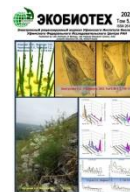




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ ВЛИЯЕТ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО И РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Круглова Н.Н.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
E-mail: kruglova@anrb.ru

Биотехнологические разработки в целях селекции, направленные на создание высокопродуктивных сортов пшеницы, требуют значительного количества морфогенных каллусов, в которых индуцируется проявление различных путей морфогенеза *in vitro*, связанных с регенерацией полноценных растений. Методически важно выявить зависимость индукции конкретного пути морфогенеза в каллусах пшеницы *in vitro* от продолжительности их культивирования. На примере морфогенных каллусов, полученных из незрелых зародышей пшеницы в стадии раннего органогенеза на индукционной среде, содержащей 2,0 мг/л синтетического ауксина 2,4-Д, в зависимости от продолжительности культивирования установлена следующая последовательность индукции путей морфогенеза *in vitro*: геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез (или эмбриоидогенез). Эти пути морфогенеза выявлены морфологически по появлению соответствующих морфогенных структур: почки, корни, гемморизогенные структуры, соматические зародыши. Показано, что процесс закладки и формирования морфогенных структур значительно растянут во времени, и в одном и том же каллусе могут присутствовать морфогенные структуры на разных стадиях развития.

Ключевые слова: зародыш ♦ морфогенный каллус ♦ 2,4-Д ♦ пшеница ♦ *Triticum aestivum* L.

THE DURATION OF *IN VITRO* CULTIVATION OF WHEAT EMBRYO CALLUS AFFECTS THE EXPRESSION OF THEIR MORPHOGENETIC AND REGENERATIVE POTENTIAL

Kruglova N.N.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
E-mail: kruglova@anrb.ru

Biotechnological developments for breeding purposes aimed at creating highly productive wheat varieties require a significant number of morphogenic callus, in which the manifestation of various pathways of morphogenesis *in vitro* associated with the regeneration of full-fledged plants is induced. It is methodically important to identify the dependence of the induction of a specific pathway of morphogenesis in wheat callus *in vitro* on the duration of their cultivation. On the example of morphogenic calli obtained from immature wheat embryos at the stage of early organogenesis on an induction medium containing 2.0 mg/l of synthetic auxin 2,4-D, depending on the duration of cultivation, the following sequence of induction of morphogenesis pathways *in vitro* was established: gemmogenesis, rhizogenesis, gemmorhizogenesis, somatic embryogenesis (or embryoidogenesis). These pathways of morphogenesis were identified morphologically by the appearance of the corresponding morphogenic structures: buds, roots, gemmorhizogenic structures, somatic embryos. It is shown that the process of laying and forming morphogenic structures is significantly stretched over time, and morphogenic structures may be present in the same callus at different stages of development.

Keywords: embryo ♦ morphogenic callus ♦ 2,4-D ♦ wheat ♦ *Triticum aestivum* L.

Поступила в редакцию: 4.10.2022

Цитировать | Cite as

DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108)

EDN: [XYVHOQ](https://www.edn.ru/XYVHOQ)



ВВЕДЕНИЕ

Морфогенный 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. В условиях *in vitro* такие группы клеток проявляют морфогенетические потенции, которые при оптимальных условиях реализуются различными путями морфогенеза (органогенез по типам ризогенеза, геммогенеза, гемморизогенеза, а также соматический эмбриогенез, или эмбриоидогенез) (по: Батыгина, 2014). Часть таких путей (гемморизогенез, соматический эмбриогенез) приводит к формированию полноценных растений-регенерантов, иначе говоря, при определенных условиях культуры *in vitro* группы клеток морфогенного каллуса проявляют и регенерационный потенциал (обзоры: Круглова и др., 2018б, 2020, 2021б).

