадиях эмбриогенеза выявило, что у всех изученных генотипов при прочих равных условиях (состав индукционной среды, физиче-

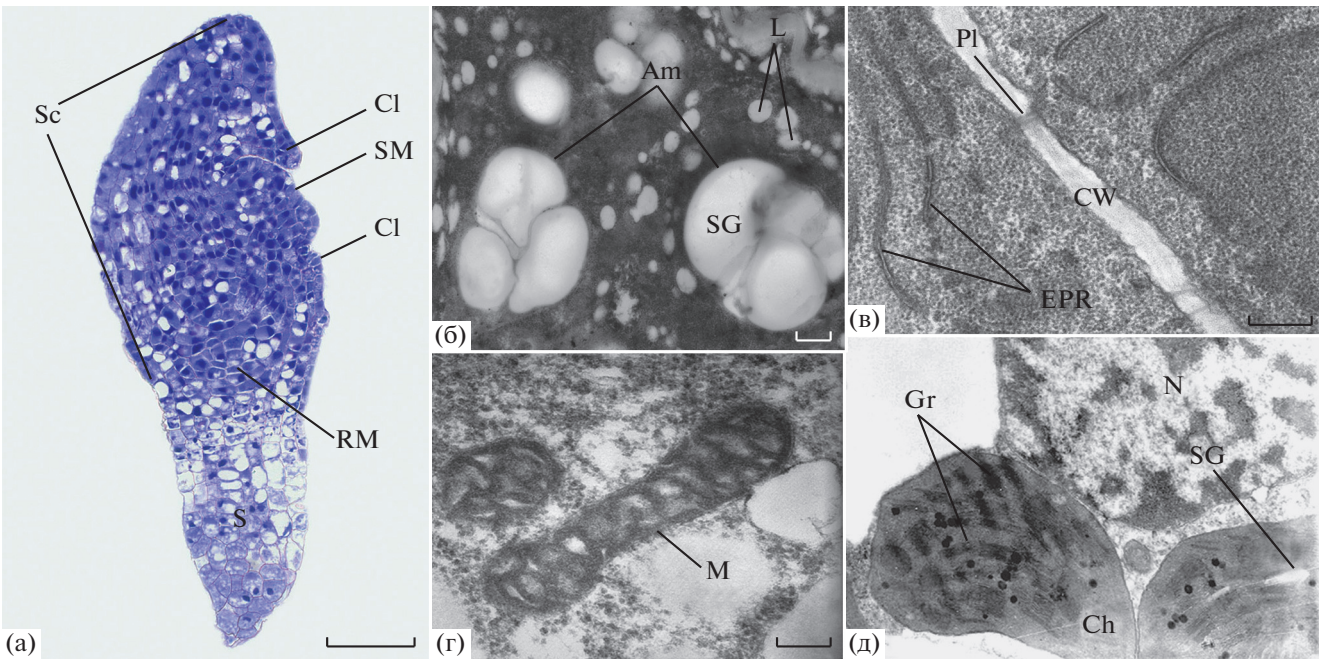

Рис. 1. Незрелый зародыш пшеницы в стадии активного органогенеза по данным световой (а) и трансмиссионной электронной (б–д) микроскопии. Условные обозначения: Am – амилопласт, Ch – хлоропласт, Cl – колеоптиль, CW – клеточная стенка, EPR – эндоплазматический ретикулюм, Gr – грана, L – липидная капля, M – митохондрия, N – ядро, Pl – плазмодесма, RM – меристема корня, S – суспензор, SG – крахмальное зерно, Sc – щиток, SM – меристема побега. Шкала: (а) – 100 мкм, (б) – 500 нм, (в) – 400 нм, (г, д) – 200 нм. (а–г) – ориг. данные; (д) – по: Seldimirova et al., 2017. Пояснения в тексте.

ские условия культивирования *in vitro* и др.) начало морфогенным каллусам давали 12–14-суточные зародыши, находившиеся *in vivo* в стадии активного органогенеза.

Гистологический анализ показал, что для таких зародышей характерно обособление зачатков органов (семядоля-щиток, побег), представленных активно делящимися меристематическими клетками. Важно подчеркнуть, что эти клетки покрыты тонкими оболочками (рис. 1а) (Seldimirova et al., 2017; Круглова и др., 2019а). Клетки характеризуются высокой метаболической активностью, что подтверждается их ультраструктурными показателями (рис. 1б–1д): значительным количеством свободных рибосом, амилопластов, единичных развитых хлоропластов, митохондрий с хорошо развитыми внутренними мембранами, активными комплексом Гольджи и гранулярным эндоплазматическим ретикулумом (Seldimirova et al., 2017).

В ряде работ приводятся сведения о немного иных временных интервалах, прошедших со времени опыления злаков, незрелые зародыши которых формировали каллусы *in vitro*. Так, у пшеницы этот интервал составлял 10–16 сут (Мирошниченко и др., 2014; Dagustu, 2014; Khlebova, Nikitina, 2016), кукурузы – 9–18 сут (Ali et al., 2014; Hong et al., 2017; Juarez-Gonzalez et al., 2019), ячменя – 14–16 сут (Чернов, Пендинен, 2011). Данные о статусе зародышей авторы не приводят, однако в этот интервал времени незрелые зародыши злаков также, по-видимому, находятся в стадии активного органогенеза, согласно периодизации (Круглова, 2012). Можно полагать, что и в этих случаях начало каллусам дают меристематические клетки зачатков органов зародыша. Такое сходство результатов может свидетельствовать об определенной универсальности стадии эмбриогенеза злаков (а именно – органогенез), во время которой зародыши компетентны к формированию каллуса *in vitro*.

Что касается конкретных органов незрелых зародышей, формирующих каллусы *in vitro*, то выявлено, что у пшеницы (Круглова, Сельдимирова, 2011; Мирошниченко и др., 2014; Seldimirova et al., 2016), кукурузы (Rakshit et al., 2010; Sun et al., 2013; Lowe et al., 2018; Lopez-Ruiz et al., 2019), ячменя (Slesak et al., 2013) каллусы берут начало от семядоли – щитка. Это хорошо отражено, например, на микрофотографиях, представленных в статье Лопез-Руиз с соавт. (Lopez-Ruiz et al., 2019), где приведены данные изучения области формирования каллуса из незрелого зародыша кукурузы методом сканирующей электронной микроскопии.

Сведений о других органах зародыша злаков, участвующих в образовании каллусов, в доступной литературе нами не обнаружено. По-видимо-

му, только определенные органы незрелого зародыша компетентны к каллусообразованию *in vitro*, по крайней мере у изученных в этом отношении злаков.

Гистологически выявлено, что каллусы формируются из клеток эпидермиса щитка незрелых зародышей злаков (подробнее см ниже). Такие наблюдения соответствуют сведениям об активной роли эпидермиса во время развития растений, как это показано, например, молекулярно-генетическими исследованиями этой ткани при формировании корней (Short et al., 2018) и побегов (Iida et al., 2019) *Arabidopsis* в условиях *in vivo*. Следует подчеркнуть, что клетки эпидермиса щитка незрелых зародышей злаков при соответствующих условиях *in vitro* способны к развитию и по пути формирования соматических зародышей, как это выявлено у кукурузы (Lowe et al., 2018).

