

УДК 633.16:57.085.23:57

DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-2-64-73

Обзор

**ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* КЛЕТОК АНДРОКЛИННЫХ КАЛЛУСОВ РАСТЕНИЙ:  
ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОЗИЦИОННОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ КЛЕТОК  
И ДЕЙСТВИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

© Н.Н. Круглова

Рассматривается проблема модельного подхода к изучению сложных проблем биологии развития растений. Дается определение каллуса как интегрированной системы, образующейся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине тканей); эта система изначально состоит из однородных клеток, которые постепенно преобразуются в систему групп гетерогенных клеток с видоспецифичными морфогенетическими потенциями, реализующимися различными путями морфогенеза. Анализируются вопросы, связанные с выделением критических стадий каллусогенеза *in vitro*. Обсуждается формирование каллусов в условиях *in vitro* на индукционной среде. Дается оценка морфогенеза клеток каллусов на регенерационной среде *in vitro*. Особое внимание уделяется анализу путей морфогенеза в андроклинных каллусах, полученных из микроспор в культуре *in vitro* изолированных пыльников растений. Анализируются концепции позиционного расположения таргетных клеток и проявления эпигенетических факторов применительно к путям морфогенеза клеток андроклинных каллусов. Подчеркивается универсальность процессов морфогенеза растений в естественных условиях *in planta* и в условиях экспериментов *in vitro*.

Ключевые слова: морфогенез растений, культура пыльников *in vitro*, каллус.

Изучение морфогенеза как совокупности протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тканей и органов [1] остается сложнейшей фундаментальной проблемой биологии развития растений. Успехи, достигнутые в изучении генов-переключателей развития, позволили приблизиться к пониманию как взаимодействия генов развития и пространственно-временной регуляции развития, так и регуляции на уровне экспрессии генов взаимоотношений клеток и тканей в процессе морфогенеза растений. Быстро накапливается информация о выявлении организующих центров морфогенеза и генов, продукты которых могут играть роль индуктивных сигналов морфогенеза растений; о единстве процессов активации и инактивации генов, контролирующих детерминацию и дифференциацию [2–4].

Сложность протекания морфогенеза в каллусах *in vitro* различных типов вызывает большой интерес исследователей. Так, выявлена несомненная связь морфогенеза *in vitro* с предшествующими делениями клеток каллуса: переход клетки/группы клеток каллуса к формированию

дифференцированного органа может произойти только после прохождения 2–3 циклов их деления, контролируемых фитогормонами, главным образом ауксинами. Иначе говоря, для репрограммирования каллусной клетки необходимо несколько циклов репликации ДНК. В целом вопрос репрограммирования клеток каллуса решается в контексте общей проблемы изменчивости генома в процессе дедифференциации и каллусообразования *in vitro* [2].

Универсальность путей морфогенеза растений в естественных условиях и в культуре *in vitro* [5] дает основание использовать культивируемые *in vitro* клетки в качестве адекватных моделей для изучения основных закономерностей и особенностей морфогенеза в растениях *in planta* в контролируемых экспериментатором условиях. Основанием для использования таких моделей служит и важная роль клетки в процессах морфогенеза, поскольку в основе морфогенетических событий лежат рост клеток и их дифференциация, темпы и ориентация клеточных делений, клеточный цикл. Кроме того, ряд растений (главным образом, арабидопсис), культивируемые клетки которых взяты в качестве

моделей, хорошо изучены генетически, что позволяет использовать и генетический подход для исследования морфогенеза в условиях *in vitro* [6].

Перспективные модельные системы в области исследования морфогенеза растений – каллусные культуры *in vitro*. Один из типов каллусов – андроклинный, получаемый в культуре *in vitro* изолированных пыльников. Несмотря на изученность таких каллусов с различных позиций, открытым остается вопрос о проявлении в них различных путей морфогенеза *in vitro* после переноса на питательную среду для регенерации и о возможности выбора этих путей в контролируемых условиях *in vitro* в нужном для исследователя направлении. Так, биотехнологов-практиков в данном случае, естественно, интересуют те пути морфогенеза, которые ведут к регенерации полноценных растений. Эти же пути интересуют и эмбриологов, изучающих различные способы и типы репродукции и размножения растений. В то же время важно выявить все пути, по которым реализуется морфогенетический потенциал клеток андроклинного каллуса.