Исследования различных аспектов каллусообразования и каллусогенеза вызывают большой интерес исследователей, в том числе биотехнологов. В этой области на примере представителей различных семейств как покрытосеменных, так и голосеменных растений накоплен значительный эмпирический материал и выполнены методологические разработки (например, по яровой мягкой пшенице: Круглова, 2012а, 2019а, 2022б; Круглова, Никонов, 2012; Dagustu, 2014; Chu et al., 2016; Сельдимирова и др., 2016, 2019; Seldimirova et al., 2016, 2019; Круглова, Сельдимирова, 2018), сделаны теоретические обобщения (Круглова, 2011, 2019б, 2021; Ikeuchi et al., 2013, 2019; Титова и др., 2016; Titova et al., 2016; Круглова и др., 2018а, 2021а; Kruglova et al., 2018а,б; Зинатуллина, 2019; Feher, 2019; Hajheidari et al., 2019; Shin et al., 2020; Godel-Jedrychowska et al., 2020; Varapparambath et al., 2022).

В то же время ряд вопросов остается нерешенным. К таким вопросам можно отнести следующие: влияет ли продолжительность культивирования морфогенных каллусов на проявление их морфогенетического потенциала? На какой срок от начала культивирования каллуса приходится инициация определенного пути морфогенеза? На какой именно путь инициальные клетки вступают раньше, на какие – позднее? Каким образом время индуцирования пути морфогенеза связано с реализацией регенерационного потенциала морфогенных каллусов?

Цель данной статьи – проанализировать последовательность проявления морфогенетического и регенерационного потенциала групп клеток морфогенных зародышевых каллусов пшеницы при их культивировании в условиях *in vitro* на одной и той же питательной среде.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования послужил сорт яровой мягкой пшеницы Жница, активно используемый в биотехнологических программах УИБ УФИЦ РАН. Семена любезно предоставлены автором сорта Е.А. Малокостовой (Воронежский НИИ СХ им. В.В. Докучаева РАСХН).

Растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) в вегетационный сезон 2022 г. Фенологические наблюдения за развитием растений вели согласно (Челак, 1991). В фенофазу молочной спелости зерна (12-15 сут после массового цветения) отобрали 30 растений. Из средней трети колоса каждого растения отобрали по 10 незрелых зародышей, всего 300 зародышей.

Использовали метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы в авторской разработке (Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдимирова, 2011; Основы биотехнологии ..., 2017; Круглова, 2022), при этом учитывали как морфологические показатели незрелых зародышей, так и физиологические условия культивирования, ведущие к формированию *in vitro* морфогенных каллусов.

Незрелые зародыши нужной стадии развития (согласно периодизации эмбриогенеза пшеницы, по: Круглова, 2012б) инокулировали *in vitro* на полную среду MS (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением синтетического ауксина 2,4-Д в концентрации 2.0 мг/л (среда I) для инициации формирования каллусов. Сформированные каллусы культивировали на этой же среде I в течение 28 сут, при этом вели подсчёт сформированных морфогенных структур (почки, корни, гемморизогенные структуры в виде почек и корней, соединенных проводящими элементами, а также соматические зародыши), образовавшихся в результате соответствующих путей морфогенеза, с морфологическим контролем их развития.

Сформированные соматические зародыши и гемморизогенные структуры на 29 сут культивирования на среде I переносили на регенерационную среду II, составленную по прописи D. Blyades (1966), для получения растений-регенерантов. Давали оценку регенерационной способности каллусов в процентах каллусов, давших начало регенерантам, к общему количеству инокулированных на среду II каллусов.

Статистическую обработку полученных результатов провели на основе программы Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что в условиях культуры *in vitro* из разных эксплантов различных растений образуются не только морфогенные/регенерационные, но и неморфогенные/нерегенерационные каллусы (например, у злаков: Kruglova et al., 2018b, 2020b, 2021; Liu et al., 2018; Ijaz et al., 2019; Lopez-Ruiz et al., 2019; Зинатуллина, 2020).

В условиях выполненных нами экспериментов к формированию морфогенных (и далее регенерационных) каллусов приводило использование в качестве эксплантов незрелых зародышей пшеницы сорта Жница на стадии раннего органогенеза (согласно авторской периодизации, стадия приходится на 12-15 сут после опыления). Именно такие экспланты, согласно нашим ранее полученным гистологическим данным (Круглова и др., 2019а), содержали в своем составе органы (а именно – щитки), представленные меристематическими клетками, дающими начало морфогенным каллусам. Эти результаты подтверждают то наблюдение, что на успех формирования именно морфогенных каллусов влияют структурные особенности клеток эксплантов (обзоры: Круглова, Сельдимирова, 2020; Kruglova et al., 2021; Зинатуллина, 2021).

