

УДК 633.16:57.085.23:57

Обзор

DOI: 10.31040/2222-8349-2023-0-3-31-37

**ЭМБРИКУЛЬТУРА *IN VITRO* КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД:  
ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ (НА ПРИМЕРЕ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ)**

© А.Е. Зинатуллина

На примере литературных и собственных данных анализируется использование метода эмбриокультуры, состоящего в культивировании *in vitro* разновозрастных зиготических зародышей, в современных биотехнологических исследованиях хлебных злаков. Особое внимание уделяется оценке культивирования *in vitro* незрелых зародышей как более эффективных эксплантов в сравнении со зрелыми зародышами, с предположительным объяснением такой эффективности. Дается анализ периодизации эмбриогенеза хлебных злаков и выявлении на ее основе критических стадии относительной автономности незрелых зародышей. Обсуждаются способ получения регенерантов из незрелых зародышей в условиях *in vitro* и *ex vitro* через этап формирования морфогенных каллусов, а также способ прямого получения регенерантов, минуя этап формирования каллусов. Приводятся примеры успешного применения метода эмбриокультуры *in vitro* при разработке способов повышения адаптации незрелых зародышей/морфогенных каллусов/регенерантов к стресс-фактору засухи. Оцениваются как возможности, так и ограничения эмбриокультуры *in vitro* как биотехнологического метода. Подчеркивается, что метод эмбриокультуры *in vitro* подтверждает справедливость принципа универсальности процессов морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях, выдвинутый Т.Б. Батыгиной (2014 и ранее).

Ключевые слова: эмбриогенез растений, эмбриокультура *in vitro*, биотехнология, хлебные злаки.

Метод эмбриокультуры состоит в культивировании *in vitro* разновозрастных зиготических зародышей. Этот метод используется в биотехнологических исследованиях растений как способ получения регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro* через этап формирования морфогенных каллусов. В то же время это один из немногих биотехнологических способов прямого получения регенерантов минуя этап формирования каллусов.

Цель данного обзора – провести анализ литературных и собственных данных с позиции оценки как возможностей, так и ограничений использования метода эмбриокультуры *in vitro* в биотехнологических исследованиях растений на примере хлебных злаков.

**Общая характеристика метода эмбриокультуры *in vitro*.** Конечная цель различных биотехнологий растений – получение полноценных фертильных регенерантов в культуре *in vitro* и далее в условиях *ex vitro*. Многочисленными исследованиями различных видов растений, в том числе хлебных злаков, выявлено, что успех в формировании регенерантов определяется

комплексом взаимосвязанных эндогенных (генотип донорного растения, эпигенетические свойства экспланта, тип и возраст экспланта/донорного растения, свойства клеток эксплантов 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.) факторов (по [1]).

Один из важнейших эндогенных факторов – тип экспланта. К удачным эксплантам можно отнести зиготические зародыши. Культивирование разновозрастных зиготических зародышей лежит в основе метода эмбриокультуры *in vitro* [2]. Основоположителем данного метода считается Е. Hannig (1904, по [2]), первым выделивший в асептических условиях зрелые зародыши растений родов *Raphanus* и *Cochlearia* и культивировавший их на питательной среде, дополненной сахарозой, с получением нормальных проростков. В течение последующих лет метод активно разрабатывался различными исследователями на примере представителей многих семейств как покрытосеменных, так и голосеменных растений.

Метод эмбриокультуры *in vitro* используется в различных целях, таких как исследование физиологических, биохимических и иных факторов, контролируемых эмбриональный и пост-эмбриональный морфогенез; изучение зародышей, полученных путем искусственного оплодотворения яйцеклеток; анализ причин преждевременного прорастания и способов преодоления покоя семян; как прием «спасения» гаплоидных зародышей, полученных путем межвидового скрещивания; как способ получения и сохранения амфидиплоидных и интерплоидных межвидовых гибридов (по [2, 3]).

Этот метод хорошо зарекомендовал себя в биотехнологических исследованиях растений, в частности хлебных злаков, как способ получения полноценных регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro* через этап формирования морфогенных каллусов и как один из немногих способов прямого получения регенерантов, минуя этап формирования каллусов. И в том, и в другом случае исследователи используют как зрелые, так и незрелые зародыши представителей этого семейства. Особенно перспективными оказались именно незрелые зародыши различных видов этого семейства ([4–7] и мн. др.). Такие результаты можно объяснить тем, что индукция формирования регенерантов предполагает репрограммирование морфогенетически компетентных инициальных клеток эксплантов, к чему более предрасположены клетки онтогенетически молодых органов [8]. Такие клетки способны к более легкому стимулированию дедифференциации в плюрипотентное состояние путем эпигенетической модификации ДНК и специфических транскрипционных факторов [9].