Накоплен достаточный эмпирический материал по изучению влияния различных экзогенных факторов, главным образом фитогормонов, на индукцию различных путей морфогенеза в каллусных культурах *in vitro*, в том числе андроклинных, однако при этом получены противоречивые результаты. Кроме того, недостаточно изучен важный вопрос о соотношении эндогенных фитогормонов (в составе эксплантата), которые играют роль сигналов внутренней среды, и экзогенных фитогормонов (в составе культуральной среды), играющих роль сигналов из внешней среды, в индукции и регуляции путей морфогенеза *in vitro*.

Цель данного обзора – провести анализ литературных и собственных данных, полученных в результате выявления и исследования путей морфогенеза *in vitro* в модельных системах – андроклинных каллусах различных растений.

### **Общая характеристика каллуса *in vitro*.**

Первые работы, посвященные получению каллуса из изолированных сегментов мезофилла листа и изучению каллусогенеза как пути морфогенеза *in vitro*, появились еще в конце XIX – начале XX в. [6–8], однако однозначного определения каллуса не предложено. В своих исследованиях ([9–10, 11–14] и др.) мы придерживаемся следующего определения: каллус – интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в ре-

зультате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине этих тканей); изначально состоит из однородных клеток, постепенно преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток, имеющих видоспецифичные морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза.

Способность к каллусогенезу *in vitro* обнаружена у представителей многих семейств растений. В качестве эксплантов для получения каллусов используются различные части донорных растений – апексы побегов, молодые соцветия, колеоптили, незрелые пыльники, семяпочки, зародыши [6], характеризующиеся наличием значительного количества способных к каллусогенезу тотипотентных меристематических клеток [15, 16–18].

В литературе отсутствует периодизация развития *in vitro* каллусов, хотя отдельные попытки предпринимались. Так, на основании анализа литературных и оригинальных данных по генезису пыльниковых и зародышевых каллусов злаков в условиях *in vitro* и на основании выявленных гистологических особенностей каллусогенеза предложено выделение в этом процессе нескольких критических стадий развития [6]. Первая стадия – инициальные клетки каллуса, вторая стадия – возникновение из исходно однородных клеток каллуса морфогенетического очага, третья стадия – формирование в каллусе поверхностной меристематической зоны, четвертая стадия – морфогенный каллус, способный к реализации различных путей морфогенеза *in vitro*, включая органогенез (в ходе первых трех критических стадий возможно переключение программ развития каллусных клеток на альтернативные пути). Однако в целом вопрос о периодизации развития каллусов остается открытым, поскольку каллус, изначально состоящий из однородных клеток, постепенно преобразуется в систему групп гетерогенных клеток, при этом каждая из клеточных группировок развивается по своим морфогенетическим закономерностям. По-видимому, можно говорить о формировании каллусов на индукционной среде *in vitro* и о путях морфогенеза клеток каллусов на регенерационной среде *in vitro*.

Использование каллусов *in vitro* в качестве экспериментальных способов изучения морфогенеза имеет ряд преимуществ. Помимо возможности проводить исследования круглый год в одних и тех же условиях, получать большое

количество каллусов, к таким преимуществам следует отнести возможность осуществлять манипуляцию морфогенезом на определенных этапах каллусогенеза *in vitro* путем контроля абиотических факторов воздействия и параметров компонентов питательной среды. Кроме того, в культуре *in vitro* при добавлении определенных веществ в питательную среду происходит непосредственное их взаимодействие с большинством клеток каллусов, и тем самым создается возможность детально анализировать их реакции на действие конкретных факторов среды. К преимуществам использования каллусов *in vitro* следует отнести и возможность исследования механизмов морфогенеза на клеточном и тканевом уровнях [6, 19–20].

Однако самое главное преимущество использования каллусов как модельных систем, на наш взгляд, – это сходство морфогенетических процессов в растениях в естественных условиях *in planta* и в культивируемых каллусах *in vitro*. Так, эксперименты, проведенные на пшенице и ячмене, показали общность клеточных механизмов изменения растений *in planta* и каллусов *in vitro* в ответ на действие высоких значений ряда абиотических факторов [21]. Выявлено значительное сходство органогенеза, эмбриологических и репродуктивно-биологических показателей донорных растений и регенерантов, полученных в культуре *in vitro* пыльников пшеницы через каллусогенез [16, 22, 23]. В таком сходстве реакций растений *in planta* и каллусов *in vitro* можно видеть проявление принципа универсальности путей морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях, выдвинутого Т.Б. Батыгиной [5].

**Формирование андроклинных каллусов на индукционной среде *in vitro*.** Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что индукция формирования каллусов из клеток эксплантов, в том числе пыльников, в значительной степени определяется условиями культивирования, важнейшее среди которых – оптимальный баланс эндогенных (в экспланте в момент инокуляции) и экзогенных (в составе индукционной питательной среды) фитогормонов, а также физиологический статус экспланта в момент инокуляции на питательную среду [6, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 24–38, 39, 40].