Кроме того, согласно данным многочисленных исследований, в формировании морфогенных каллусов как злаков, так и представителей других семейств важнейшую роль играет гормональный состав индукционной питательной среды (Сельдимирова, Круглова, 2015; Hisano et al., 2016; Hong et al., 2017; Круглова и др., 2018в; Сельдимирова и др., 2018; Shin, Seo, 2018; Shin et al., 2018; Erland et al., 2020 и мн. др., а также обзоры: Круглова, 2021, 2022а; Круглова, Сельдимирова, 2020; Круглова и др., 2017, 2019б, 2021а; Kruglova et al., 2020а, 2021). В выполненных экспериментах мы использовали культуральную среду MS с введением синтетического ауксина 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л. Влияние этого ауксина на индукцию формирования зародышевых каллусов выявлено нами ранее на примере других сортов и гибридных комбинаций пшеницы (Круглова, Сельдимирова, 2011; Основы ..., 2017), а также согласуется с литературными данными, например, по индуцированию пыльниковых каллусов у ряда злаков (Orlowska et al., 2019; Sahoo et al., 2019; Juzon et al., 2022 и др.).

В целом, в данных исследованиях получила подтверждение предложенная нами на примере незрелых зародышей пшеницы тактика выбора экспланта для получения именно морфогенных каллусов (Круглова, 2022б).

Начало формирования морфогенных каллусов отмечено уже на 1 сут культивирования *in vitro* незрелых зародышей на инициальной питательной среде I.

К 3 сут культивирования каллусы достигали 5-6 см по длинной оси и, согласно результатам гистологических исследований (данные не приведены), были преимущественно представлены плотно упакованными изодиаметрическими меристематическими клетками с центрально расположенными крупными ядрами, что доказывает их морфогенный статус.

В ходе дальнейшего культивирования каллусов на среде I происходит увеличение их размеров, усложнение организации и переход к процессам морфогенеза.

На 5 сут культивирования в каллусах методом гистологического анализа (данные не представлены) отмечено формирование групп клеток меристематического типа, постепенно отделяющихся от дегенерирующих клеток самого каллуса. Такие группы клеток ранее названы нами морфогенетическими очагами (Круглова, Катасонова, 2009). Такие очаги, как свидетельствуют результаты ранее проведенных нами гистологических исследований на примере других генотипов пшеницы (Сельдимирова, Круглова, 2013; Seldimirova, Kruglova, 2013), являются обязательным начальным этапом всех выявленных в каллусах путей морфогенеза *in vitro*.

В ходе дальнейшего культивирования на среде I в каллусах выявлено несколько путей морфогенеза *in vitro*, при этом различные морфогенные структуры (почки, корни, гемморизогенные структуры, соматические зародыши) появлялись или одновременно, или в разное время от начала формирования каллусов. Следует отметить, что процесс закладки и формирования морфогенных структур значительно растянут во времени, и в одном и том же каллусе могут присутствовать морфогенные структуры на разных стадиях развития.

Первые морфогенные структуры (почки и корни) отмечены в каллусах на 10 сут культивирования *in vitro*, однако в незначительном количестве: почек – 6,4 шт./см², корней – 2,2 шт./см².

На 15 сут культивирования *in vitro* в каллусах помимо почек (4,1 шт./см²) и корней (2,8 шт./см²) в единичных случаях отмечено образование соматических зародышей (1,0 шт./см²), а также корней и почек, соединенных проводящими элементами (т.е. гемморизогенных структур), также единично (1,1 шт./см²) (рис.).

На 20 сут культивирования *in vitro* в каллусах повышается частота образования корней (3,6 шт./см²), гемморизогенных структур (1,5 шт./см²), отмечается появление соматических зародышей (5,4 шт./см²) (рис.).

На 25 сут культивирования *in vitro* в каллусах увеличивается частота образования гемморизогенных структур (4,4 шт./см²) и корней (до 3,8 шт./см²). Снижается частота образования почек (до 0,8 шт./см²) и соматических зародышей (до 3,2 шт./см²) (рис.).

