

**ПЕРИОДИЗАЦИИ ЗИГОТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЗЛАКОВ *IN PLANTA*
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VITRO***

© А.Е. Зинатуллина

В современных биотехнологических исследованиях коммерчески ценных злаков большой интерес вызывают перспективные направления эмбриокультуры и каллусной культуры *in vitro*, связанные с использованием разновозрастных зиготических зародышей, формирующих полноценные растения-регенеранты. Эти биотехнологии во многом базируются на использовании морфогенетического потенциала клеток зародышей, главным образом незрелых. В то же время развитие таких биотехнологий ограничивается отсутствием единой унифицированной периодизации зиготического эмбриогенеза злаков *in planta*. Сложность разработки единой периодизации обусловлена как спецификой протекания эмбриогенеза злаков согласно особому Graminad-типу, так и морфологией зрелого зародыша, для которого характерны уникальные органы – щиток, колеоптиль, эпибласт, мезокотиль, колеориза. В статье приведен краткий обзор работ, посвященных выявлению структурных особенностей зародышей злаков в динамике развития в естественных условиях от зиготы до зрелой структуры. Особое внимание обращается на сравнительный анализ предложенных периодизаций зиготического эмбриогенеза *in planta*, особенно используемых в биотехнологических исследованиях *in vitro* представителей этого семейства. Подчеркивается, что биотехнологические и иные экспериментальные исследования с использованием зародышей злаков должны базироваться на данных классической описательной эмбриологии растений.

Ключевые слова: зародыш, зиготический эмбриогенез *in planta*, эмбриокультура *in vitro*, каллусная культура *in vitro*, хлебные злаки.

В современных биотехнологических исследованиях коммерчески ценных злаков большой интерес вызывают перспективные экспериментальные направления, связанные с использованием разновозрастных зиготических зародышей с дальнейшим формированием из них регенерантов, такие как эмбриокультура *in vitro* [1–3] и каллусная культура *in vitro* [3–6]. Выявлено, что успех в формировании полноценных регенерантов злаков *in vitro* при использовании этих биотехнологий определяется комплексом взаимосвязанных факторов: эндогенных (генотип донорного растения, стадия развития зародыша/донорного растения, свойства клеток зародыша и др.) и экзогенных (условия выращивания донорных растений, предварительное стрессовое воздействие на эксплант/донорное растение, состав индукционной среды, физические условия культивирования *in vitro* и др.) [7–12].

Основной эндогенный фактор – стадия развития зародыша, который вводится в культуру *in vitro*, поскольку от статуса такого зародыша зависят все его морфогенетические свойства [13].

При оценке экспланта – зрелого или незрелого зародыша злаков – исследователи, как правило, не указывают, на какой стадии эмбриогенеза находится эксплант в момент инокуляции на индукционную питательную среду. В то же время, по мнению ряда авторов [14, 15], стадия развития инокулируемого зародыша *in planta* – один из важнейших факторов формирования регенерантов в культуре *in vitro*. Для выявления оптимальной для применения в биотехнологических исследованиях стадии развития зародыша необходимо применение унифицированных периодизаций эмбриогенеза злаков, основанных на данных классической эмбриологии злаков.

Цель данного обзора – проанализировать структурные особенности формирования и развития зиготических зародышей и разработанные на их основе периодизации эмбриогенеза злаков *in planta* с позиции перспективности их использования в биотехнологических исследованиях *in vitro* представителей этого семейства.

Общая характеристика зиготического эмбриогенеза злаков *in planta*. Эмбриогенез растений, размножающихся в естественных условиях *in planta* путем амфимиксиса, представляет собой единый сложный процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый многоклеточный зародыш согласно определенным паттернам клеточных делений (обзоры и монографии: [16–19]).

Уже на самых ранних этапах исследований этого процесса стало ясно, что в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных фаз, различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения (по [17]).

У дудольных, зародыш которых приобретает по мере развития морфологически специфические формы, принято подразделять зиготический эмбриогенез на фазы глобулярного, сердцевидного, торпедовидного, изогнутого и зрелого зародыша (по: [16, 18]).

Для однодольных включая злаки подобной единой периодизации зиготического эмбриогенеза не представлено. Это обусловлено главным образом структурными особенностями формирования и развития зародышей у представителей этого семейства покрытосеменных растений. Эмбриологическими исследованиями установлено, что зрелый зародыш злаков выделяется специфическими органами и дорсовентральным строением. Только для зародышей злаков характерны такие специфические органы, как щиток, эпибласт, колеоптиль, мезокотиль, колеориза, сформированный эпикотиль, лигула. В зерновке такой зародыш соприкасается с эндоспермом только с одной стороны – щитком, а не окружен его тканью, как у большинства однодольных [19]. Особенности процесса развития зародыша злаков позволили выделить отдельный Graminad-тип эмбриогенеза [20]. Правомочность выделения Graminad-типа эмбриогенеза подтверждается исследованиями эмбриогенеза различных видов злаков [21].