Известно, что эпидермис щитка по своему генезису представляет собой протодерму, или эмбриодерму – покровную ткань зародыша, у большинства видов, в том числе злаков, формирующуюся на достаточно ранних стадиях эмбриогенеза, при этом стадия вычленения протодермы считается критической в развитии зародыша (Батыгина, 2014 и ранее). В контексте данной статьи особенно важны данные о высокой пролиферативной активности клеток протодермы *in vitro* (по: Андронова, 1997), а также сведения о клетках протодермы как инициальных клетках соматических зародышей злаков *in vitro* (Joshi, Kumar, 2013). Вполне возможно участие протодермы и в формировании каллусов *in vitro*, хотя такого рода сведения в доступной литературе отсутствуют.

Безусловно, важно охарактеризовать структуры, окружающие незрелый зародыш злаков. В условиях *in vivo* покрытые тонкой оболочкой клетки эпидермиса щитка незрелых зародышей граничат с эндоспермом – гетерогенной тканью, служащей не только источником питания зародыша, но, через гормональные сигнальные пути и посредство биохимических, транскрипционных и эпигенетических факторов, – одним из регуляторов развития зародыша в единой системе “зародыш–эндосперм” (Lafon-Placette, Kohler, 2014; Doll et al., 2017; Duarte-Ake et al., 2019). По-видимому, именно пограничное положение клеток эпидермиса щитка во многом способствует индуцированию в них каллусообразования *in vitro*. Неслучайно во многих биотехнологических протоколах для успешного получения каллуса рекомендуется размещать отделенные от эндосперма инокулируемые незрелые зародыши злаков на агаризованную среду именно щитком вниз, для их непосредственного контакта с веществами питательной среды, заменяющие эндосперм (главным образом, индукторами-гормонами, см. ниже), чему способствует проницаемость тонкой оболочки клеток эпидермиса. В то же время в контексте данной статьи важно подчеркнуть, что и клетки самого эндосперма могут служить источником формирования органогенного каллуса, как это показано для *Actinidia arguta* (Popielarska-Konieczna et al., 2020).

Все эти данные свидетельствуют о высоком морфогенетическом потенциале клеток не только определенных органов незрелых зародышей растений, но и окружающих их тканей.

Немаловажное значение, по-видимому, имеет и позиционное расположение инициальных клеток каллуса в системе клеток и тканей эксплантa. Концепция позиционной информации (Wolpert, 2016 и ранее) была предложена для понимания пространственно-временной организации морфогенеза в системе целостного организма. С данной концепцией тесно связана концепция таргетных клеток (Osborne, McManus, 2009), своим индивидуальным позиционным расположением через специфические белковые маркеры детерминированных распознавать специфический эндогенный или экзогенный сигнал к формированию органа (в контексте данного обзора – каллуса. – *Авт.*). Концепция позиционной информации, как и концепция таргетных клеток расценивается исследователями неоднозначно – от активного применения при анализе различных аспектов развития клеток, тканей и органов растений *in vivo*, *in vitro* и *de novo* (Чуб, 2010; Perilli et al., 2012; Chavez-Hernandez et al., 2015; Gaillochet et al., 2015; Janocha, Lohmann, 2018; Lopez-Ruiz et al., 2019), включая изучение влияния позиционно-зависимой регуляции генов на некоторые процессы морфогенеза (Iida et al., 2019), до их оценки как формальных, редукционно-механистических (Jaeger et al., 2008). Этот вопрос также следует отнести к категории дискуссионных. Однако положительной, на наш взгляд, была бы роль этих концепций в понимании того, в каком месте эксплантa и почему именно здесь находятся клетки, способные сформировать каллус.

Важно дать оценку эндогенным гормонам в незрелых зародышах злаков на оптимальной для индукции формирования каллусов стадии эмбриогенеза *in vivo*.

Хорошо известно, что в ходе зиготического эмбриогенеза растений *in vivo* постепенно формируется собственная многокомпонентная система гормонов, активно участвующих в регуляции всех процессов роста и развития зародышей. Основную роль в такой регуляции играют ключевые гормоны морфогенеза растений – ауксины, ускоряющие рост клеток, цитокинины, ускоряющие деления клеток, а также абсцизины, тормозящие оба процесса. Этот вопрос, как и связанный с ним вопрос генетического контроля гормональной регуляции развития зародыша, активно

изучается при анализе всех последовательных стадий эмбриогенеза двудольных, особенно – модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Творогова, Лутова, 2018; Radoeva et al., 2019; Smit et al., 2020; Tian et al., 2020). Стимулирующая роль эндогенных гормонов показана и при соматическом эмбриогенезе *in vitro* двудольных, например, *Arabidopsis* (Radoeva et al., 2020).

В отличие от двудольных, исследования роли гормонов и контролирующих их функционирование генов в эмбриогенезе злаков не так многочисленны, достаточно отрывочны и касаются главным образом выявления роли отдельных гормонов на отдельных стадиях развития зародышей (по: Kruglova et al., 2020). Основное внимание исследователи уделяют изучению участия гормонов в формировании покоя и прорастании зрелых зерновок злаков (Zhang et al., 2016; Czajkowska et al., 2019; Seldimirova et al., 2019a; Wang et al., 2019).

Как и у двудольных, у злаков выявлена зависимость формирования и развития зародышей от ауксинов и цитокининов преимущественно на начальных стадиях эмбриогенеза. Установлено, что эти гормоны присутствуют на ранних стадиях эмбриогенеза пшеницы (Hess et al., 2002; Fan et al., 2007; Сельдимирова и др., 2017), кукурузы (Forestan et al., 2010; Doll et al., 2017), риса (Zhao et al., 2019). На оптимальной для формирования каллуса стадии органогенеза выявлена иммуногистохимическая локализация ауксина ИУК в клетках апикальной части зародыша и развивающихся органов зародышей пшеницы (Сельдимирова и др., 2017) и ячменя (Сельдимирова и др., 2018б). Аналогичные данные по ауксинам получены при оценке гормонального статуса незрелых зародышей, дающих начало соматическому эмбриогенезу *in vitro* ряда злаков (Seldimirova et al., 2016, 2019b; Dziurka et al., 2019). Цитокинины также выявлены в начале эмбриогенеза, например, кукурузы (Chen et al., 2014) и ячменя (Сельдимирова и др., 2018б), а также в начале соматического эмбриогенеза *in vitro* пшеницы (Seldimirova et al., 2016; Галин и др., 2018). В целом, главенствующая роль ауксинов и цитокининов на ранних стадиях развития зародышей злаков, как зиготических *in vivo*, так и соматических *in vitro*, вполне объяснима, если учитывать активные морфогенетические процессы в таких зародышах.

Что касается АБК, то у злаков, как и двудольных, повышенное содержание этого гормона выявлено преимущественно в зародышах на поздних стадиях эмбриогенеза и в зрелых зерновках (Hess et al., 2002; Fan et al., 2007; An, Lin, 2011; Wu et al., 2011; Сельдимирова и др., 2018а). Иммуногистохимическими исследованиями подтверждено, что эндогенная АБК откладывается в клетках зародыша пшеницы (Сельдимирова и др., 2017) и ячменя (Сельдимирова и др., 2018а) уже в сформированных органах. Такие данные можно объяснить тем, что этот гормон предотвращает преждевременное прорастание семян (Miransaria, Smithc, 2014), а также 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 (Веселов и др., 2017). Высказано мнение (Сельдимирова и др., 2018а), что АБК в позднем эмбриогенезе злаков участвует в синтезе активных форм кислорода, разрыхляющих клетки колеоризы, тем самым способствуя прорастанию зародышевого корня/корней. В целом, полученные данные подтверждают важную роль АБК в созревании зародышей злаков и переходе семян к покою, однако, согласно проанализированным литературным данным, этот гормон не проявляет высокой активности в стадии органогенеза зародышей злаков.