На 28 сут культивирования *in vitro* в каллусах отмечена максимальная частота образования корней (6,3 шт./см²), при этом уменьшается частота образования почек (до 0,4 шт./см²), соматических зародышей (до 1,6 шт./см²) и гемморизогенных структур (до 1,3 шт./см²) (рис.).

Большой интерес с позиций биотехнологии вызывают морфогенные структуры, на регенерационной среде дающие начало полноценным растениям-регенерантам, а именно соматические зародыши и гемморизогенные структуры.

Как показывает анализ полученных данных (рис.), максимальная частота образования соматических зародышей ($5,4 \text{ шт./см}^2$) отмечена на 20 сут, тогда как гемморизогенных структур ($4,4 \text{ шт./см}^2$) – на 25 сут. К 28 сут культивирования оба показателя значительно уменьшаются.

Эти данные хорошо согласуются с результатами исследования регенерационной способности каллусов на культуральной среде II: выявлено, что максимальное количество растений-регенерантов (80% от количества высаженных каллусов при соматическом эмбриогенезе и 70% - при гемморизогенезе) образуется при переносе каллусов на среду II соответственно после 20 и 25 сут культивирования на среде I (рис.).

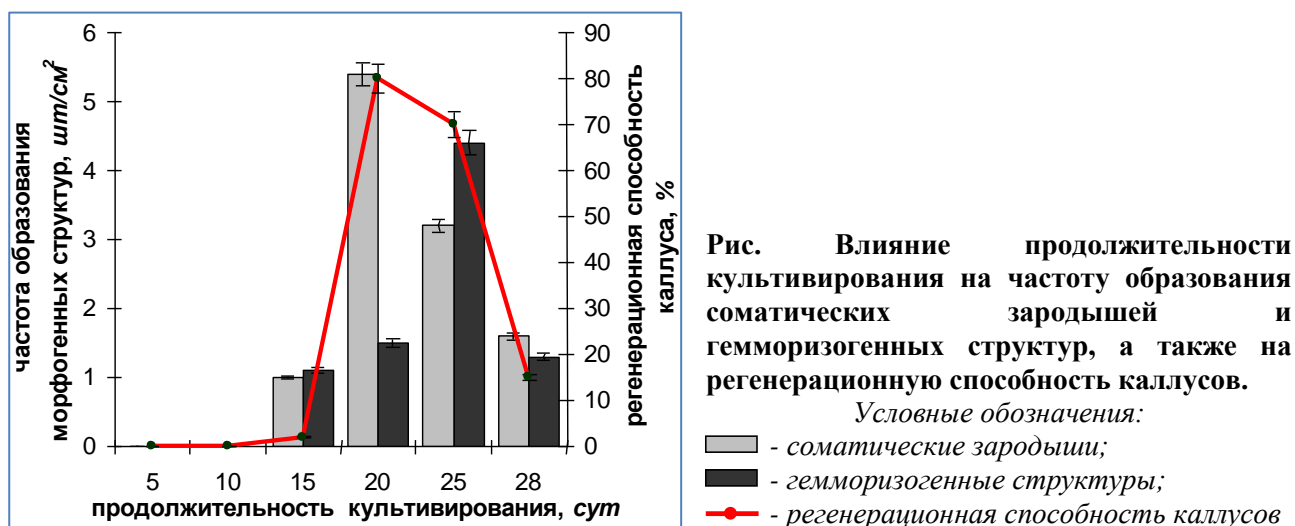


Рис. Влияние продолжительности культивирования на частоту образования соматических зародышей и гемморизогенных структур, а также на регенерационную способность каллусов.