У злаков формирование растений-регенерантов в эмбриокультуре *in vitro* протекает успешнее при использовании в качестве исходных эксплантов незрелых зародышей – в сравнении со зрелыми ([13–15] и др.). Аналогичные данные о преимуществах незрелых зародышей в индукции формирования первич-

ных морфогенных каллусов получены и в биотехнологиях каллусных культур *in vitro* злаков ([22–26] и др.). Эти результаты объясняются тем, что регенерация *in vitro* предполагает репрограммирование инициальных клеток эксплантов, к чему более предрасположены клетки онтогенетически молодых органов незрелых зародышей [5]. Кроме того, использование незрелых зародышей злаков дает существенный выигрыш во времени в сравнении с использованием зрелых семян и тем более растений на разных стадиях онтогенеза (по: [27]).

Все это определяет важность выявления статуса незрелых зародышей злаков, оптимальных для использования в биотехнологиях культивирования *in vitro*.

Для выявления такого статуса необходимо знать, на какой стадии эмбриогенеза *in planta* находятся незрелые зародыши в момент инокуляции в культуру *in vitro*. В то же время по отношению к злакам эта ситуация осложнена тем, что большинство авторов-биотехнологов указывают на использование незрелого зародыша без детализации. Иначе говоря, единая периодизация эмбриогенеза *in planta* в биотехнологических исследованиях злаков не применяется. Причины этого, по-видимому, состоят в особенностях как процесса зиготического эмбриогенеза и морфологии зародыша злаков, так и в отсутствии четких критериев временных границ стадий (фаз, периодов, этапов) эмбриогенеза злаков.

Рассмотрим, какие предложены периодизации эмбриогенеза *in planta* злаков.

Периодизации зиготического эмбриогенеза *in planta* злаков. В литературе предложено несколько периодизаций развития зиготического зародыша злаков.

Наибольшей теоретической обоснованностью отличается периодизация, разработанная Т.Б. Батыгиной ([19] и ранее). Автор выделяет в развитии зародыша злаков две фазы – бластомеризацию и органогенез, которые расценивает как критические фазы эмбриогенеза: во время таких фаз, с одной стороны, закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша, а с другой стороны, при воздействии совокупности неблагоприятных условий именно на этих фазах происходит блокирование эмбриогенеза.

В качестве «точки отсчета» в периодизации эмбриогенеза злаков исследователь принимает зиготу – клетку, образующуюся в резуль-

тате сингамии – слияния гаплоидных гамет (женской гаметы-яйцеклетки и мужской гаметы-спермия). Автор полагает, что зигота – это инициальная клетка зародыша и начальная фаза онтогенеза амфимиктически размножающихся растений. В то же время ряд исследователей относят фазу зиготы к собственно эмбриогенезу злаков (по: [21]).

В ходе созревания зиготы злаков происходит существенная ее реорганизация: изменяется объем; увеличивается число органоидов; образуются полисомы и мРНК; возрастает количество белка, РНК, ДНК; изменяется метаболизм углеводов, который проявляется в образовании непрерывной клеточной стенки и соответственной активности диктиосом; исчезают плазмодесмы из оболочки, благодаря чему зигота оказывается изолированной от зародышевого мешка и окружающих материнских тканей; создается гетероциклическая система ядра [28].

Зигота злаков характеризуются таким структурным свойством, как полярность строения, т.е. существование функционально значимых асимметричных структур, образующихся в ответ на действие векторизованных стимулов, внешних или внутренних (по [29]). В ходе дальнейшего развития такая полярность обуславливает постепенное формирование апикально-базальной организации, дифференциацию апикального и базального полюсов, апексов побега и корня у зародышей. На основе полярности зиготы возникает морфологическая ось с двумя различными полюсами: апикальным, обращенным к центральной клетке зародышевого мешка, и противоположным базальным. Апикальный полюс зиготы становится зоной синтеза белков, в то время как базальный полюс содержит осмотически активные вещества.

Форма зиготы у разных злаков различна. Так, у пшеницы эта клетка, как правило, груше-

видная, однако в процессе развития ее форма может изменяться. Дорсовентральность строения, характерная для зародышей всех злаков, устанавливается уже на стадии зиготы и проявляется на всем протяжении формирования зародыша, получая на поздних этапах все более ошутимое морфологическое выражение [19].