Исследования генов, контролирующих гормональную регуляцию эмбриогенеза злаков, также не столь многочисленны и отрывочны в сравнении с аналогичными исследованиями двудольных. Так, у пшеницы (Zhao et al., 2014) и *Aegilops tauschii* (Zhao et al., 2015) изолированы и охарактеризованы гены семейства *WOX*, играющие роль координаторов транскрипции в ходе раннего эмбриогенеза этих злаков. В позднем эмбриогенезе риса выявлена индуцируемая АБК экспрессия гена *OSGH3-2* из семейства *GH3*, модулирующего уровни ауксинов и АБК (Du et al., 2012).

Таким образом, исследования цитофизиологического статуса незрелых зародышей злаков в стадии эмбриогенеза, оптимальной для инициации формирования каллусов на индукционной среде, в целом сравнительно немногочисленны. Однако такого рода исследования, безусловно, важны и перспективны, поскольку статус клеток зародыша как инициальных клеток каллуса играет важнейшую, если не определяющую, роль в инициации формирования каллусов злаков *in vitro*. Кроме того, дифференциация незрелых зародышей злаков служит показателем компетентности их клеток и к дальнейшей регенерации растений в каллусных культурах *in vitro*, как это показано для ячменя (Чернов, Пендинен, 2011), кукурузы (Ali et al., 2014), пшеницы (Dagustu, 2014).

ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСОВ ЗЛАКОВ НА ИНДУКЦИОННОЙ СРЕДЕ *IN VITRO* И ИХ ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС

Незрелые зародыши злаков в стадии активного органогенеза размещают на среде, подобранной для индукции формирования каллусов *in vitro*.

Одна из принципиальных проблем в анализируемой области исследований – оценка веществ-стимуляторов (индукторов), вызывающих формирование каллусов *in vitro* инициальной группой клеток незрелых зародышей. Согласно результатам многочисленных исследований, различных эксплантов разных видов растений, в том числе незрелых зародышей злаков, главнейшие индукторы каллусообразования *in vitro*, – гормоны индукционной питательной среды, главным образом ауксины, в том числе синтетические (Motte et al., 2014; Yu et al., 2017; Kruglova et al., 2018a; Shin, Seo, 2018). Высказано мнение, что в процессе гормональной индукции клетки эксплантов испытывают значительный стресс, который запускает действие транскрипционных факторов, способствующих переходу этих клеток к изменению программы развития *in vitro* (Duarte-Ake et al., 2019).

Механизм индуцирующего действия ауксина детально выявлен в ходе экспериментов по культивированию *in vitro* корневых эксплантов *Arabidopsis* на индукционной среде с повышенной концентрацией этого гормона. Установлено, что с помощью трансмембранных PIN-белков ауксин проникает в некоторые клетки перицикла корня (авторы не указывают, по какому принципу "выбираются" клетки; скорее всего, при этом проявляется позиционная информация и/или действие эндогенных сигналов. – *Авт.*) и накапливается в них. Именно такие клетки с локальным максимумом ауксина и сопутствующей локальной активацией ауксиновых ответов, контролируемых носителями притока/оттока ауксина, начинают делиться формированием каллуса. Показано, что эффективнее использовать именно синтетические ауксины, которые не транспортируются из клеток PIN-белками и, в отличие от природных ауксинов, очень слабо метаболизируются и способны входить в клетки независимо от AUX/LAX-носителей ауксинов (Kawochar et al., 2017). Заметим, что поступление эндогенного ауксина в клетки прокамбия выявлено и в условиях *in vivo* при органогенезе корня *Arabidopsis thaliana*, при этом гормон активировал действие транскрипционного фактора *WUS11*, участвующего в формировании инициальных клеток корней (Chen et al., 2016). У этого же растения *in vivo* отмечено, что ингибитор полярного транспорта ауксина влияет на морфогенез листа и генеративных структур при различных фасциациях (Bykova et al., 2016).

Исследователи приводят данные о получении каллусов из незрелых зародышей злаков на индукционных средах, содержащих, как правило, эмпирически подобранные концентрации гормонов. Однако приводятся сведения и о балансе между содержанием эндогенных и концентрацией экзогенных гормонов, оптимальном для индукции формирования каллусов *in vitro*, из незрелых зародышей пшеницы (Круглова, Сельдимирова, 2011; Miroshnichenko et al., 2017; Seldimirova et al., 2019b), ячменя (Hisano et al., 2016), кукурузы (Rakshit et al., 2010; Hong et al., 2017). Подчеркнем, что баланс эндогенных/экзогенных гормонов расценивается как важнейший фактор, определяющий индукцию иных, помимо каллусогенеза, путей морфогенеза *in vitro,* например, микроспориального эмбриогенеза (Zur et al., 2016) и его модификации – полиэмбриогенеза (Titova et al., 2016).

Формирование каллусов – достаточно длительный процесс. Так, у пшеницы каллусы образуются на 5 (Круглова, Сельдимирова, 2011, 2018; Seldimirova et al., 2016), у кукурузы – на 7 (Lopez-Ruiz et al., 2019) сутки культивирования незрелых зародышей на индукционной среде.

В сравнительно немногочисленных работах анализируется гистологический статус образовавшихся зародышевых каллусов злаков и изменение этого статуса по мере культивирования на индукционной среде *in vitro*.

Детальными исследованиями (Seldimirova et al., 2016) установлено, что у пшеницы каллус образуется из эпидермальных клеток щитка незрелых зародышей или из клеток, располагающихся вдоль прокамбиального тяжа щитка (рис. 2а, 2б). Каллусы интенсивно наращивают массу путем многократных митотических делений (рис. 2в). (Заметим, что аналогичные явления отмечены в условиях *in vivo* при росте меристемы корня *Arabidopsis*, проанализирован и генетический контроль этих процессов: Moubayidin et al., 2010.)

Далее наблюдается постепенное становление гистологической зональности каллусов и гетерогенности их клеток по форме, размерам и строению. При этом в толще каллусов выделяются так называемые морфогенетические очаги (рис. 2г), центральные зоны которых представлены компактно расположенными пролиферирующими меристематическими клетками (рис. 2д). Аналогичные сведения получены для зародышевых каллусов риса (Ijaz et al., 2019) и кукурузы (Lopez-Ruiz et al., 2019).

Ряд авторов не дают отдельного названия таким центральным зонам клеток формирующихся каллусов, сообщая о наличии активно делящихся меристематических клеток в каллусах *in vitro* (Dakshayini et al., 2016). В некоторых работах дается определение каллуса как плюрипотентной клеточной массы (Liu et al., 2014 и др.); можно полагать, что речь в данном случае идет именно о зоне меристематических клеток, а не всего каллуса.