Условные обозначения:

- - соматические зародыши;
- - гемморизогенные структуры;
- - регенерационная способность каллусов

Известно, что каллус характеризуется высокой морфогенетической лабильностью (Keuchi et al., 2013, 2019), что, по нашему мнению, обусловлено наличием групп меристематических клеток (морфогенетических очагов) с разной способностью к морфогенезу *in vitro*. Такая обусловленная наличием морфогенетических очагов лабильность выявлена в морфогенных каллусах пшеницы уже на 1 сут культивирования *in vitro*. Тем самым уже на самой ранней стадии развития морфогенных каллусов имеется возможность различной реализации морфогенетического потенциала их клеток *in vitro*. Этот вывод основан также и на данных цикла наших экспериментальных исследований, выполненных на каллусах пшеницы пыльничкового происхождения (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011, 2013; Круглова, 2019а, 2021).

В целом, в результате выполненных экспериментов было ещё раз подтверждено, что для эффективного индуцирующего действия экзогенного гормона на каллусы в их составе должны присутствовать специфические клетки-мишени, компетентные к восприятию и воздействию того или иного гормона, а именно меристематические клетки морфогенетических очагов. Такого рода данные известны в литературе (обзоры: Kruglova et al., 2018b, 2021; Круглова, Сельдимирова, 2020; Зинатуллина, 2021). Однако вопрос о том, какая именно меристематическая клетка/группа клеток каллуса вступит на путь морфогенеза *in vitro* и даст начало тому или иному органу (почке, корню), системе органов (гемморизогенная структура) или соматическому зародышу, остается открытым. По-видимому, большую роль в данном случае может играть так называемый позиционный контроль морфогенеза (Wolpert, 2016). Ранее нами (Круглова, 2021) при оценке событий каллусогенеза высказано предположение, что именно расположение (позиция) инициальных

меристематических клеток в структуре системы каллуса, а также межклеточные взаимодействия в развивающемся каллусе играют определяющую роль в индукции того или иного пути морфогенеза *in vitro*. Благодаря позиционному контролю среди каллусных клеток создаются самые различные трофические и гормональные ситуации, часть которых способствует реализации морфогенетического потенциала компетентных клеток. Это предположение подтверждается, например, ранее выполненным нами сопоставлением данных по иммуногистохимии эндогенных цитокининов и ауксинов в клетках каллусов пшеницы с результатами их гистологического анализа: установлено, что гормоны локализуются преимущественно в клетках именно морфогенетических очагов (Seldimirova et al., 2016), тем самым участвуя в создании позиционных сигналов для возникновения морфогенных структур в определенных нишах каллусов. В целом ещё раз важно подчеркнуть, что концепция позиционного контроля может сыграть положительную роль в попытках понять пространственно-временную организацию морфогенеза, т.е. в решении вопроса о том, из каких именно групп клеток, в каком месте и в какой конкретно форме образуется та или иная морфогенная структура в каллусе в условиях *in vitro*.

В условиях выполненных экспериментов выявлена определённая последовательность формирования морфогенных структур в зародышевых каллусах пшеницы на среде I, гормональная составляющая которой представлена синтетическим ауксином 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л. Эта последовательность такова: почки, корни, гемморизогенные структуры, соматические зародыши, что соответствует следующим путям морфогенеза *in vitro*: геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез).

В доступной литературе анализа последовательности формирования морфогенных структур в каллусах, полученных из разных эксплантов различных растений, нами не обнаружено. (Отметим, что некоторые исключения составляют крайне немногочисленные работы, посвященные длительному культивированию эксплантов, например: Oliveira et al., 2022). Можно высказать предположение о том, что последовательность вступления групп клеток каллуса (морфогенетических очагов) на тот или иной путь морфогенеза *in vitro* обусловлена как “критической массой” растущего каллуса, так и тканевыми особенностями индукции формирования соответствующих морфогенных структур. Однако это предположение необходимо подтвердить или опровергнуть детальными гистологическими исследованиями. Кроме того, к перспективным направлениям в этой области исследования можно отнести исследования экспериментальной регуляции активности генов на последовательных этапах различных путей морфогенеза в каллусах *in vitro*, а также изучение пространственно-временной ко-экспрессии генов во время морфогенетических процессов.

В ходе исследований использована приборная база ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014. 764 с.
2. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.