Бластомеризация, или фаза первичной дифференциации зародыша злаков. Как правило, через сутки после оплодотворения зигота злаков приступает к делению. Фигура первого деления располагается наклонно к продольной оси вследствие неравномерной ее вакуолизации и оказывается сдвинутой к апикальному концу клетки. В результате такого асимметричного митоза как следствия полярности зиготы образуются две неравные клетки двуклеточного проэмбрио (рис. 1, 2, 2а).

Апикальная клетка по объему оказывается меньше, чем базальная, которая к тому же более сильно вакуолизирована. Вторая клеточная перегородка обычно располагается наклонно в плоскости, перпендикулярной к первой перегородке (рис. 1, 3, 3а). Это деление, как и несколько последующих, также асимметричное и приводит к формированию клеток-производных (рис. 1, 4, 4а). Третье деление происходит в апикальной клетке зародыша, при этом клеточная перегородка также закладывается наклонно к первой (рис. 1, 4), однако ее ориентация относительно оси зародыша переменна. Следующее асимметричное деление происходит в базальной клетке. Перегородка здесь закладывается также наклонно, образуя бластомеры (рис. 1, 5, 5а). Апикальная клетка делится перегородкой вертикально, образуя две новые клетки (рис. 1, 6, 6а). В результате следующих наклонных делений образуются новые бластомеры (рис. 1, 7, 8).

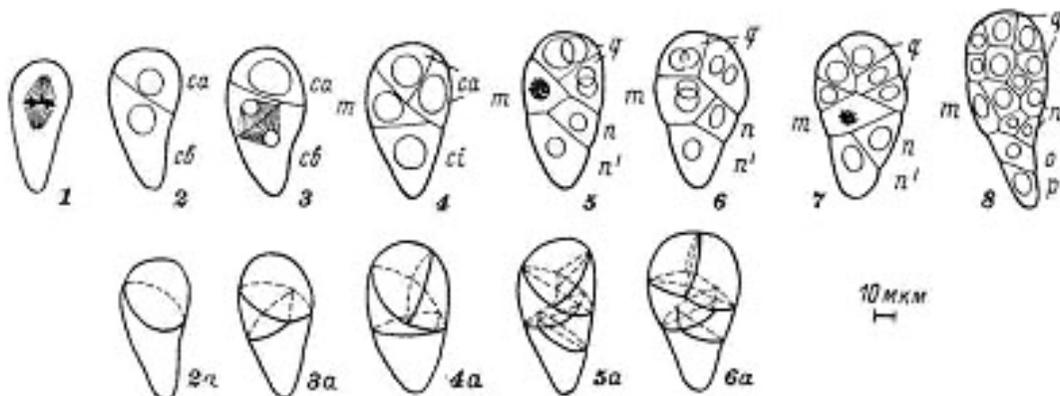


Рис. 1. Развитие зародыша злаков: фаза бластомеризации (по [19]). Пояснения в тексте

В начале фазы бластомеризации внутренние клеточные стенки зародышей пшеницы характеризуются наличием плазмодесм, обеспечивающих тесную связь между клетками и опосредующих передачу факторов роста, деления и дифференциации клеток.

На примере пшеницы выявлено [28], что клетки зародышей злаков в фазе бластомеризации (и далее в начале фазы органогенеза), как и зигота, характеризуются высокой метаболической активностью, необходимой для синтеза конституционных веществ в ходе серии делений, приводящих к увеличению числа клеток. Это подтверждается наличием в клетках зародышей хорошо развитых митохондрий и пластид; в цитоплазме клеток зародышей визуально возрастает количество и длина цистерн ЭПР; агранулярный ЭПР располагается, как правило, между липидными каплями, и, по-видимому, участвует в их синтезе; пролиферация агранулярного ЭПР связана с синтезом материалов, необходимых для построения клеточных стенок. В этом процессе также участвует комплекс Гольджи, активность которого в клетках зародышей возрастает, что проявляется в появлении везикул, отделяемых от его цистерн. Наличие цистерн гранулярного ЭПР, а также возрастание числа полисомов обычно связано с активным синтезом белка. Выявленное в клетках зародышей на этих фазах развития возрастание количества митохондрий, усложнение их внутренней мембранной структуры и расположение их рядом с липидными каплями, возможно, свидетельствует о возрастании энергозатрат клеток, как это показано на других растениях и для других органов [30].

Фаза органогенеза. В течение этой фазы в результате пульсирующих делений в определенных кластерах клеток зародыш злаков становится многоклеточным, образуются его уникальные органы и структуры. В процессе роста и развития зародыша сильно изменяется его форма (рис. 2).