**Преимущества и ограничения метода эмбриокультуры *in vitro*.** Как и любой метод, связанный с использованием культивируемых *in vitro* клеток, тканей и органов, метод эмбриокультуры имеет определенные преимущества при проведении различных биотехнологических исследований. Это возможность проводить эксперименты практически круглый год в одних и тех же лабораторных условиях и на относительно небольшой площади, получать большое количество регенерантов к заданному сроку, контролировать все стадии формирования регенерантов и их развития на индукционной и регенерационной средах *in vitro*. Все это трудно, а порой невозможно регулировать при использо-

вании традиционной экспериментальной (тепличной или полевой) системы экспериментов. Кроме того, культуральные условия дают возможность детально анализировать реакции инокулированных зародышей на действие конкретных факторов питательной среды *in vitro*, поскольку при добавлении в среду определенных веществ происходит их непосредственное взаимодействие с большинством клеток эксплантов-зародышей. Тем самым к преимуществам использования зародышей *in vitro* следует отнести и возможность исследования механизмов морфогенеза на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях.

Основное же преимущество использования эмбриокультуры *in vitro*, по мнению [10], состоит в сходстве морфогенетических процессов в растениях в естественных условиях *in vivo* и в культивируемых зародышевых регенерантах *in vitro*. В таком сходстве реакций растений *in vivo* и регенерантов *in vitro* авторы видят действие принципа универсальности путей морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях [11]. Как подчеркивают исследователи, зиготический зародыш отражает морфогенетический потенциал всей особи, и степень структурной и функциональной дифференциации зародыша обусловлена не только спецификой его развития, но и условиями в развивающемся семени, опосредованно связанном с материнским организмом в целом.

В то же время применение метода эмбриокультуры *in vitro* имеет и некоторые ограничения. Так, более эффективна эмбриокультура *in vitro* именно незрелых зародышей как онтогенетически более молодых эксплантов. Однако использование этого более эффективного биотехнологического способа получения регенерантов имеет сезонное ограничение (по крайней мере, для хлебных злаков). Кроме того, биотехнологу важно правильно подобрать стадию развития инокулируемого в условиях культуры *in vitro* незрелого зародыша, в зависимости от поставленных целей эксперимента, а это потребует время и соответствующие навыки для проведения предварительной работы. Тем не менее, преимущества в получении регенерантов как прямым, так и непрямым путями (подробнее см. ниже) эмбриокультуры *in vitro* позволяют рекомендовать именно незрелые зародыши в качестве основного экспланта при различных биотехнологических исследованиях злаков.

Значительные преимущества использования эмбриокультуры *in vitro* продемонстрированы и в работах, посвященных разработке способов повышения адаптации незрелых зародышей злаков к стресс-фактору физиологической засухи, что имеет чрезвычайную актуальность при современной тенденции аридизации климата и угрозе возникновения продовольственной безопасности [12]. Важность решения этой проблемы подтверждается активными биотехнологическими разработками получения засухоустойчивых форм злаков на основе использования различных культивируемых *in vitro* эксплантов в селективных условиях, имитирующих засуху введением специальных агентов-иммитантов засухи ([13] и др.).

В использовании эмбриокультуры *in vitro* при оценке засухоустойчивости генотипов злаков в селективных условиях выделяют два направления.

Первое из них связано с прямым путем формирования регенерантов в эмбриокультуре *in vitro* [6, 10, 14]. Так, исследование [15] посвящено оценке устойчивости к индуцированному хлоридом натрия осмотическому стрессу культивируемых *in vitro* незрелых зародышей сортов яровой мягкой и твердой пшеницы, различавшихся по показателю засухоустойчивости в полевых условиях; при этом авторы также изучили эффективность различных способов клеточной селекции (жесткая, мягкая и смешанная). На основании сравнительного анализа уровня полевой засухоустойчивости сорта и реакции незрелых зародышей на способ отбора исследователи выявили, что успех регенерации при мягкой селекции определяется в большей степени регенерационным потенциалом генотипа *in vitro*, а не его устойчивостью к засухе. Авторы установили, что жесткая селекция с использованием сублетальной дозы хлорида натрия для отбора стресс-устойчивых регенерантов мягкой пшеницы возможна лишь для генотипов с высоким регенерационным потенциалом. Полученные данные соответствуют общепринятому мнению о том, что регенерация в культуре *in vitro* определяется в первую очередь особенностями генотипа донорного растения (например [16]).