Важнейший момент формирования каллусов любого происхождения – инициация процесса либо в отдельной клетке, либо в группе

таких клеток экспланта. По нашему мнению [6, 40, 41], инициальные клетки обладают признаками меристематичности, плюри- и тотипотентности, поскольку их производные – клетки каллуса – в условиях культивирования на регенерационной среде реализуют различные пути морфогенеза *in vitro*.

В культуре *in vitro* пыльников каллусы формируются путем многократных митотических делений морфогенетически компетентной клетки пыльника на основе проявления биологического феномена андроклинии (или, в другой терминологии, андрогенеза *in vitro*). Данный феномен состоит в переключении программы развития такой клетки (у злаков, как правило, это сильновакуолизованный микроспора) с обычного для естественных условий гаметофитного пути, ведущего к формированию пыльцевого зерна, на принципиально иной, спорофитный путь, ведущий в условиях культуры *in vitro* к формированию растения-регенеранта [9, 24, 40]. Показано принципиальное сходство инициальной клетки андроклинии с инициальными клетками других систем размножения [40].

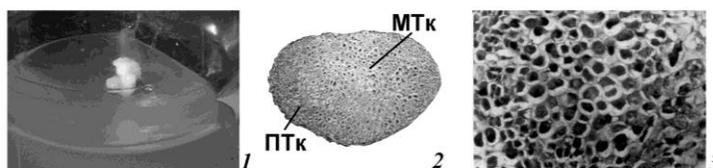
На индукционной среде каллус, исходно однородный по характеристикам составляющих клеток, интенсивно наращивает «критическую массу» путем многократных митотических делений клеток. Важно, что при этом наблюдается становление гистологической зональности строения каллуса и гетерогенности его клеток по форме, размерам и строению, и происходит выделение так называемых морфогенетических очагов, располагающихся в толще каллуса. Такой очаг представлен двумя зонами клеток: центральная зона меристематических пролиферирующих клеток и периферическая зона клеток, утративших меристематическую активность [42]. Наличие морфогенетических очагов подтверждено применением комплексного морфолого-гистологического подхода, позволяющего сопоставить пространственные характеристики каллусов, выявленные путем электронного сканирования поверхности, с их гистологическим статусом [43]. Тем самым в каллусах создаются гистологические предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза на регенерационной среде *in vitro* [6].

Морфологические показатели андроклинных каллусов, появившихся на заключительных этапах их культивирования *in vitro* на индукционной среде и способных к морфогенезу при

дальнейшем культивировании на регенерационной среде (так называемые морфогенные каллусы), достаточно сходны: это компактные, узловатые, плотные структуры, как правило, белого цвета [10, 43–47]. На рисунке приведен такой каллус, полученный в культуре пыльников пшеницы (рис., 1).

Согласно данным цито-гистологического анализа, такой каллус представлен главным образом плотно расположенными меристематическими клетками, характеризующимися тонкой оболочкой и крупным ядром, занимающим в клетке центральное положение (рис., 2, 3). На участке каллуса в месте контакта с пыльником находятся немногочисленные клетки паренхимной ткани – крупные, рыхло расположенные, вакуолизированные (рис., 2).

Методом трансмиссионной электронной микроскопии выявлены ультраструктурные характеристики клеток морфогенных андроклиных каллусов пшеницы, свидетельствующие о наличии в клетках предпосылок для энергетических затрат в ходе дальнейших активных клеточных делений: увеличение числа полисом, диктиосом и липидных включений наряду с наличием в митохондриях развитых крист, а в пластидах – крахмальных зерен [48]. Важно подчеркнуть, что эти данные во многом совпадают с аналогичными данными, полученными на примере зиготических зародышей *in planta* и микроспориальных эмбриоидов *in vitro* у пшеницы [49–51], что лишний раз подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной [5] об универсальности морфогенеза растений в природных и экспериментальных условиях.



### ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* КЛЕТОК КАЛЛУСА

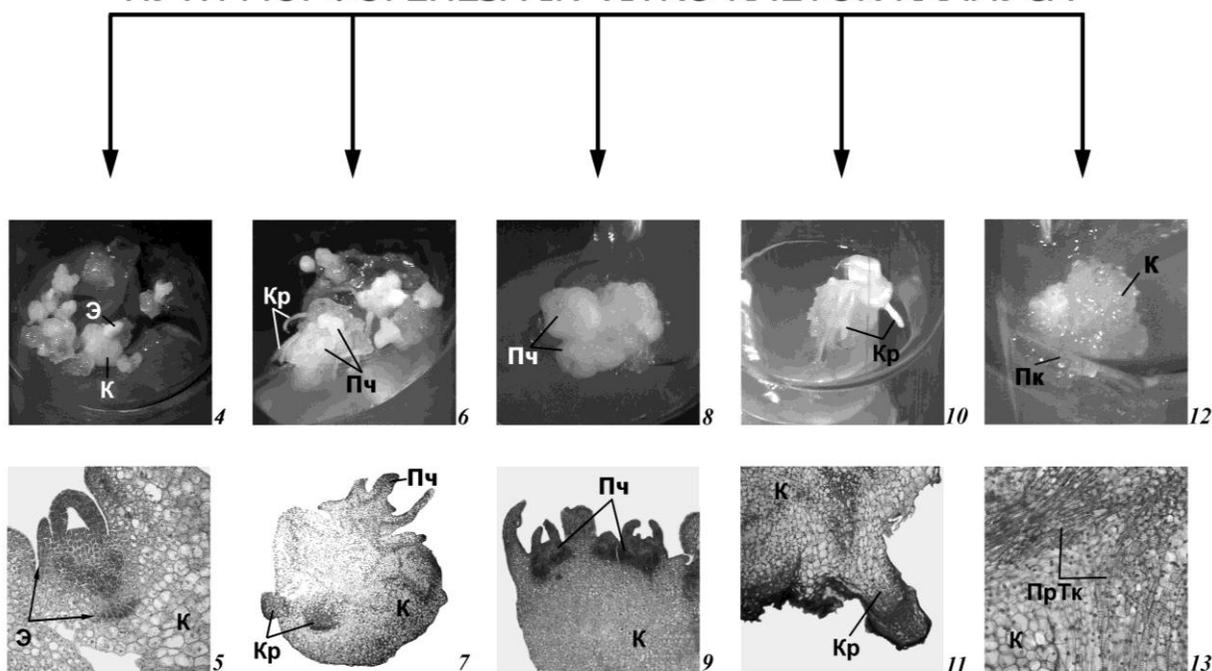


Рис. Морфогенный андроклиный каллус пшеницы и пути морфогенеза в нем. Индукционная среда *in vitro*: 1 – каллус по морфологическим данным; 2 – продольный срез каллуса; 3 – продольный срез участка меристематической ткани каллуса. Регенерационная среда *in vitro*: 4 – эмбриоиды (4, 5), гемморизогенные структуры (6, 7), почки (8, 9), корни (10, 11), проводящая ткань (13), полученные в каллусе.

Условные обозначения: К – морфогенный андроклиный каллус, Кр – корень, МТк – меристематическая ткань, ПТк – паренхимная ткань, ПрТк – проводящая ткань, Пк – пыльник, Пч – почка, Э – эмбриоид.

По [17], с дополнениями

**Морфогенез в андроклиных каллусах на регенерационной среде *in vitro*.** Андроклинные морфогенные каллусы переносят на регенерационную среду *in vitro*. В ходе развития на такой среде происходят постепенное увеличение размеров каллусов, усложнение организации и процессы морфогенеза в них.

В начале культивирования морфогенетический очаг каллуса увеличивается в размерах за счет активных делений меристематических клеток центральной зоны, при этом клетки периферической зоны постепенно дегенерируют. Под дегенерирующей периферической зоной наблюдается оформление эпидермального слоя, параллельно поверхности которого из клеток центральной зоны дифференцируется меристематическая зона, представленная клетками таблитчатой формы, сходными по строению с клетками прокамбия. Происходит дальнейшее интенсивное нарастание массы каллуса и формирование многочисленных инвагинаций на его поверхности. Многочисленными исследованиями показано, что именно с деятельностью клеток поверхностной меристематической зоны связана дальнейшая реализация различных путей морфогенеза *in vitro* в каллусах, в том числе андроклиных [52, 53].

Принципиально важным, на наш взгляд, является тот факт, что у растений и в условиях *in planta* многие начальные морфогенетические процессы, например, разметка и закладка листовых примордиев, также происходят в периферической зоне апикальной меристемы, функционально отграниченной от центральной зоны и меристемы ожидания; установлена роль потока ауксинов из поверхностных слоев к формирующимся примордиям и идентифицированы участвующие в этом процессе гены [54].