Во всех сложных преобразованиях, происходящих в ходе органогенеза, определяющую роль играют последовательные изменения ритма митотической активности и ориентация клеточных делений в разных областях зародыша, что обуславливает своеобразное положение и строение органов зародыша злаков. В местах активных делений клетки меньших размеров и богаче цитоплазмой; там, где митозы редки, они

крупнее, более вакуолизированы и беднее цитоплазмой. По степени окрашиваемости клеток можно судить об очагах меристематической активности в развивающемся зародыше и об определенных «волнах» митотических делений. Когда зародыш достигает значительной степени дифференциации и формируются все его органы, митозы обнаруживаются как в апикальной и базальной частях щитка, так и в некоторых других зонах зародыша (корень и др.).

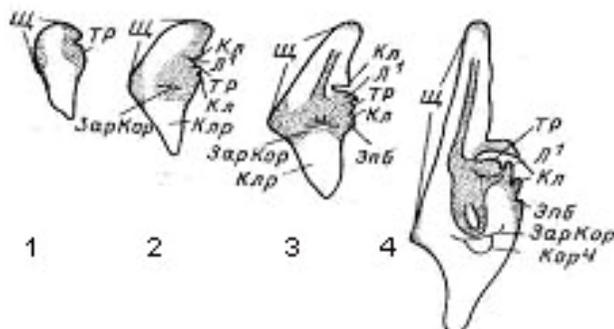


Рис. 2. Схема развития зародыша злаков: фаза органогенеза (по [19]). Условные обозначения: ЗарКор – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Клр – колеориза, КорЧ – корневой чехлик, Л – лист, ТР – точка роста, Щ – щиток, Эпб – эпибласт

Через несколько суток после оплодотворения происходит разрастание апикально-латеральной области проэмбрио в сторону плацентохалазы. Клетки этой области активно делятся, они несколько крупнее, чем клетки с противоположной стороны зародыша, где вскоре будет формироваться апекс побега. Дальнейшее разрастание апикально-латеральной области зародыша приводит к образованию щитка. В это время значительное увеличение размеров клеток наблюдается и в верхней центральной части зародыша.

В ходе дальнейшего развития происходят сложные преобразования, в результате которых щиток из латерального положения переходит в терминальное положение, свойственное зрелому зародышу. Таким образом, в зародыше злаков органогенез начинается с образования щитка.

Основная функция щитка – установление связи между эндоспермом и всеми структурами зародыша. Щиток состоит из гетерогенных клеток. Эпидермис щитка, прилегающий непосредственно к эндосперму, имеет специфическую форму и строение. В специализированном эпидермальном слое, содержащем большое количество гидролитических ферментов, происходят

превращения веществ, поступающих из эндосперма в зародыш и в дальнейшем в проросток.

В процессе развития зерновки и при ее прорастании в клетках щитка происходят значительные изменения. На щитке формируется лигула (брюшная чешуя), представляющая собой вырост щитка. Его клетки рассматривают как передаточные и секреторные. В щитке дифференцируется проводящая система в виде прокамбиального тяжа.

Несколько позднее, после начала разрастания щитка, наблюдается увеличение количества митотически делящихся клеток в зоне образования апекса побега (точки роста), который закладывается терминально. Дальнейшее развитие этой области приводит к появлению перетяжки, разделяющей семядолю и точку роста, а затем – к обособлению колеоптиля, дифференциации листьев и точки роста почки (плюмулы). Колеоптиль имеет форму полого конуса с расположенным в верхней его части отверстием, через которое побег выходит наружу во время прорастания. Главная функция колеоптиля состоит в защите конуса нарастания при «пробивании» почвы прорастающим семенем (по [19, 21]).

Заложение колеоптиля и дифференциация прокамбиального тяжа в щитке совпадают по времени с началом образования первого зародышевого корня, поэтому область митотической активности видна в это время в центральной части зародыша и в основании щитка, где начинается дифференциация прокамбия. Таким образом, формирование корня начинается эндогенно в базальной части зародыша, вблизи основания щитка. Дерматоген корня образуется из внешнего слоя периллемы.

У различных видов злаков в зародыше может закладываться разное количество адвентивных корней, например, у пшеницы – 2–4, у ржи – 3–4, а у кукурузы – 5. Корневой чехлик и колеориза (корневое влагалище) возникают и развиваются как единое образование, и лишь в конце эмбриогенеза, когда зародыш созревает, происходит отделение колеоризы от чехлика. Функция колеоризы – защита зародышевого корня, а также поставка воды и питательных веществ, необходимых для роста корня (или корней) при прорастании. Так, в клетках колеоризы пшеницы обнаружены алейроновые зерна.

Эпибласт дифференцируется позже, чем корень, и располагается на стороне, противоположной щитку, образуя чешуевидный вырост, не содержащий сосудов. По характеру строения

клеток эпибласт близок к колеоризе. У пшеницы в отдельных клетках обнаружены алейроновые зерна, сходные с таковыми щитка и колеоризы. Судя по изменению формы и размеров клеток при прорастании зерновки, эпибласт, так же как и колеориза, поставляет воду развивающемуся зародышу.