В цикле работ [17–25] приведены данные многолетних исследований засухоустойчивости в селективных условиях культуры *in vitro* незрелых зародышей обширной коллекции родительских сортов и гибридных комбина-

ций прямых и реципропных скрещиваний яровой мягкой пшеницы. Исследователи с применением оценки засухоустойчивости незрелых зародышей по способности дать начало проростку, развивающемуся до фазы кущения *in vitro* в условиях, имитирующих дефицит влаги введением в состав питательной среды осмотика ПЭГ 6000 сублетальной концентрации 14%, дали оценку развитию проростков до фазы полной спелости зерна в почвенных условиях *ex vitro*, а также проанализировали лабораторную всхожесть полученных зерновок. В результате исследований выявлены генотипы, характеризующиеся как способностью незрелых зародышей к формированию проростков в селективных условиях имитации засухи, так и достаточно высокой лабораторной всхожестью зерновок. Выявленные засухоустойчивые генотипы пшеницы рекомендованы авторами в качестве исходных форм к включению в селекционные программы по созданию районированных сортов, перспективных по признаку устойчивости к засухе. Кроме того, исследователи подчеркивают, что выявление и селективный отбор *in vitro* толерантных к дефициту воды незрелых зародышей позволяет дать экспресс-диагностическую оценку засухоустойчивости каждого вновь создаваемого сорта (первоначально – гибридной комбинации) пшеницы. Ускорение в данном случае достигается за счет того, что гибридная комбинация диагностируется на засухоустойчивость на самой ранней стадии онтогенеза – зародыше, а не путем лабораторной оценки зрелого зерна или полевой оценки растения, как это принято в рутинной селекционной практике. Этот вывод, по мнению исследователей, можно отнести к селекционным исследованиям всех хлебных злаков.

Второе направление исследований связано с непрямым путем образования регенерантов в эмбриокультуре *in vitro* через этап формирования морфогенных каллусов [26, 27]. Отбор в каллусных культурах *in vitro* устойчивых к водному дефициту форм проводится по показателю роста каллусов, отражающегося в увеличении их размеров и сырой/сухой массы, а также активности митозов в клетках [28]. Большое значение придается и оценке действия антистрессовых регуляторов роста и развития растений в зародышевых каллусных культурах злаков *in vitro* [29].

**Незрелые зародыши злаков как перспективные экспланты в биотехнологии эмбриокультуры *in vitro*.** С биотехнологическим использованием незрелых зародышей в эмбриокультуре *in vitro* злаков тесно связана проблема выявления стадии развития инокулируемого зародыша как один из важнейших эндогенных факторов успешного формирования регенерантов. Однако за редким исключением исследователи не сообщают, на какой именно стадии развития находятся инокулируемые незрелые зародыши. Как правило, указывается время, прошедшее от опыления до инокуляции зародышей на индукционную среду, реже – длина инокулируемых зародышей. Причина этого заключается, по-видимому, в отсутствии единой унифицированной периодизации зиготического эмбриогенеза злаков, основанной, во-первых, на детальном гистологическом анализе с выявлением четких морфологических и временных границ стадий развития зародышей, во-вторых, удобной в биотехнологической практике, особенно при массовой сезонной работе. В то же время сложность разработки единой периодизации обусловлена как спецификой протекания эмбриогенеза злаков (эмбриологами выделен особый Graminad-тип развития зародышей злаков), так и специфической морфологией зрелого зародыша, для которого характерны дорзовентральность строения и наличие уникальных органов (щиток, колеоптиль, эпипласт, колеориза) [30–32].

С позиции классической эмбриологии растений на примере яровой мягкой пшеницы на основании детальном морфологическом (длина зародыша), временном (сутки после искусственного опыления) и гистологическом анализе по развитию зародышей от зиготы до зрелой структуры разработана периодизация эмбриогенеза злаков [33]. Предложено выделять следующие этапы и стадии эмбриогенеза: этап недифференцированного зародыша (включает стадии: зигота, двуклеточный зародыш, четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш); этап морфологической дифференциации зародыша (включает стадии: начало органогенеза, активный органогенез, завершение органогенеза); этап дифференцированного зародыша (включает стадии сформированного зародыша и зрелого зародыша). Эта периодизация апробирована на примере сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы при детальном сравнительном исследовании формирования

регенерантов зародышами на выделенных стадиях эмбриогенеза. Выявлено, что разновозрастные зародыши одного и того же генотипа по-разному реагируют на одни и те же условия культивирования *in vitro* [34]. Полученные результаты подтверждают данные эмбриологии растений о том, что зиготический зародыш в своем морфогенезе проходит ряд дискретных взаимосвязанных стадий, различающихся как по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, так и значению для дальнейшего развития. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию морфогенетического потенциала зародыша и онтогенетической программы развития особи в целом, а зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов (по [11]).