В целом этапы развития морфогенетических очагов представляют собой последовательные события одного и того же процесса, а формирование очага и его дальнейшее преобразование в поверхностную меристематическую зону – общий начальный этап, характерный для разных путей морфогенеза *in vitro* в различных типах каллусов. Универсальность такого начального этапа лишний раз подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной [5] об универсальности морфогенеза в различных системах развития растений.

На последующих этапах культивирования в андроклиных каллусах выявлены различные пути морфогенеза *in vitro* их клеток/групп кле-

ток: эмбриоидогенез – формирование эмбриоидов (зародышеподобных структур) (рис., 4–5), гемморизогенез – формирование гемморизогенных структур, представленных почками и корнями (рис., 6–7), геммогенез – формирование почки (рис., 8–9), ризогенез – формирование корня (рис., 10–11), гистогенез – формирование различных тканей (в данном случае – проводящей ткани) (рис., 12–13). Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что к формированию регенерантов из каллусов приводит гемморизогенез, в ряде случаев – геммогенез после фитогормонального индуцирования ризогенеза в том же самом каллусе, тогда как ризогенез представляет собой «тупик» морфогенеза [55].

Индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* определяется, как правило, балансом между содержанием эндогенных фитогормонов в составе каллуса при инокуляции на регенерационную среду и концентрацией экзогенно внесенных фитогормонов в составе этой среды. Эти данные еще раз подтверждают важнейшую роль фитогормонов в индукции и координации процессов морфогенеза в условиях культуры *in vitro*. Показано, например, что индукция каждого из выявленных путей морфогенеза *in vitro* клеток андроклиных каллусов пшеницы определялась главным образом концентрацией ауксина ИУК в составе культуральной среды; продемонстрирована принципиальная возможность регуляции путей морфогенеза *in vitro* клеток андроклиных каллусов пшеницы путем подбора адекватного для индукции желаемого пути соотношения между эндогенным содержанием ауксина ИУК в каллусе и концентрацией экзогенно внесенного ауксина ИУК в питательной среде [37].

Важнейший фактор эффективного индукционного действия гормона – наличие в растительной ткани специфических компетентных таргетных клеток-мишеней, восприимчивых к действию этого гормона, что нашло отражение в концепции клеток-мишеней [56]. По-видимому, для эффективного воздействия экзогенных фитогормонов на клетки андроклиных каллусов в их составе должны находиться специфические клетки-мишени, компетентные к действию того или иного фитогормона. В качестве компетентных клеток-мишеней каллуса, на наш взгляд, следует рассматривать меристематические клетки каллуса: участие этих клеток в морфогенезе растений хорошо известно.

Однако вопрос о том, какая именно меристематическая клетка андроклинного каллуса вступит на путь морфогенеза и даст начало либо эмбриониду, либо тому или иному органу (почке, корню) или ткани в ходе развития на среде для регенерации, остается открытым. Большую роль в данном случае может играть так называемый позиционный контроль морфогенеза [57]. Именно расположение (позиция) инициальной меристематической клетки в структуре каллуса, а также межклеточные взаимодействия в развивающемся каллусе, по-видимому, должны играть определяющую роль в индукции развития этой клетки по пути морфогенеза. По-видимому, благодаря позиционному контролю среди каллусных клеток создаются самые различные трофические и гормональные ситуации, часть которых способствует реализации морфогенетического потенциала компетентных клеток каллуса. Так, сопоставление данных по иммуногистохимии эндогенных цитокининов и ауксинов в клетках каллусов пшеницы с результатами их гистологического анализа показало, что гормоны локализуются преимущественно в клетках активно развивающихся морфогенетических очагов [18], по-видимому, участвуя в создании позиционных сигналов для возникновения органов в определенных клеточных «нишах» каллусов.

В то же время концепция позиционной информации при морфогенезе воспринимается исследователями неоднозначно, вплоть до оценки ее как формальной, редуционно-механистической [58]). Высказано, однако, мнение [59] о положительной роли данной концепции в попытках понять пространственно-временную организацию морфогенеза, т.е. вопроса о том, из каких именно клеток/групп клеток, в каком месте и в какой конкретно форме образуется тот или иной орган в системе целостного организма, тем более что пути морфогенеза как в экспериментах *in vitro*, так и при развитии *in planta* могут варьировать

Для объяснения путей развития компетентных клеток-мишеней андроклинного каллуса, на наш взгляд, применима и концепция о существовании особого класса наследственных единиц, ячеек функциональной наследственной памяти, – эпигенов как систем генов, имеющих не менее двух устойчивых режимов функционирования подчиненных ей генов и способных сохранять каждый из режимов в последо-