3. Зинатуллина А.Е. Феномен гемморизогенеза как типа органогенеза *in vitro* в биотехнологических исследованиях хлебных злаков // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 2. С. 116–127. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-2-116-127](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-2-116-127)
4. Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140. № 2. С. 183–194. DOI: [10.31857/S0042132420020040](https://doi.org/10.31857/S0042132420020040)
5. Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* (обзор) // Биомика. 2021. Т. 13. № 1. С. 8–19. DOI: [31301/2221-6197.bmcs.2021-2](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-2)
6. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. 2011. № 3. С. 17–22.
7. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012а. № 3. С. 57–61.
8. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012б. № 1. С. 56–61.
9. Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклиной гаплоидии пшеницы на основе комплекса эмбриологических и цитофизиологических данных // Экобиотех. 2019а. Т. 2. № 3. С. 232–243. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-234-245](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-234-245)
10. Круглова Н.Н. Органогенез злаков на ранних этапах онтогенеза *in vivo* как структурная основа экспериментальных исследований *in vitro* // Экобиотех. 2019б. Т. 2. № 1. С. 36–50. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-1-36-50](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-1-36-50)
11. Круглова Н.Н. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклиных каллусов растений: возможная роль позиционного расположения таргетных клеток и действия эпигенетических факторов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2021. № 2. С. 64–73. DOI: [10.31040/2222-8349-2021-0-2-64-73](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2021-0-2-64-73)
12. Круглова Н.Н. Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* у злаков: роль гормонального баланса (обзор) // Известия Уфимского научного центра РАН. 2022а. № 1. С. 52–59. DOI: [10.31040/2222-8349-2022-0-1-52-59](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2022-0-1-52-59)
13. Круглова Н.Н. Тактика выбора экспланта при биотехнологических исследованиях засухоустойчивости пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro* в селекционных целях // Экобиотех. 2022б. Т. 5. № 2. С. 41–58. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-2-41-58](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-2-41-58), EDN: [XXEJVQ](https://www.edn.ru/xxejvq)
14. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.
15. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 2. С. 124–131.
16. Круглова Н.Н., Никонов В.И. Оценка экспланта для биотехнологических разработок в целях адаптационной селекции яровой мягкой пшеницы в засушливых условиях Южного Урала // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 15–18.
17. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
18. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклиного каллуса пшеницы // Физиология растений и генетика. 2013. Т. 45. № 5. С. 382–389.

19. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 2. С. 61–65. DOI: [10.31040/2222-8349-2018-0-2-61-65](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-0-2-61-65)
20. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Система «зародыш *in planta*–каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы) // Биомика. 2020. Т. 12. № 2. С. 180–189. DOI: [10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8)
21. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Веселов Д.С. К вопросу об участии ауксинов в индукции и регуляции морфогенеза в модельной каллусной системе *in vitro* (на примере злаков) // Биомика. 2017. Т. 9. № 4. С. 289–297.
22. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи современной биологии. 2018а. Т. 138. № 3. С. 283–293. DOI: [10.7868/S0042132418030067](https://doi.org/10.7868/S0042132418030067)
23. 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* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019а. № 1. С. 25–29. DOI: [10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29)
24. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // Успехи современной биологии. 2019б. Т. 139. № 4. С. 326–337. DOI: [10.1134/S0042132419040057](https://doi.org/10.1134/S0042132419040057)
25. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллусные культуры *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021а. № 1(25). С. 124–139. DOI: [10.33952/2542-0720-2021-1-25-124-139](https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-1-25-124-139)
26. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018в. № 2. С. 55–60. DOI: [10.3140/2222-8349-2018-0-2-55-60](https://doi.org/10.3140/2222-8349-2018-0-2-55-60)
27. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018б. Т. 49. № 5. С. 273–288. DOI: [10.1134/S0475145018050038](https://doi.org/10.1134/S0475145018050038)
28. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности экспериментальной системы “зародыш *in vivo* – каллус *in vitro*” хлебных злаков // Онтогенез. 2021б. Т. 52. № 4. С. 237–253. DOI: [10.31857/S0475145021040042](https://doi.org/10.31857/S0475145021040042)
29. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков) // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 3–18. DOI: [10.31857/S0475145020010024](https://doi.org/10.31857/S0475145020010024)
30. Основы биотехнологии растений / Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с.
31. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения // Известия РАН. Серия биол. 2013. Т. 40. № 5. С. 565–573.
32. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 1. С. 35–39.

33. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Никонов В.И. Оценка коллекции генотипов яровой мягкой пшеницы по отзывчивости эксплантов на условия культуры *in vitro* как биотехнологического приёма // Экобиотех. 2018. Т. 1. № 2. С. 71-79. DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-2-71-79](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-2-71-79)
34. Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Способность к соматическому эмбриогенезу *in vitro* в каллусах пшеницы и ячменя определяется балансом содержания в них ИУК и АБК // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 3. С. 181–193. DOI: [10.1134/S0475145019030054](https://doi.org/10.1134/S0475145019030054)
35. Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Известия РАН. Сер. биол. 2016. Т. 43. № 2. С. 155–161.
36. Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Батыгина Т.Б. Феномен «сиамских зародышей» у злаков *in vivo* и *in vitro*: кливажная полиэмбриогения и фасциации // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 3. С. 152–169. DOI: [10.7868/S047514501603006X](https://doi.org/10.7868/S047514501603006X)
37. Челак В.Р. Система размножения пшеницы. Кишинев: Штиинца, 1991. 320 с.
38. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // *Physiol. Plant.* 1966. V. 19. P. 748–753.
39. 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. DOI: [10.3389/fpls.2016.01302](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01302)
40. Dagustu N. Comparison of Callus Formation and Plantlet Regeneration Capacity From Immature Embryo Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes // *Biotech. Biotech. Equipm.* 2014. DOI: [10.1080/13102818.2008.10817552](https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817552)
41. Erland L.A.E., Giebelhaus R.T., Victor J.M.R. et al. The Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Metabolomics-Guided Hypothesis Generation for Mechanisms of Activity // *Biomolecules.* 2020. V. 10. DOI: [10.3390/biom10091253](https://doi.org/10.3390/biom10091253)
42. Feher A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 26. DOI: [10.3389/fpls.2019.00536](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536)
43. Godel-Jedrychowska K., Kulinska-Lukaszek K., Horstman A. et al. Symplasmic Isolation Marks Cell Fate Changes During Somatic Embryogenesis // *J. Exp. Bot.* 2020. DOI: [10.1093/jxb/eraa041](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa041)
44. Hajheidari M., Koncz C., Bucker M. Chromatin Evolution-Key Innovations Underpinning Morphological Complexity // *Front. Plant Sci.* 2019. DOI: [10.3389/fpls.2019.00454](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00454)
45. 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. DOI: [10.1016/j.plaphy.2015.12.005](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.005)
46. 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 Biotech.* 2017. V. 44. P. 49–55. DOI: [10.5010/JPB.2017.44.1.049](https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.1.049)
47. 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. DOI: [10.1007/s11627-019-09974-6](https://doi.org/10.1007/s11627-019-09974-6)

48. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406. DOI: [10.1146/annurev-arplant-050718-100434](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434)
49. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3159–3173. DOI: [10.1105/tpc.113.116053](https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053)
50. Juzon K., Warchol M., Dziurka K. et al. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of oat (*Avena sativa* L.) doubled haploid lines through wide hybridization // *Peer J.* 2022. V. 10. DOI: [10.7717/peerj.12854](https://doi.org/10.7717/peerj.12854)
51. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina 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.* 2018a. V. 8. P. 518–526. DOI: [10.1134/S2079086418060063](https://doi.org/10.1134/S2079086418060063)
52. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // *Biol. Bull. Rev.* 2020a. V. 10. P. 115–126. DOI: [10.1134/S2079086420020048](https://doi.org/10.1134/S2079086420020048)
53. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* Morphogenesis Pathway in Cereals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018b. V. 49. P. 245-259. DOI: [10.1134/S106236041805003X](https://doi.org/10.1134/S106236041805003X)
54. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Cytophysiological features of the Cereal-based Experimental System “Embryo In Vivo – Callus In Vitro” // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. P. 199–214. DOI: [10.1134/S1062360421040044](https://doi.org/10.1134/S1062360421040044)
55. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. Embryo of Flowering Plants as the Critical Stage of Embryogenesis relative Autonomy (by Example of Cereals) // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020b. V. 51. P. 1–15. DOI: [10.1134/S1062360420010026](https://doi.org/10.1134/S1062360420010026)
56. Liu B., Shan X., Wu Y. et al. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Embryogenic and Non-embryogenic Calli Derived from a Maize (*Zea mays* L.) Inbred Line Y423 // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. DOI: [10.3390/ijms19124004](https://doi.org/10.3390/ijms19124004)
57. Lopez-Ruiz B.A., Juarez-Gonzalez V.T., Sandoval-Zapotitla E., Dinkova T.D. Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered In Vitro Plant Regeneration of Tuxpeno VS-535 Maize Cultivar // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. DOI: [10.3390/ijms20092079](https://doi.org/10.3390/ijms20092079)
58. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473-497. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
59. Oliveira T.R., Balfagon D., Sousa K.R. et al. Long-Term Subculture Affects Rooting Competence via Changes in the Hormones and Protein Profiles in *Cedrela Fissilis* Vell. (Meliaceae) Shoots // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2022. DOI: [10.21203/rs.3.rs-689426/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-689426/v1)
60. Orłowska R., Pachota K.A., Machczynska J. et al. Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops // *Electron. J. Biotech.* 2019. V. 43. DOI: [10.1016/j.ejbt.2019.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001)
61. 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. DOI: [10.1007/s11240-019-01561-2](https://doi.org/10.1007/s11240-019-01561-2)

62. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin // Biol. Bull. 2013. V. 40. P. 447–454. DOI: [10.1134/S1062359013050154](https://doi.org/10.1134/S1062359013050154)
63. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 251–264. DOI: [10.1007/S11627-016-9767-4](https://doi.org/10.1007/S11627-016-9767-4)
64. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley callus *in vitro* Is Determined by the Level of Indoleacetic and Abscisic Acids // Russ. J. Dev. Biol. 2019. V. 50. P. 124–135. DOI: [10.1134/S1062360419030056](https://doi.org/10.1134/S1062360419030056)
65. Seldimirova O.A., Titova G.E., Kruglova N.N. A Complex Morpho-Histological Approach to the In Vitro Study of Morphogenic Structures in a Wheat Anther Culture // Biol. Bull. 2016. V. 43. P. 121–126. DOI: [10.1134/S1062359016020084](https://doi.org/10.1134/S1062359016020084)
66. Shin J., Bae S., Seo P.J. De novo shoot organogenesis during plant regeneration // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. No. 1. P. 63–72. DOI: [10.1093/jxb/erz395](https://doi.org/10.1093/jxb/erz395)
67. Shin J., Seo P.J. Varying Auxin Levels Induce Distinct Pluripotent States in Callus Cells // Front. Plant Sci. 2018. DOI: [10.3389/fpls.2018.01653](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01653)
68. Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Galin I.R., Batygina T.B. Phenomenon of “Siamese embryos” in cereals *in vivo* and *in vitro*: Cleavage polyembryony and fasciations // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 122–137. DOI: [10.1134/S1062360416030061](https://doi.org/10.1134/S1062360416030061)
69. Varapparambath V., Mathew M.M., Shanmukhan A.P. et al. Mechanical conflict caused by a cell-wall-loosening enzyme activates *de novo* shoot regeneration // Dev. Cell. 2022. V. 57. P. 2063–2080. DOI: [10.1016/j.devcel.2022.07.017](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.07.017)
70. Wolpert L. Positional information and Pattern Formation // Curr. Top. Dev. Biol. 2016. V. 117. P. 597–608. DOI: [10.1016/bs.ctdb.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.008)

Цитировать как

Круглова Н.Н. Продолжительность культивирования *in vitro* зародышевых каллусов пшеницы влияет на проявление их морфогенетического и регенерационного потенциала // Экобиотех, 2022, Т. 5 (3). С. 98-108. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108), EDN: XВYННО

Cited as

Kruglova N.N.. The duration of *in vitro* cultivation of wheat embryo callus affects the expression of their morphogenetic and regenerative potential. *Ekobiotech.* V. 5 (3). P. 98-108. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108), EDN: XВYННО (In Rus.)