Высказано предположение, что клетки морфогенетического очага зародышевого каллуса пшеницы выполняют функцию, аналогичную инициальным клеткам в апикальных меристемах стебля и корня пшеницы *in vivo* (Евсеева и др., 2007). По нашему мнению, этот вопрос интересен и с точки зрения изучения покоящегося центра

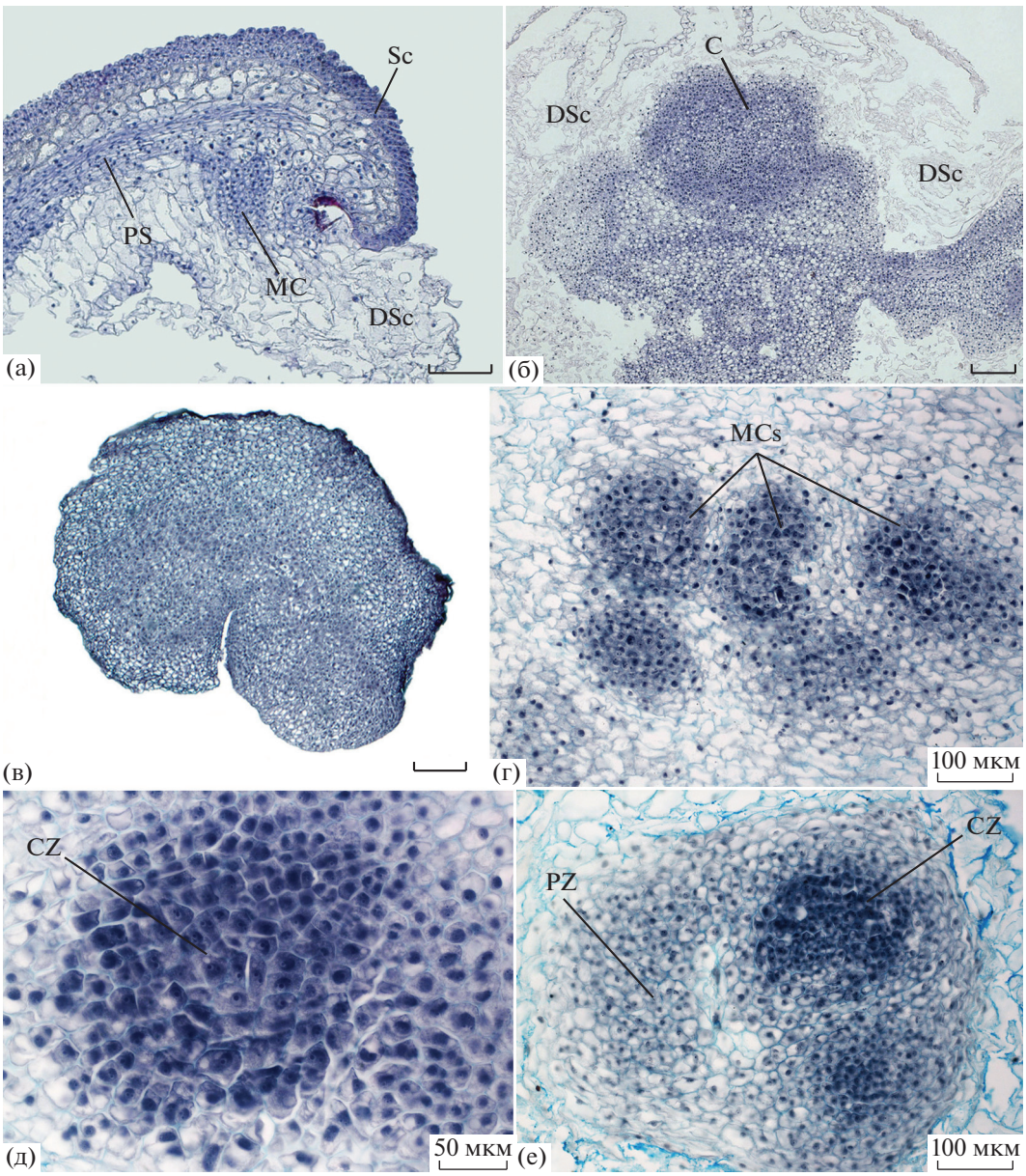

Рис. 2. Формирование зародышевого каллуса пшеницы по данным световой микроскопии. Условные обозначения: C – каллус, CZ – центральная зона, DSc – дегенерирующие клетки щитка, MC – меристематические клетки, MCs – морфогенетические очаги, PS – прокамбиальный тяж, PZ – периферическая зона, Sc – щиток. Шкала: (а, б) – 200 мкм, (в) – 500 мкм, (г, е) – 100 мкм, (д) – 50 мкм. (а–в) – по: Seldimirova et al., 2016 с изменениями; (г–е) – ориг. данные. Пояснения в тексте.

меристемы корня растений *in vivo*. Под влиянием различных факторов может произойти активация делений нижнего слоя клеток такого центра (как полагают Рахни с соавт. (Rahni et al., 2016), возможно, это стволовые клетки) в сторону чехлика, что приводит к “открыванию” меристемы (Bystrova et al., 2015; Basile et al., 2017). Вероятно, и в случае морфогенетического очага каллуса *in vitro* происходит такая же активация части его клеток под действием гормонов индукционной среды.

Сопоставление данных иммуногистохимического исследования эндогенных ауксинов и цитокининов в клетках зародышевых каллусов пшеницы с результатами их гистологического анализа показало, что эти гормоны локализуются преимущественно в меристематических клетках активно развивающихся морфогенетических очагов (Seldimirova et al., 2016).

Вокруг центральной зоны меристематических клеток (или меристематического очага/зоны) каллусов пшеницы формируется периферийная

зона рыхло расположенных паренхимных клеток (рис. 2е). В таких клетках отмечена высокая степень вакуолизации – показатель замедления их роста, а в целом старения (по: Халилуев и др., 2014). Аналогичные данные получены и для зародышевого каллуса риса (Ijaz et al., 2019).

Важно заметить, что формирование центральной зоны и окружающей ее периферической зоны клеток выявлено и в условиях *in vivo* в апикальной меристеме побега *Arabidopsis* (Galvan-Ampudia et al., 2016). В этом можно видеть общность клеточных и тканевых механизмов ранних этапов органогенеза *in vivo* и *in vitro*.

Один из решающих факторов формирования каллусов на индукционной среде *in vitro* – межклеточные взаимодействия. Действительно, симпластические взаимодействия посредством плазмодесм в центральной меристематической зоне морфогенетического очага каллусов отличаются от таковых в окружающей паренхиматозной периферической зоне, где количество плазмодесм сильно уменьшено. Симпластический транспорт обеспечивает надежный обмен клеток центральной зоны морфогенетического очага гормонами и иными веществами, необходимыми как для функционирования клеток, так и для координации деятельности клеток в составе таких зон. Это позволяет рассматривать центральную зону меристематических клеток как интегрированную структуру.

Многие авторы сообщают о важности симпластических взаимодействий и в растениях *in vivo,* в частности, в их апикальных и латеральных меристемах (по: Додуева и др., 2014). Важность симпластических взаимодействий выявлена и на различных стадиях соматического эмбриогенеза *in vitro* у *Arabidopsis* (Godel-Jedrychowska et al., 2020).

Отдельная проблема в области исследования формирования каллусов *in vitro* – выявление молекулярно-генетических особенностей этого процесса. Анализ таких публикаций не входит в задачи данной статьи, однако можно рекомендовать работы (Ikeuchi et al., 2018; Xu et al., 2018; Feher, 2019; Li et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019).