вательном ряду поколений [60–63]. В процессе развития многоклеточного организма из зиготы по мере увеличения числа клеток, обособления ствольных (камбиальных) клеток, органогенеза и т.д. происходит изменение как межклеточной, так и внутриклеточной среды, что приводит к последовательному изменению значений сигналов, поступающих с генной сети одной клетки к другой. Таким образом, на входы системы управления онтогенезом могут поступать сигналы не только из внешней среды, но и из внутренней среды самого развивающегося организма. Вполне вероятно, что в рассматриваемом случае происходит реализация эпигенетических подпрограмм развития компетентной клетки-мишени каллуса. Важен в данном случае тот факт, что этими подпрограммами можно управлять путем подбора адекватной концентрации фитогормона в составе культуральной среды.

Рассматриваемая ситуация усложняется тем, что сами каллусные клетки-мишени, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием зародышеподобных структур, органов или тканей, берут начало от одной гаплоидной клетки – микроспоры, реализующей в данном случае спорофитную программу развития. Более того, в зависимости от условий культивирования (главным образом, от гормонального состава индукционной питательной среды) микроспора может развиваться по спорофитному пути не только через этап формирования каллуса, как рассматривалось выше, но и альтернативно – через этап формирования эмбриоида – зародышеподобной структуры (путь так называемого прямого эмбриоидогенеза, в отличие от рассмотренного выше пути эмбриоидогенеза в каллусе) [50–52].

В то же время развитие каллусных клеток-мишеней по спорофитной программе, по-видимому, следует рассматривать намного шире – как реализацию микроспорой и ее производной – клеткой-мишенью «общей наследственной памяти» (по [60]), которая обеспечивает хранение наследственной информации в некоторых кодах в онтогенезе и передачу ее от одного поколения к другому.

Закономерен вопрос, реализуется ли каллусной клеткой-мишенью в ходе развития *in vitro* общая наследственная память о гаметофитной программе развития «материнской» клетки – микроспоры, ведущей к

формированию пыльцевого зерна (мужского гаметофита)? В ходе проведенных экспериментов на примере яровой мягкой пшеницы такой путь морфогенеза действительно был выявлен [64]. По нашему мнению, не только диплоидная зигота, но и любая тотипотентная клетка организма (в нашем случае – микроспора или клетка-мишень каллуса) преформирована в том смысле, что общая наследственная память содержит всю информацию, необходимую для самовоспроизведения, «дизайн» тканей и всего организма.

В целом существование эпигенных систем, способных обеспечить «связку» блоков наследственной программы онтогенеза в подпрограммы и сохранение их в онтогенезе, предполагает существование эпигенеза – последовательного формирования под действием сигналов внутренней среды (в нашем случае – эндогенного фитогормона) развивающегося организма (в нашем случае – андроклинного каллуса) все более усложняющихся (в нашем случае – по сравнению с микроспорой, которая может развиваться только по двум альтернативным спорофитным путям) блоков наследственной программы.

**Заключение.** Индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* в каллусах во многом детерминирована как физиологическим статусом экспланта, так и условиями культивирования, главным образом, оптимальным балансом эндогенных и экзогенных фитогормонов. Однако морфогенетические потенциалы клеток каллуса могут меняться в зависимости от характера связей между группами клеток в каллусе, что, в свою очередь, обусловлено формой и размером (критической массой) каллуса и иными факторами. В результате даже соблюдение баланса экзогенных и эндогенных фитогормонов не всегда приводит к индукции морфогенеза в каллусе. Перспективные направления в этой области исследования, на наш взгляд, – экспериментальная регуляция активности генов на различных этапах формирования органов в каллусах *in vitro*, а также изучение пространственно-временной ко-экспрессии генов во время формообразовательных процессов в каллусах.

Важен вопрос о клеточных и тканевых механизмах действия эндогенных фитогормонов в процессе морфогенеза *in vitro* в каллусах. Механизмы влияния гормонов на морфогенез растений нельзя понять, не располагая информаци-

ей о содержании и распределении гормонов в клетках. Один из наиболее распространенных способов оценки содержания гормонов в клетках базируется на использовании искусственных конструкций, в которых репортерный ген ставится под контроль промотора, чувствительного к тому или иному гормону. У растений (как правило, представителей двудольных), трансформированных с помощью такой конструкции, искомые гормоны активируют экспрессию трансгенов, кодирующих или белки ферменты, или флюоресцирующие белки, присутствие которых в клетках можно обнаружить визуально. Альтернативой использования репортерных конструкций для оценки уровня гормонов в клетках, по-видимому, может служить иммуногистохимический метод с использованием специфических антител к ауксинам и цитокининам.