Различия в функциях щитка (выполняющего гаусториальную роль) и эпибласта (поглощающего влагу в момент прорастания зерна) позволяют понять также более позднее заложение и развитие последнего. Эпибласт не контактирует, как щиток, с эндоспермом; возможно, этим и определяется его функция. Наличие эпибласта или отсутствие, а также его размеры зависят от условий произрастания той или иной группы злаков, что имеет существенное значение при прорастании зерновки.

Высказано мнение (по [21]), что эпибласт, колеоптиль и семядоля-щиток представляют собой единую структуру. Семядоли – продукт деятельности апикальной меристемы зародыша, поэтому щиток и эпибласт рассматриваются как семядоля и первый, модифицированный лист, соответственно.

На одном из этапов органогенеза зародыша происходит дальнейшая дифференциация почечки (плюмулы). Внутри нее дифференцируются листья, закладывающиеся валиком, количество которых у разных видов злаков различно (от 2 до 4). Зачаточный побег представляет собой ось, состоящую из узлов и междоузлий. Междоузлия сближены и имеют вид «пачки» плоских дисков. В каждом междоузлии формируется лист путем интеркалярного роста. Рост конуса нарастания происходит за счет инициальных клеток апикальной меристемы, находящейся на самой верхушке побега.

Для зрелого зародыша большинства злаков характерно наличие следующих органов: щитка, эпибласта, колеоптиля, мезокотили, колеоризы, почечки, состоящей из нескольких примордиев листьев, и корня (или нескольких корней). Зародыши таких злаков, как пшеница, рожь, ячмень и овес, относятся к фестукоидному типу развития (у них имеется эпибласт), тогда как зародыш кукурузы – к паникоидному (эпибласт отсутствует) [19].

В литературе представлены различные взгляды на морфологическую сущность органов зародыша злаков. Щиток принимают за единственную настоящую семядолю, колеоптиль – за ее вырост или за первый лист почечки (по [21]).

Своеобразный способ развития и строения раннего проэмбрио наряду с особенностями органогенеза и строения зрелого зародыша позволили выделить развитие зародыша злаков в особый тип эмбриогенеза – Graminad-тип [20]. Тип Graminad характеризуется серией наклонных перегородок (по отношению к продольной оси зародыша), обуславливающих дорзовентральность внутреннего строения раннего проэмбрио и зрелого зародыша, а также специфичной органогенеза и уникальным строением органов, присущих только зародышу злаков.

Таким образом, среди растений злаки выделяются особенностями как процесса эмбриогенеза (выделен Graminad-тип эмбриогенеза), так и строения зрелого зародыша, достигающего высокой степени дифференциации.

Проанализированная выше периодизация зиготического эмбриогенеза злаков предполагает выделение фаз бластомеризации и органогенеза. Такая периодизация теоретически обоснована. В то же время использование этой периодизации в практике биотехнологических исследований злаков представляет определенные сложности, связанные, например, с отсутствием морфологического и временного критериев выделяемых фаз эмбриогенеза.

В работе [31] предложена более подробная периодизация эмбриогенеза злаков. Обобщив результаты детальных гистологических исследований зародыша пшеницы в динамике развития от зиготы до зрелой структуры, через каждые 0,5 сут после искусственного опыления, автор предлагает на основании морфологических (длина зародыша) и временных (сутки после искусственного опыления) данных выделять следующие этапы и стадии зиготического эмбриогенеза злаков *in vivo*, с характеристикой значения каждой стадии в процессе эмбриогенеза.

I. Этап недифференцированного зародыша. Включает стадии: зигота; двуклеточный зародыш; четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш.

Зигота (длина зародыша 0.001 мм, время после опыления 0.5 сут) – первая инициальная клетка нового дочернего организма, формирующаяся после осуществления процесса оплодотворения. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление полярности зародыша.

Двуклеточный зародыш (длина зародыша 0.05–0.1 мм, время после опыления 1.5–2.0 сут) состоит из апикальной и базальной клеток как

результата асимметричного деления зиготы. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление клеточной специализации зародыша.

Четырехклеточный зародыш (длина зародыша 0.12–0.14 мм, время после опыления 2.5 сут) состоит из двух клеток апикального полюса и двух клеток базального полюса как результата асимметричных делений соответствующих клеток двуклеточного зародыша. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление дорзовентральности зародыша.

Многоклеточный зародыш (длина зародыша 0.15–0.2 мм, время после опыления 3.0–4.0 сут) – результат интенсивных клеточных делений апикальной и базальной клеток двуклеточного зародыша. Значение этой стадии в эмбриогенезе: накопление массы клеток (возможно, критической), необходимой для дифференциации зародыша.