Согласно данным многих исследователей, сформированные морфогенные каллусы злаков как зародышевого, так и иного происхождения – это плотные компактные образования, морфологически четко отличающиеся от рыхлых неморфогенных каллусов (подробнее: Зинатуллина, 2020). Различия в морфологических показателях типов каллусов подтверждаются данными, полученными с помощью сканирующего электронного микроскопа (Сельдимирова и др., 2016). Однако после переноса на свежую индукционную среду того же состава каллусы, например, пшеницы, ранее по морфологическим показателям охарактеризованные как неморфогенные, оказались способны к преобразованию в морфогенные (Круглова, Сельдимирова, 2018). Такие трансформации вносят дополнительные трудности в понимание каллусообразования и каллусогенеза *in vitro.*

Ультраструктурные характеристики клеток сформированных зародышевых каллусов свидетельствуют о наличии в них предпосылок для энергетических затрат в ходе дальнейших активных клеточных делений. Для пшеницы это подтверждается увеличением в клетках количества полисом, диктиосом и липидных включений наряду с наличием в митохондриях развитых крист, а в пластидах – крахмальных зерен (Сельдимирова, Круглова, 2013). Отметим, что аналогичные данные получены и при ультраструктурном анализе формирующихся соматических зародышей пшеницы *in vitro* (Seldimirova et al., 2017).

В целом, в зародышевых каллусах злаков в ходе культивирования на индукционной среде *in vitro* создаются гистологические предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза на регенерационной среде *in vitro*.

Таким образом, несмотря на известную степень изученности структурных (цитогистологических) особенностей формирования и развития зародышевых каллусов злаков *in vitro*, детальные поэтапные сведения о физиологических (гормональных) аспектах их развития от размещения незрелого зародыша на индукционную среду до формирования “зрелого” каллуса отсутствуют. Основное внимание в этой области, как и при изучении каллусов иного происхождения у различных растений, обращается на анализ эндогенного гормонального статуса “зрелого” каллуса непосредственно перед его переносом на регенерационную среду *in vitro.* Это обусловлено практической необходимостью адекватной экзогенной гормональной индукции различных путей морфогенеза в каллусах (Сельдимирова, Круглова, 2015; Hisano et al., 2016; Yu et al., 2017, 2019; Awan et al., 2019 и др.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* на примере различных растений изучаются в течение достаточно длительного времени. В этой области исследований помимо накопления обширного эмпирического материала сделаны и важные теоретические обобщения. Например, способность к формированию каллусов *in vitro* и регенерации из них полноценных растений расценивается как одно из проявлений пластичности (поливариантности) онтогенеза растений, во многом обусловленной прикрепленным образом жизни (Gaillochet, Lohmann, 2015; Ikeuchi et al., 2016, 2019; Feher, 2019; Maury et al., 2019).

Важнейшая проблема в этой области исследований – характеристика свойств тех эксплантов *in vivo*, которые дадут начало каллусам на индукционной среде *in vitro*. Особое внимание в данном обзоре уделено цитофизиологическим особенностям таких эксплантов, как незрелые зародыши злаков в стадии органогенеза, оптимальных для формирования каллусов *in vitro.* Анализ литературных и собственных данных позволяет предположить, что компетентность клеток незрелых зародышей злаков к формированию каллусов *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародышей в момент инокуляции, а именно – их меристематичности, что обусловливает их способность к репрограммированию в плюрипотентное состояние в начале культивирования *in vitro*. Для злаков, по-видимому, именно природа экспланта (в данном случае – незрелого зародыша) является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток к формированию каллусов. Кроме того, меристематические клетки таких зародышей не только морфогенетически компетентны и плюрипотентны, но и, по-видимому, тотипотентны, поскольку являются исходными для клеток/групп клеток каллусов, реализующих различные пути морфогенеза *in vitro* на регенерационной среде.

В биологии развития растений детально разработано понятие “критическая стадия” для оценки сопряженности морфогенетических и морфофизиологических процессов в развитии эмбриональных структур (Batygina, Vasilyeva, 2003; Шамров, 2008; Батыгина, 2014). Понятие “критическая стадия эмбриогенеза” применено, например, при выявлении относительной автономности зиготических зародышей *in vivo* (Kruglova et al., 2020b) и предложено к применению при анализе соматического эмбриогенеза *in vitro* (Guo et al., 2020) растений. Было бы перспективным проанализировать и стадии развития незрелых зародышей, клетки которых служат инициальными клетками каллусов. Можно полагать, что именно степень дифференциации клеток в зародыше, сопряженная с критическими стадиями эмбриогенеза, определяет их восприимчивость к экзогенным гормонам и переход на индуцированный альтернативный путь каллусообразования *in vitro*.

Еще одно перспективное направление исследований, которому до настоящего времени уделяется недостаточно много внимания, – анализ клеток протодермы незрелого зародыша, обладающих мощным регенерационным потенциалом. Сравнение клеток протодермы с другими клетками зародыша по таким показателям, как, например, локализация гормонов, ультраструктурные характеристики, может способствовать выявлению цитофизиологических механизмов репрограммирования клеток.

К этим важным вопросам следует добавить и вопрос о функциональном взаимодействии эндогенных гормонов на стадии развития незрелого зародыша *in vivo*, оптимальной для формирования каллуса *in vitro*. Действительно, способность гормонов влиять друг друга – одна из важных особенностей гормональной системы растений на разных этапах онтогенеза и при различных условиях произрастания (Maury et al., 2019; Romanenko et al., 2020; Jogawat et al., 2021 и др.). Хотя такие взаимодействия не вызывают сомнений, информация о влиянии одних гормонов на другие в развивающихся зародышах довольно противоречива. Отсутствуют и обобщающие сведения о содержании различных эндогенных гормонов в каллусах злаков в динамике их развития от размещения незрелого зародыша на индукционную среду *in vitro* до формирования “зрелого” каллуса.

Все эти вопросы, по нашему мнению, следует решать исходя из подхода к незрелому зародышу *in vivo* и зародышевому каллусу на индукционной среде *in vitro* как единой (интегрированной) экспериментальной системе. В данной статье на примере злаков мы постарались показать, что морфогенетические события, заложенные в клеточных программах развития незрелых зародышей в условиях *in vivo*, находят свою реализацию при адекватных условиях индукции формирования и развития каллуса *in vitro*. Основанием для использования интегрированной системы “незрелый зародыш *in vivo* – зародышевый каллус *in vitro*” служит базовый принцип универсальности процессов морфогенеза в растениях *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014).

Этот базовый принцип применим и при оценке поднятых в данном обзоре дискуссионных вопросов в связи с исследованием каллусообразования и каллусогенеза *in vivo* (так называемый раневой каллус), а также органогенеза *in vivo* и *in vitro.* Возможно, во всех этих случаях действуют схожие механизмы. Более того, высказано мнение, что каллусогенез *in vitro* следует оценивать как отдельный тип органогенеза *de novo,* сходный с процессом формирования боковых корней *in vivo* (Liu et al., 2014).

В литературе не раз поднималась проблема использования культивируемых *in vitro* эксплантов (Бутенко, 1999; Носов, 1999; Mashkina, Tabatskaya, 2020 и др.) и особенно каллусов (Ikeuchi et al., 2016, 2019; Kruglova et al., 2018a, 2018b, 2020b; Круглова и др., 2019б; Feher, 2019 и др.) в качестве модельных систем при исследовании морфогенеза растений *in vivo.* Действительно, несмотря на то, что морфогенез *in vitro* не менее сложен, чем *in vivo,* каллусы, культивируемые в строго контролируемых экспериментатором условиях *in vitro*, можно расценивать как перспективные модельные системы для оценки различных взаимодей-

ствующих морфогенетических процессов и механизмов их регуляции. Основанием для использования каллусных моделей служат как свойства их меристематических клеток (плюри- и тотипотентность), так и морфогенетические события, происходящие в каллусах *in vitro* (дифференциация/дедифференциация, репрограммирование развития, дифференциальная экспрессия генов).