Каллусы, полученные и развивающиеся в контролируемых условиях *in vitro*, – это удобные модельные системы для изучения реализации различных путей морфогенеза растений. Основанием для использования таких моделей служит важная роль клетки в процессах морфогенеза: дифференциальная экспрессия генов в клетках, дифференциация и рост клеток, темпы и ориентация клеточных делений, клеточный цикл, поляризация клеток, самоорганизация клеточных систем. Кроме того, благодаря эволюционно обусловленной способности растений к регенерации, в условиях культивирования *in vitro* проявляется значительно более широкий круг их морфогенетических потенциалов, чем в природных условиях *in planta*. Можно полагать, что дальнейшие гистологические, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические исследования каллусов как моделей морфогенеза *in vitro* позволят приблизиться к пониманию механизмов плюри- и тотипотентности клеток и их реализации у растений как *in vitro*, так и *in planta*.

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

#### Литература

1. Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. 2008. Т. 55, № 5. С. 643–664.
2. Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B., Iwase A., Bagman A.-M., Watt L., Coleman D., Favero D., Takahashi T., Ahnert S., Brady S.M., Sugimoto K.

A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // *Plant Cell Physiol.* 2018. V. 59. P. 770–782.

3. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406.

4. Feher A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // *Front. Plant Sci.* 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.00536

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

6. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // *Онтогенез.* 2018. Т. 49, № 5. С. 273–288.

7. Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation // *J. Plant Research.* 2015. V. 128, № 5. P. 349–359.

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

9. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2010. 174 с.

10. Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // *Успехи соврем. биол.* 2020. Т. 140, № 2. С. 183–194.

11. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2011. № 3. С. 17–22.

12. 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.

13. 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 соврем. биол.* 2018. Т. 138, № 3. С. 283–293.

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

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

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

17. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклиного каллуса пшеницы // *Физиол. раст. и генетика.* 2013. Т. 45, № 5. С. 382–389.

18. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kругlova 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, № 3. P. 251–264.

19. Raizada M.N., Goron T.L., Bannerjee O., Mason M.Q., Pautler M., Brazolot J., Morris A.D., Kajenthira A., Dinka S.J., DiMeo N. 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.

20. 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

21. Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. Алматы, 2012. 208 с.

22. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю. и др. Развитие андроклиных регенерантов пшеницы в лабораторных условиях *in vitro* и *ex vitro* // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2017. № 3. С. 21–25.

23. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю. и др. Развитие андроклиных растений пшеницы в полевых условиях *in vivo* // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2017. № 3. С. 26–30.

24. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2005. 99 с.

25. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклиных каллусах злаков: цито-гистологические особенности // *Успехи соврем. биол.* 2010. Т. 130, № 3. С. 247–257.

26. Iwase A., Mitsuda N., Koyama T., Hiratsu K., Kojima M., Arai T., Inoue Y., Seki M., Sakakibara H., Sugimoto K., Ohme-Takagi M. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. P. 508–514.

27. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2012. № 3. С. 57–61.

28. He C., Chen X., Huang H., Xu L. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. doi: e1002911

29. Cheng Y., Liu H., Cao L., Wang S., Li Y., Zhang Y., Jiang W., Zhou Y., Wang H. Down-regulation of multiple CDK inhibitor *ICK/KRP* genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00825

30. 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.