II. Этап дифференциации зародыша. Включает стадию органогенеза, которую можно подразделить на три подстадии.

В течение подстадии 1 (длина зародыша 0.4–0.6 мм, время после опыления 4.5–8.0 сут) происходят интенсивные клеточные деления в зародыше, главным образом в апикальной его части. Зародыш быстро растет. В нем постепенно формируется первый орган – щиток (единственная семядоля), закладывается точка роста – область меристематических клеток.

Во время подстадии 2 (длина зародыша 0.8–1.3 мм, время после опыления 8.5–12.0 сут) клеточные деления замедляются, что ведет к приостановке роста зародыша. Формируется еще один орган – колеоптиль.

В течение подстадии 3 (длина зародыша 1.5–2.0 мм, время после опыления 12.5–17.0 сут) клеточные деления также замедлены, рост зародыша происходит за счет растяжения клеток. Постепенно формируются апекс побега, зародышевый корень, колеориза, эпибласт, лигула. К концу этой подстадии рост зародыша постепенно снижается, а затем стабилизируется, и заметных изменений в размерах зародыша не происходит.

Значение этой стадии в эмбриогенезе: происходят важнейшие морфогенетические процессы – морфологическая дифференциация зародыша, формирование всех присущих зародышу злаков органов.

III. Этап дифференцированного зародыша. Включает стадии: сформированный зародыш, зрелый зародыш.

В сформированном зародыше (длина зародыша 2.1–2.2 мм, время после опыления 17.5–20.0 сут) наличествуют все органы, характерные для зародыша злаков. Происходит незначительный рост органов зародыша (за счет растяжения клеток), хотя размеры зародыша существенно не изменяются. Формируется первый лист. Начинается интенсивное накопление запасных питательных веществ (главным образом, крахмала), которые будут использованы в ходе прорастания. Значение этой стадии в эмбриогенезе: подготовка зародыша к вступлению в период покоя.

Такая периодизация достаточно удобна в биотехнологической практике, поскольку связывает морфологические (длина зародыша) и временные (сутки после искусственного опыления) параметры. На основе использования этой периодизации сотрудниками лаборатории физиологии растений УИБ УФИЦ РАН проведены успешные биотехнологические испытания большой группы генотипов пшеницы в эмбриокультуре [2, 3, 4, 12, 14] и в культуре зародышевых каллусов [3, 13, 24–26] *in vitro*, а также экспериментальные исследования с применением развивающихся зародышей *in planta* [28, 34, 35].

Заключение. В литературе предложено несколько периодизаций зиготического эмбриогенеза злаков *in planta*, каждая из которых имеет свои достоинства.

В целом исследователи, выясняющие общие структурно-функциональные особенности зиготического эмбриогенеза, концентрируют свои усилия в двух направлениях: получение детальных цито-гистологических характеристик отдельных фаз для разных видов растений и поиск надежных интегральных критериев для установления временных границ фаз (стадий, этапов, периодов) зиготического эмбриогенеза. Такого рода данные классической описательной эмбриологии растений *in planta* необходимы как методологическая основа оптимизации различных биотехнологических и иных экспериментальных исследований злаков *in vitro*.

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

Литература

1. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / Т.А. Thorpe, Е.С. Yeung (eds.). New York; London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.

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

3. Основы биотехнологии растений / Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: Изд-во БашГУ, 2017. 244 с.

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

5. 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. doi: 10.1134/S0475145018050038

6. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019. № 2. С. 44–54. doi: 10.31040/2222-8349-2019-2-44-54

7. Митич Н., Додиг Д., Николич Р. Влияние условий выращивания донорных растений на культуру незрелых зародышей, выделенных из широко распространенных генотипов пшеницы // Физиол. раст. 2009. Т. 56. № 4. С. 596–602.

8. Hafeez I., Sadia B., Sadaqat H. Establishment of efficient *in vitro* culture protocol for wheat land raises of Pakistan // Afr. J. Biotechn. 2012. V. 11. P. 2872–2790.

9. Zhang W., Wang X., Fan R., Yin G., Wang K., Du L., Xiao L., Ye X. 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.

10. 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.

11. Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M., Dolgov S. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species // PloS ONE. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0173533

12. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых генотипов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестник БГАУ. 2019. Т. 52. № 4. С. 37–41. doi: 10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41

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

14. Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 1. С. 42–45.

15. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза // Онтогенез.

2020. Т. 51. № 1. С. 3–18. doi: 10.31857/S0475145020010024

16. Methods in Molecular Biology. V. 427. Plant Embryogenesis / M.E. Suarez, P.V. Vozhkov (eds). Totowa, New York: Humana Press, 2008. 184 p.

17. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014. 764 с.

18. De Vries S.C., Weijers D. Plant embryogenesis // Curr. Biol. 2017. V. 27. P. 870–873. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.026

19. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 528–538.