Экспериментальная система "незрелый зародыш *in vivo* – зародышевый каллус *in vitro*" может послужить адекватной моделью при изучении различных аспектов сложнейшего биологического феномена морфогенеза растений как *in vitro*, так и *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Статья подготовлена при выполнении тем № АААА-А18-118022190099-6 (Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, государственное задание Минобрнауки России № 075-00326-19-00) и № АААА-А18-118051590112-8 (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН) в рамках договора о творческом сотрудничестве между институтами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова и А.Е. Зинатуллина подготовили первоначальный вариант текста обзора с использованием литературных и оригинальных данных. Г.Е. Титова проанализировала основные положения статьи и внесла ценные дополнения. Все авторы участвовали в обсуждении окончательного варианта статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андронова Е.В. Протодерма // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 346–352.

Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФЕК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

Бутенко Р.Г., Джардемалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Каллусообразующая способность эксплататов из разных органов различных сортов озимой пшеницы // Физиол. раст. 1986. Т. 33. Вып. 2. С. 350–355.

Бычкова О.В., Ерещенко Д.В., Розова М.А. Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре // Acta Biol. Sib. 2016. Т. 2. № 2. С. 76–80.

Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Кудрякова Н.В. и др. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений // Физиол. раст. 2017. Т. 64. № 1. С. 19–32.

Галин И.Р., Зайцев Д.Ю., Сельдимирова О.А. и др. Участие цитокининов в начальных этапах эмбриоидогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Биомика. 2018. Т. 10. № 2. С. 141–145.

Додуева И.Е., Ганчева М.С., Осипова М.А. и др. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // Физиол. раст. 2014. Т. 61. № 5. С. 611–631.

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.

Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. 2008. Т. 55. № 5. С. 643–664.

Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи соврем. биол. 2020. Т. 140. № 1. С. 183–194.

Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2012. № 2. С. 21–24.

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.

Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физио. биохим. культ. раст. 2009. Т. 41. № 2. С. 124–131.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2018. № 2. С. 61–65.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Гистологический статус зародыша пшеницы в стадии органогенеза *in vivo,* оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2019а. № 1. С. 25–29.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2019б. № 2. С. 44–54.

Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Том 2. Рост и морфогенез. Нижневартовск: Изд-во Нижневартовского ун-та, 2014. С. 26–30.

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.

Никитина Е.Д. Формообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. и их взаимосвязь // Вестн. Алтайского гос. агр. ун-та. 2014. № 4. С. 48–52.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // Изв. Алтайского гос. ун-та. Биол. науки. 2014. Т. 3. № 1. С. 46–50.

Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.

Сельдимирова О.А. Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 565–573.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклинных каллусах пшеницы *in vitro* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2015. № 1. С. 33–39.

Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н. и др. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2017. № 3. С. 114–118.

Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Кудоярова Г.Р. и др. Влияние АБК на созревание зародышей ячменя *in vivo*: результаты изучения дефицитного по АБК мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018а. Т. 1. № 4. С. 203–211.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р. и др. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018б. Т. 1. № 3. С. 134–142.

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.

Творогова В.Е., Лутова Л.А. Генетическая регуляция зиготического эмбриогенеза у покрытосеменных растений // Физиол. раст. 2018. Т. 65. № 1. С. 3–17.

Халилуев М.Р., Богоутдинова Л.Р., Баранова Г.Б. и др. Зависимость каллусообразования и органогенеза побегов томата (*Solanum lycopersicum* L.) *in vitro* от генотипа, типа эксплантa и состава питательной среды // Изв. РАН. Серия биол. 2014. № 6. С. 586–596.

Чернов В.Е., Пендинен Г.И. Сравнительная оценка каллусогенеза и регенерации у различных видов ячменя // Сельскохоз. биол. 2011. № 1. С. 44–53.

Чуб В.В. Роль позиционной информации в регуляции развития органов цветка и листовых серий побегов. М.: Бином, 2010. 263 с.

Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 350 с.

Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя. СПб.: Мир и семья, 1997. 824 с.

Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. СПб.: Мир и семья, 2000. 652 с.

Alejandri-Ramirez N.D., Chavez-Hernandez E.C., Contreras-Guerra J.L. et al. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeno maize embryogenic callus induction and establishment // Plant Physiol Biochem. 2018. V. 122. P. 78–89.

Ali F., Ahsan M., Saeed N.A. et al. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*) // Int. J. Agric. Biol. 2014. V. 16. P. 111–117.

An Y.-Q., Lin L. Transcriptional regulatory programs underlying barley germination and regulatory functions of gibberellin and abscisic acid // BMC Plant Biol. 2011. V. 11. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-105

Awan M.F., Iqbal M., Sharis M.N. et al. Evaluation of genotypic and hormone mediated callus induction and regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) // Int. J. Bot. Stud. 2019. V. 4. P. 70–76.

Basile A., Fambrini M., Pugliesti C. The vascular plants: open system of growth // Dev. Genes. Evol. 2017. V. 227. P. 129–157.

Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 2003. V. 45. P. 27–36.

Bykova E.A., Chergintsev D.A., Vlasova T.A. et al. Effect of the auxin polar transport inhibitor on the morphogenesis of leaves and generative structures during fasciation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 207–215.

Bystrova E.I., Zhukovskaya N.V., Rakitin V.J. et al. Role of ethylene in activation of cell division in quiescent center of exised maize roots // Russ. J. Dev. Bio. 2015. V. 46. P. 60–64.

Chavez-Hernandez E.C., Alehandri-Ramirez N.D., Contreras-Guerra L.L. et al. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00555

Chen J., Lausser A., Dresselhaus T. Hormonal responses during early embryogenesis in maize // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. P. 325–331.

Chen L., Tong J., Xiao L. et al. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 4273–4284.

Cheng Y., Liu H., Cao L. et al. Down-regulation of multiple *CDK* inhibitor *ICK/KRP* genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2015. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00825

Chu Z., Chen J., Xu H. et al. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* cultures // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01302

Czajkowska B.I., Finlay C.M., Jones G. et al. Diversity of a cytokinin dehydrogenase gene in wild and cultivated barley // PLoS One. 2019. V. 14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225899

Dagustu N. Comparison of callus formation and plantlet regeneration capacity from immature embryo culture of

wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes // Biotech. Biotechnol. Equipm. 2014.
https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817552

Dakshayini K., Vaman R.C., Karun A. et al. High-frequency plant regeneration and histological analysis of callus in *Cichorium intybus*: An important medicinal plant // J. Phytol. 2016. V. 8. P. 7–12.

De Vries S.C., Weijers D. Plant embryogenesis // Curr. Biol. 2017. V. 27. P. 870–873.

Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M. et al. Signaling in early maize kernel development // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 375–388.

Du H., Wu N., Fu J. et al. A *GH3* family member, *OsGH3-2*, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 6467–6480.

Duarte-Ake F., Nic-Can G., De-la-Peca C. Chapter 13. Somatic embryogenesis: polycomb complexes control cell-to-embryo transition // Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications. Springer Nature Switzerland AG, 2019. P. 339–354.