31. Doubled haploidy in model and recalcitrant species / ed. J.M. Segui-Simarro. Lausanne: Frontiers Media, 2016. 119 p.
32. Hisano H., Matsuura T., Mori I.C., Yamane M., Sato K. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 99. P. 66–72.
33. Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms // *Development.* 2016. V. 143. P. 1442–1453.
34. Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Galin I.R., Kruglova N.N. Phytohormonal regulation of *in vitro* formation of wheat androgenic structures // Науч. результат. Серия физиол. 2016. Т. 2. С. 3–8.
35. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro* // Науч. результат. Серия физиол. 2017. Т. 3, № 1. С. 8–13.
36. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Веселов Д.С., Яновская А.А. Оптимизация состава питательной среды для индукции каллусообразования у ячменя сорта Septoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // *Биомика.* 2017. Т. 9, № 4. С. 298–303.
37. 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.
38. Lee K., Seo P. J. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 235–247.
39. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // *Известия Уфимского науч. центра РАН.* 2018. № 2. С. 55–60.
40. Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклиной гаплоидии пшеницы на основе комплекса эмбриологических и цитофизиологических данных // *Экобиотех.* 2019. Т. 2, № 3. С. 232–243.
41. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Сельдимирова О.А. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков // *Успехи соврем. биологии.* 2000. Т. 120, № 5. С. 490–501.
42. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // *Физиол. биохим. культ. раст.* 2011. Т. 43, № 4. С. 297–306.
43. 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. Серия биол.* 2016. № 2. С. 155–161.
44. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н., Сельдимирова О.А. Андрогенные эмбриониды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // *Известия РАН. Серия биол.* 2001. № 2. С. 191–197.
45. Slesak H., Goralski G., Pawlowska H. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // *Cent. Eur. J. Biol.* 2013. V. 8. P. 30–37.
46. Sun L., Wu Y., Zou H. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2013. V. 113. P. 103–119.
47. Bevitori R., Popielarska-Konieczna M., dos Santos E.M. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 545–554.
48. Сельдимирова О.А. Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // *Известия РАН. Серия биол.* 2013. № 5. С. 565–573.
49. Narciso J.O., Hattori K. Genotypic differences in morphology and ultrastructures of callus derived from selected rice varieties // *Philippine Sci. Lett.* 2010. V. 3. P. 59–65.
50. 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 полиэмбриония и фасциации // *Онтогенез.* 2016. Т. 47, № 3. С. 152–169.
51. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспоридиальных эмбрионидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // *Онтогенез.* 2017. Т. 48, № 3. С. 220–233.
52. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Андроклиный эмбриоидогенез *in vitro* у злаков // *Успехи соврем. биол.* 2014. Т. 134, № 5. С. 476–487.
53. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // *Известия Уфимского науч. центра РАН.* 2015. № 1. С. 35–39.
54. Быкова Е.А., Чергинцев Д.А., Власова Т.А., Чуб В.В. Влияние ингибитора полярного транспорта ауксина на морфогенез листа и генеративных структур при фасциации у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Онтогенез.* 2016. Т. 47, № 4. С. 235–243.
55. Зинатуллина А.Е. Феномен гемморизогенеза как типа органогенеза *in vitro* в биотехнологических исследованиях хлебных злаков // *Экобиотех.* 2019. Т. 2, № 2. С. 116–127.
56. Osborne D., McManus M. Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. 268 p.

57. Wolpert L. Positional information and Pattern Formation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. V. 117. P. 597–608.

58. 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.

59. Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* (обзор) // *Биомика*. 2021. Т. 13, № 1. С. 8–19.

60. Чураев Р.Н. Контуры неканонической теории наследственности: от генов к эпигенам // *Журнал общей биол.* 2005. Т. 66, № 1. С. 13–36.

61. Чураев Р.Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // *Генетика*. 2006. Т. 67, № 9. С. 1276–1296.

62. Чураев Р.Н. Эпигены – наследственные единицы надгенного уровня // *Экол. генетика*. 2010. Т. VIII, № 4. С. 17–24.

63. Галимзянов А.В., Ступак Е.Э., Чураев Р.Н. Эпигенные сети: теория, модели, эксперимент // *Успехи соврем. биологии*. 2019. Т. 139, № 2. С. 107–113.

64. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Феномен образования пыльцевых трубок в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // *Экобиотех.* 2020. Т. 3, № 1. С. 1–12.



**PATHWAYS OF *IN VITRO* MORPHOGENESIS OF PLANT ANDROCLYNIC CALLI CELLS:  
POSSIBLE ROLE OF THE POSITIONAL LOCATION OF TARGET CELLS  
AND THE ACTION OF EPIGENETIC FACTORS**

© N.N. Kruglova

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The review article deals with the problem of a model approach to studying complicated problems of plant development biology. The definition of callus is given as the integrated system formed both exogenously (as a result of the proliferation of surface cells of various tissues of the plant organism) and endogenously (deep in tissues); this system initially consists of homogeneous cells transformed gradually into a system of groups of heterogeneous cells with species-specific morphogenetic potentials realized in various ways of morphogenesis. The issues related to the recognition of critical stages of *in vitro* callus formation are analyzed. The formation of callus under *in vitro* conditions on the induction medium is discussed. The estimation for morphogenesis of callus cells on the regeneration medium *in vitro* is given. Special attention is paid to the analysis of morphogenesis pathways in androclynec calli obtained from microspores in the *in vitro* culture of isolated plant anthers. The concepts about the positional location of target cells and the manifestation of epigenetic factors in relation to the morphogenesis pathways of androclynec callus cells are analyzed.

Emphasis is laid on the universality of plant morphogenesis processes in natural *in planta* conditions and *in vitro* experiments.

Key words: plant morphogenesis, *in vitro* anther culture, callus.