20. Батыгина Т.Б. Graminad-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 520–526.

21. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139. № 4. С. 326–337. doi: 10.1134/S0042132419040057

22. Dagustu N. Comparison of Callus Formation and Plantlet Regeneration Capacity From Immature Embryo Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes // Biotech. Biotechnol. Equip. 2014. V. 22. P. 1–4. doi: 10.1080/13102818.2008.10817552

23. Sankepally S.S.R., Talluri V.R., Arulmariathan J.P., Singh B. Callus Induction and Regeneration Capabilities of Indica Rice Cultivars to Salt Stress // J. Biomolec. Res. Therap. 2016. V. 4. [Электронный ресурс]. DOI: 10.4172/2167–7956.1000136

24. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kруглова N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indolil-3-acetic acid in cells 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

25. 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

26. 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. 2019. № 1. С. 25–29. doi: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29

27. Зинатуллина А.Е. Модельная система «зародыш–зародышевый каллус» в экспресс-оценке стрессовых и антистрессовых воздействий (на примере злаков) // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 1. С. 38–50. doi: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-38-50

28. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 3. С. 220–233. doi: 10.7868/S0475145017030119

29. Медведев С.С. Механизмы и физиологическая роль полярности в растениях // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 502–514. doi: 10.1134/S1021443712040085

30. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига, 2004. 495 с.

31. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 2. С. 21–24.

32. Галин И.Р., Зайцев Д.Ю., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Участие цитокининов в начальных этапах эмбриогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Биомика. 2018. Т. 10. № 2. С. 141–145. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-17

33. 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

34. Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3(1). С. 114–118.

35. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kруглова N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. 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. 2019. V. 29. P. 1–9. doi: 10.1017/S0960258519000229

References

1. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / T.A. Thorpe, E.C. Yeung (eds.). New York; London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011, 377 p.

2. Kруглова N.N., Seldimirova O.A. Wheat regeneration *in vitro* and *ex vitro*: cyto-histological aspects. Ufa: Gilem, 2011, 124 p.

3. Bases of plant biotechnology / Kuluev B.R., Kруглова N.N., Zaripova A.A., Farhutdinov R.G. Ufa: BSU, 2017, 244 p.

4. Kруглова N.N. Optimization of biotechnology for obtaining wheat plants in culture *in vitro* // Izvestiya Ufinskogo nauchnogo centra RAS, 2012, no. 3, pp. 57–61.

5. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as a *in vitro* Morphogenesis Pathway in Cereals // Russ. J. Dev. Biol., 2018, vol. 49, pp. 245–259. doi: 10.1134/S1062360418050033X
6. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Callus *in vitro* as the model system for studying of plant organogenesis // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS, 2019, no. 2, pp. 44–54. doi: 10.31040/2222-8349-2019-2-44-54
7. Mitich N., Dodig D., Nikolaich R. Influence of growing conditions of donor plants on the culture of immature embryos isolated from widespread wheat genotypes // Russ. J. Plant Physiol, 2009, vol. 56, no. 4, pp. 596–602.
8. Hafeez I., Sadia B., Sadaqat H. Establishment of efficient *in vitro* culture protocol for wheat land raises of Pakistan // Afr. J. Biotechnol, 2012, vol. 11, pp. 2872–2790.
9. Zhang W., Wang X., Fan R., Yin G., Wang K., Du L., Xiao L., Ye X. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos // J. Integr. Agricult, 2015, vol. 14, pp. 11–19.
10. Khlebova L.P., Nikitina E.D. Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants // Acta Biol. Sib., 2016, vol. 2, pp. 68–75.
11. Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M., Dolgov S. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species // PloS ONE, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0173533
12. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Nikonov V.I. Identification of drought-resistant wheat genotypes in *in vitro* culture of immature embryos // Vestnik BSAU, 2019, vol. 52, no. 4, pp. 37–41. doi: 10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41
13. Kruglova N.N., Katasonova A.A. Wheat immature embryo as the morphogenetically competent explant // Physiol. Biochem. Cult. Plants, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 124–131.
14. Kruglova N.N. Detection of the critical stage of wheat embryo autonomy in *in vitro* culture // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS, 2013, no. 1, pp. 42–45.
15. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. Embryo of Flowering Plants at the Critical Stage of Embryogenesis Relative Autonomy (by Example of Cereals) // Russ. J. Dev. Biol., 2020, vol. 51, pp. 1–15. doi: 10.1134/S1062360420010026
16. Methods in Molecular Biology. V. 427. Plant Embryogenesis / M.E. Suarez, P.V. Bozhkov (eds). Totowa, New York: Humana Press, 2008, 184 p.
17. Batygina T.B. Plant developmental biology. SPb.: DEAN, 2014. 764 p.
18. De Vries S.C., Weijers D. Plant embryogenesis // Curr. Biol., 2017, vol. 27, pp. 870–873. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.026
19. Batygina T.B. Embryogenesis of cereals // Embryology of flowering plants. Terminology and concepts, vol. 2, Seed. SPb.: Mir i sem'ya, 1997, pp. 528–538.
20. Batygina T.B. Graminad-type of embryogenesis // Embryology of flowering plants. Terminology and concepts, vol. 2, Seed. SPb.: Mir i sem'ya, 1997, pp. 520–526.
21. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // Biol. Bull. Rev., 2020, vol. 10, no. 2, pp. 115–126. doi: 10.1134/S2079086420020048
22. Dagustu N. Comparison of Callus Formation and Plantlet Regeneration Capacity From Immature Embryo Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes // Biotech. Biotechnol. Equip, 2014, vol. 22, pp. 1–4. doi: 10.1080/13102818.2008.10817552
23. Sankepally S.S.R., Talluri V.R., Arulmariamathan J.P., Singh B. Callus Induction and Regeneration Capabilities of Indica Rice Cultivars to Salt Stress // J. Biomolec. Res. Therap, 2016, vol. 4 [Электронный ресурс]. DOI: 10.4172/2167-7956.1000136
24. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indolil-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2016, vol. 52, pp. 251–264. doi: 10.1007/s11627-016-9767-4
25. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Potentially morphogenic wheat callus in culture *in vitro* // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS, 2018, no. 2, pp. 61–65. doi: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-61-65
26. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Histological status of wheat embryo on stage of organogenesis *in vivo* optimal for obtaining of morphogenic callus *in vitro* // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS, 2019, no. 1, pp. 25–29. doi: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29
27. Zinatullina A.E. Model system "embryo-embryonic callus" in the express-assessment of stress and anti-stress effects (on the example of cereals) // Ecobiotech, 2020, vol. 3, no 1, pp. 38–50. doi: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-38-50
28. Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Titova G.E., Batygina T.B. Comparative ultrastructural 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. Develop. Biol., 2017, vol. 48, pp. 185–197. doi: 10.1134/S1062360417030109
29. Medvedev S.S. Mechanisms and physiological role of polarity in plants // Russ. J. Plant Physiol, 2012, vol. 59, no. 4, pp. 502–514. doi: 10.1134/S1021443712040085
30. Chentsov Yu.S. Introduction to cell biology. M.: Akademkniga, 2004, 495 p.

31. Kruglova N.N. Periodization of wheat embryogenesis as the methodological aspect of biotechnological designs // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS*, 2012, no. 2, pp. 21–24.

32. Galin I.R., Zaytsev D.Yu., Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Involvement of cytokinins in the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat embryo callus // *Biomics*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 141–145. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-17

33. 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 Local of Indoleacetic and Abscisic

Acids // *Russ. J. Dev. Biol.*, 2019, vol. 50, no. 3, pp. 124–135. doi: 10.1134/S1062360419030056

34. Seldimirova O.A., Galin I.R., Kruglova N.N., Veselov D.S. Distribution of IAA and ABA in developing wheat embryo *in vivo* // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS*, 2017, no. 3(1), pp. 114–118.

35. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. 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.*, 2019, vol. 29, pp. 1–9. doi: 10.1017/S0960258519000229



PERIODIZATIONS OF CEREAL ZYGOTIC EMBRYOGENESIS *IN PLANTA* AND IT'S USE IN BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH *IN VITRO*

© **A.E. Zinatullina**

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS,
69, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

In modern biotechnological studies of commercially valuable cereals, promising areas of great interest are the embryo culture and callus culture *in vitro*, associated with the use of zygotic embryos of different ages that form full-fledged regenerated plants. These biotechnologies are largely based on the use of the morphogenetic potential of embryonic cells, mainly immature ones. At the same time, the progress of such biotechnologies is limited by the lack of a single unified periodization of cereal zygotic embryogenesis *in planta*. The difficulty of creating a single periodization is due to both the specifics of the course of cereal embryogenesis according to a special Graminad-type and the morphology of the mature embryo, which is characterized by unique organs – the scutellum, coleoptile, epiblast, mesocotylt, coleorhiza. The article provides a brief review of the works devoted to the identification of the structural features of cereal embryos in the dynamics of development in natural conditions from the zygote to the mature structure. Special attention is paid to the comparative analysis of the proposed periodizations of zygotic embryogenesis *in planta*, especially those used in biotechnological studies *in vitro* of members of this family. It is emphasized that biotechnological and other experimental studies using cereal embryos should be based on the data of classical descriptive plant embryology.

Key words: embryo, zygotic embryogenesis *in planta*, embryo culture *in vitro*, callus culture *in vitro*, cereals.