Dziurka K., Dziurka M., Warchol M. et al. Endogenous phytohormone profile during oat (*Avena sativa* L.) haploid embryo development // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2019. V. 55. P. 221–229.

Fan G.-Q., Liu F., Shao Q.-Q. et al. Relations among wheat (*Triticum aestivum* L.) protein, starch contents and endogenous hormone contents during kernel development // Plant Physiol. Comm. 2007. V. 43. P. 36–40.

Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // Front. Plant Sci. 2019.
https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536

Forestan C., Meda S., Varotto S. ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 1373–1390.

Gaillochet C., Daum G., Lohmann J.U. O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem pattering // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 23. P. 91–97.

Gaillochet C., Lohmann J.U. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity // Development. 2015. V. 142. P. 2237–2249.

Galvan-Ampudia C.S., Chaumeret A.M., Godin C. et al. Phyllotaxis: from patterns of organogenesis at the meristem to shoot architecture // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2016. V. 5. P. 460–473.

Godel-Jedrychowska K., Kulinska-Lukaszek K., Horstman A. et al. Symplasmic isolation marks cell fate changes during somatic embryogenesis // J. Exp. Bot. 2020.
https://doi.org/10.1093/jxb/eraa041

Guo H., Fan Y., Guo H. et al. Somatic embryogenesis critical initiation stage-specific ^{m}*CHH* hypomethylation reveals epigenetic basis underlying embryogenic redifferentiation in cotton // Plant Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 1648–1650.

Hajheidari M., Koncz C., Bucker M. Chromatin evolution-key innovations underpinning morphological complexity // Front. Plant Sci. 2019.
https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00454

Hess J.R., Carman J.G., Banowetz G.M. Hormones in wheat kernels during embryony // Plant Physiol. 2002. V. 159. P. 379–386.

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. Biochem. 2016. V. 99. P. 66–72.

Hong J.K., Park K.J., Lee G.-S. et al. Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of various maize genotypes (*Zea mays* L.) // J. Plant Biotechnol. 2017. V. 44. P. 49–55.

Iida H., Yoshida A., Takada S. ATML1 activity is restricted to the outermost cells of the embryo through post-transcriptional repressions // Development. 2019. V. 146.
https://doi.org/10.1242/dev.169300

Ijaz B., Sudiro C., Hyder M.Z. et al. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2019.
https://doi.org/10.1007/s11627-019-09974-6

Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al. Molecular mechanisms of plant regeneration // Ann. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 377–406.

Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 28. P. 60–67.

Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A. et al. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms // Development. 2016. V. 143. P. 1442–1453.

Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B. et al. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 770–782.

Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159–3173.

Iwase A., Mita K., Nonaka S. et al. WIND1-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 389–397.

Jaeger J., Irons D., Monk N. Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information // Development. 2008. V. 135. P. 3175–3183.

Janocha D., Lohmann J.U. From signals to stem cells and back again // Curr. Opin. Plant Biol. 2018. V. 45. P. 136–142.

Jogawat A., Yadav B., Chhaya et al. Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review // Physiol. Plant. 2021.
https://doi.org/10.1111/ppl.13328

Joshi R., Kumar P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review // Agr. Rev. 2013. V. 34. P. 1–20.

Juarez-Gonzalez V., Lopez-Ruiz B.A., Baldrich P. et al. The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis // Sci. Rep. 2019. V. 9.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y

Kawochar M.A., Ahmed N.U., Hossain M.I. et al. Role of the explants and NAA on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*) // Amer. J. Life Sci. 2017. V. 5. P. 140–144.

Khlebova L.P., Nikitina E.D. Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants // Acta Biol. Sib. 2016. V. 2. P. 68–75.

Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as a *in vitro* morphogenesiss pathway in cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018a. V. 49. P. 245–259.

Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E. In vitro callus as a model system for the study of plant stress-resistance to abiotic factors (on the example of cereals) // Biol. Bull. Rev. 2018b. V. 8. P. 518–526.

Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatulina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // Biol. Bull. Rev. 2020a. V. 10. P. 115–126.

Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. et al. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals) // Russ. J. Dev. Biol. 2020b. V. 51. P. 1–15.

Lafon-Placette C., Kohler C. Embryo and endosperm, partners in seed development // Curr. Opin. Plant Biol. 2014. V. 17. P. 64–69.

Lee K., Seo P.J. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 235–247.

Li K., Wang J., Liu C. et al. Expression of *AtLEC2* and *AtIPTs* promotes embryogenic callus formation and shoot regeneration in tobacco // BMC Plant Biol. 2019. V. 19.
https://doi.org/10.1186/s12870-019-1907-7

Liu J., Sheng L., Xu Y. et al. WOX11 and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 1081–1093.

Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E. et al. Development-related miRNA expression and target regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of tuxpeno VS-535 maize cultivar // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20.
https://doi.org/10.3390/ijms20092079

Lowe K., La Rota M., Hoerster G. et al. Rapid genotype "independent" *Zea mays* L. (maize) transformation *via* direct somatic embryogenesis // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2018. V. 28. P. 1998–2015.

Mashkina O.S., Tabatskaya T.M. Morphogenesis of a dissected birch leaf *in vitro* culture // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. № 6. P. 397–409.

Maury S., Sow M.D., Le Gac A.-L. et al. Phytohormone and chromatin crosstalk: the missing link for developmental plasticity? // Front. Plant Sci. 2019.
https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395

Mendez-Hernandez H.A., Ledezma-Rodriguez M., Avilez-Montalvo R.N. et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis // Front. Plant Sci. 2019. V. 10.
https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077

Miransaria M., Smithc D.L. Plant hormones and seed germination // Env. Exp. Bot. 2014. V. 99. P. 110–121.

Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M. et al. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species // PLoS One. 2017.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173533

Motte H., Vereecke D., Geelen D. et al. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration // Biotech. Adv. 2014. V. 32. P. 107–121.

Moubayidin L., Perilli S., Dello Ioio R. et al. The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase // Curr. Biol. 2010. V. 20. P. 1138–1143.

Ojolo S.P., Cao S., Priyadarshani S. et al. Regulation of plant growth and development: a review from a chromatin remodeling perspective // Front. Plant Sci. 2018.
https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01232

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. P. 2017–2034.

Osborne D., McManus M. Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. 268 p.

Pasternak T., Dudits D. Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis *in vivo* and *in vitro* // Front. Plant Sci. 2019.
https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00778

Perilli S., Di Mambro R., Sabatini S. Growth and development of the root apical meristem // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. P. 17–23.

Popielarska-Konieczna M., Sala K, Abdullah M. et al. Extracellular matrix and wall composition are diverse in the organogenic and non-organogenic calli of *Actinidia arguta* // Plant Cell Reports. 2020.
https://doi.org/10.1007/s00299-020-02530-2

Pykalo S.V., Dubrovna O.V. Variability of the *Triticale* genome *in vitro* // Cytol. Genet. 2018. V. 52. P. 385–393.

Radoeva T., Lokerse A.S., Llavata-Peris C.I. et al. A robust auxin response network controls embryo and suspensor development through a basic helix loop helix transcriptional module // Plant Cell. 2019. V. 31. P. 52–67.

Radoeva T., Albrecht C., Piepers M. et al. Suspensor-derived somatic embryogenesis in *Arabidopsis* // Development. 2020. V. 147.
https://doi.org/10.1242/dev.188912

Rahni R., Efroni I., Birnbaum K.D. A case for distributed control of local stem cell behavior in plants // Dev. Cell. 2016. V. 38. P. 635–642.

Raizada M.N., Goron T.L., Bannerjee O. et al. Loss of developmental pluripotency occurs in two stages during leaf aging in *Arabidopsis thaliana* // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2017. V. 53. P. 178–187.

Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J.C. et al. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2010. V. 100. P. 31–37.

Rober-Kleber N., Albrechtova J.T.P., Fleig S. et al. Plasma membrane H+-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development // J. Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 1302–1312.

Rocha D.I., Vieira L.M., Koehler A.D. et al. Cellular and Morpho-histological foundations of *in vitro* plant regeneration // Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press, 2018. V. 1815. P. 47–68.

Romanenko K.O., Babenko L.M., Vasheka O.V. et al. In vitro phytohormonal regulation of fern gametophytes growth and development // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. P. 71–83.

Sahoo S.A., Jha Z., Verulkar S.B. et al. High-throughput cell analysis based protocol for ploidy determination in anther-derived rice callus // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2019. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01561-2

Schuster C., Gaillochet C., Medzihradszky A. et al. A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals // Dev. Cell. 2014. V. 28. P. 438–449.

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. P. 251–264.

Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Titova G.E. et al. Comparative ultrastuctural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo* zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development // Russ. J. Dev. Biol. 2017. V. 48. P. 185–197.

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M. et al. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // Seed Sci. Res. 2019a. V. 29. P. 1–9.

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Somatic embryogenesis in wheat and barley callus *in vitro* is determined by the local of indoleacetic and abscisic acids // Russ. J. Dev. Biol. 2019b. V. 50. P. 124–135.

Shen Y., Jiang Z., Yao X. et al. Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation // PLoS One. 2012. V. 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032237

Shin J., Seo P.J. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells // Front. Plant Sci. 2018. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01653

Short E., Leighton M., Imriz G. et al. Epidermal expression of a sterol biosynthesis gene regulates root growth by a non-cell-autonomous mechanism in *Arabidopsis* // Development. 2018. V. 145. https://doi.org/10.1242/dev.160572

Singh A., Gautam V., Singh S. et al. Plant small RNAs: Advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development // Planta. 2018. V. 248. P. 545–558.

Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // Sympos. Soc. Exp. Biol.: Proceed. 1957. V. 11. P. 118–130.

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. P. 30–37.

Smit M.E., Llavata-Peris C.I., Roosjen M. et al. Specification and regulation of vascular tissue identity in the *Arabidopsis* embryo // Development. 2020. V. 147. https://doi.org/10.1242/dev.186130

Su Y.H., Liu Y.B., Zhang X.S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 616–625.

Sugimoto K., Jiao I., Meyerowith E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs *via* root development pathway // Dev. Cell. 2010. V. 18. P. 463–471.

Sugimoto K., Gordon S.P., Meyerowitz E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? // Trends Cell Biol. 2011. V. 21. P. 212–218.

Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation // J. Plant Res. 2015. V. 128. 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. Organ Cult. 2013. V. 113. P. 103–119.

Sun R.Z., Zuo E.H., Qi J.F. et al. A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves // Funct. Integr. Genomics. 2019. https://doi.org/10.1007/s10142-019-00701-3

Tian R., Paul P., Joshi S. et al. Genetic activity during early plant embryogenesis // Biochem. J. 2020. V. 477. P. 3743–3767.

Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N. et al. Phenomenon of "siamese embryos" in cereals *in vivo* and *in vitro*: Clevage polyembryony and fasciations // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 122–137.

Tuskan G.A., Mewalal R., Gunter L.E. et al. Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach // PLoS One. 2018. V. 17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202519

Wang C., Wang G., Gao Y. et al. A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice // Plant Mol. Biol. 2019. https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5

Wendrich J.R., Möller B.K., Uddin B. et al. A set of domain-specific markers in the *Arabidopsis* embryo // Plant Reprod. 2015. V. 28. P. 153–160.

Wolpert L. Positional information and pattern formation // Curr. Top. Dev. Biol. 2016. V. 117. P. 597–608.

Wu K., Wang J., Kong Z. et al. Characterization of a single recessive yield trait mutant with elevated endogenous ABA concentration and deformed grains, spikelets and leaves // Plant Sci. 2011. V. 180. P. 306–312.

Xu C., Cao H., Zhang Q. et al. Control of auxin-induced callus formation by *bZIP59–LBD* complex in *Arabidopsis* regeneration // Nat. Plants. 2018. V. 4. P. 108–115.

Xu Y., Zhang W., Gao Y. et al. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*) // Planta. 2011. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1535-4

Yu J., Liu W., Liu J. et al. Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385

Yu Y., Qin W., Li Y. et al. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities // Plant Growth Regul. 2019. V. 87. P. 187–199.

Zhang W., Wang X., Fan R. et al. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos // J. Integr. Agricult. 2015. V. 14. P. 11–19.

Zhang W., Cao Z., Zhou Q. et al. Grain filling characteristics and their relations with endogenous hormones in large- and small-grain mutants of rice // PLoS One. 2016. V. 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165321

Zhao J., Zhou C., Yang H.Y. Isolation and i*n vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. // Plant Cell Repts. 2000. V. 19. P. 321–326.

Zhao J., Yu N., Ju M. et al. ABC transporter *OsABCG18* controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice // J. Exp. Bot. 2019. https://doi.org/10.1093/jxb/erz382

Zhao S., Jiang Q., Ma J. et al. Characterization and expression analysis of *WOX5* genes from wheat and its relatives // Gene. 2014. V. 537. P. 63–69.

Zhao S., Jiang Q.-T., Ma J. et al. Characterization and expression analysis of *WOX2* homeodomain transcription factor in *Aegilops tauschii* // Genet. Mol. Biol. 2015. V. 38. P. 79–85.

Zur I., Dubas E., Krzewska M. et al. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis // Front. Plant Sci. 2016. P. 110–109.

Cytophysiological Features of the Experimental System "Embryo *in vivo* – Callus *in vitro*" of Cereals

N. N. Kruglova[1, *], G. E. Titova[2], O. A. Seldimirova[1], and A. E. Zinatullina[1]

[1]*Ufa Institute of Biology, UFRC of RAS, pr. Oktyabrya 69, Ufa, 450054 Russia*

[2]*Komarov Botanical Institute of RAS, ul. Professor Popov 2, St. Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: kruglova@anrb.ru*

The most important problem in the study of plant calli *in vitro* is the relationship between endogenous and exogenous factors that affect the formation of calli ("callus formation") and their development in induction medium ("callus genesis"). Of particular interest is such an endogenous factor as the cytophysiological status of explants *in vivo* and calli *in vitro* at the dynamics of culture. In the review uses the example of cereals are analyzed the literature and own data on the identification of histological and hormonal features of initial callus cells in explants – immature embryos *in vivo*, as well as morphogenic calli formed from them during development *in vitro*. The answers to some discussion questions related to the induction of morphogenetic competence and development reprogramming of initial callus cells presented in the literature are considered. The comparison of callus formation and callus genesis *in vitro* with some similar events *in vivo* confirms the validity of the principle of morphogenesis universality *in vivo* and *in vitro* (Batygina, 2014 and earlier). The perspective of using the single (integrated) experimental system "embryo *in vivo* – callus in *vitro*" as a model for studying the most complex biological phenomenon – plant morphogenesis is discussed.

Keywords: embryo *in vivo*, callus *in vitro*, cytophysiology, plant morphogenesis, cereals