В контексте данного обзора важно охарактеризовать те стадии эмбриогенеза злаков, когда незрелый зародыш способен или самостоятельно дать начало регенеранту (прямой путь эмбриокультуры *in vitro*) или дать начало морфогенному каллусу с последующим формированием регенеранта в каллусе (непрямой путь эмбриокультуры *in vitro*). В результате анализа обширной коллекции сортов и гибридных комбинаций яровой мягкой пшеницы выявлено, что при прочих равных условиях (состав индукционной среды, физические условия культивирования *in vitro* и др.) морфогенный каллус формируют незрелые зародыши на 12–13 сут после опыления, находящиеся в стадии активного органогенеза, тогда как на прямой путь формирования регенерантов *in vitro* вступают незрелые зародыши на 15–17 сут после опыления, находящиеся в стадии завершения органогенеза. В зависимости от целей исследования биотехнолог в качестве экспланта может отобрать незрелые зародыши на конкретной стадии эмбриогенеза в определенное время после опыления (массового цветения) яровой мягкой пшеницы [34].

Особый интерес с позиции биотехнологии вызывает стадия завершения органогенеза, когда инокулированные незрелые зародыши злаков вступают на прямой путь формирования регенерантов *in vitro*. Эту стадию относят к критическим в эмбриогенезе злаков.

Проблема критических стадий эмбриогенеза цветковых растений и критериев их выявления в литературе поставлена достаточно давно

(история вопроса подробно изложена в работах [32, 35]). В частности, Т.Б. Батыгиной [11] предложено выделять критическую стадию относительной автономности зародыша как проявления автономизации онтогенеза особи. Автор полагает, что на стадии относительной автономности зародыш становится независимым относительно физиологических факторов материнского организма, главным образом гормонов. Иначе говоря, именно на стадии относительной автономности закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша как нового организма. Учитывая, что становление автономности – сложный длительный процесс, автор предлагает ввести понятие «степень автономности» как количественное и временное выражение зависимости зародыша от материнского организма.

Предложены два критерия выявления стадии относительной автономности зародышей растений: первый – способность зародышей завершить эмбриогенез и сформировать нормальные проростки в культуре *in vitro* на безгормональной среде [11]; второй (более жесткий) – способность зародышей не только завершить эмбриогенез и сформировать проростки на безгормональной среде, но и дать начало полноценным фертильным регенерантам в условиях *ex vitro*, с анализом лабораторной всхожести полученных зерновок [19]. Можно полагать, что незрелые зародышей злаков, оптимальные для использования в эмбриокультуре *in vitro* с целью прямого получения растений-регенерантов в условиях *in vitro* и далее *ex vitro*, находятся в критической стадии эмбриогенеза, поскольку их выявление соответствует критериям выявления этой стадии – как первому, так и второму.

С позиции предложенной периодизации эмбриогенеза злаков [33], критическая стадия относительной автономности незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы в условиях выполненных экспериментов соответствует стадии завершения органогенеза этапа морфологической дифференциации зародыша. Готовность зародышей пшеницы в стадии относительной автономности эмбриогенеза к самостоятельному развитию должна характеризоваться и рядом физиологических признаков, главным образом наличием в них эндогенных ауксинов и цитокининов как ключевых гормонов морфогенеза. Специальных поэтапных исследований этого вопроса, судя по доступной литературе, для пшеницы не проводилось.

**Заключение.** История изучения разных аспектов метода эмбриокультуры *in vitro* на примере различных растений насчитывает более чем 110 лет. За это время накоплен большой экспериментальный материал и сделаны важные теоретические обобщения.

Этот метод используется в биотехнологических исследованиях растений как не прямой путь получения регенерантов (через этап формирования морфогенных каллусов). В то же время это один из немногих биотехнологических способов прямого пути получения регенерантов минуя этап формирования каллусов.

Выявлено, что тот или иной путь получения полноценных регенерантов как конечной цели биотехнологических исследований зависит в основном от стадии развития инокулируемого зародыша, при этом именно незрелые зародыши, как онтогенетически более молодые структуры, являются более эффективными эксплантами по сравнению со зрелыми.

Исследователи используют незрелые зародыши той или иной стадии развития в зависимости от целей проводимых экспериментов, связанных с прямым или непрямым путями формирования регенерантов. Однако и в том, и другом случае культивирование *in vitro* именно незрелых зародышей с целью формирования полноценных регенерантов позволяет экономить время и дорогостоящие материалы при биотехнологических исследованиях.

В целом метод эмбриокультуры *in vitro* злаков можно оценивать как один из перспективных современных биотехнологических подходов. Важно и то, что этот метод лишней раз подтверждает справедливость принципа универсальности процессов морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях, выдвинутый Т.Б. Батыгиной ([11] и ранее).

*Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 075-01134-23-00 по теме № 123020800002-2.*

#### Литература

1. Основы биотехнологии растений / Кулуев Б.Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Уфа: БашГУ, 2017. 244 с.
2. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / Ed. by T.A. Thorpe, E.C. Yeung. New York; London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.
3. Kumari P., Thaneshwari R. Embryo rescue in horticultural crops // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2018. V. 7. P. 3350–3358.

4. 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.
5. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as a *in vitro* Morphogenesis Pathway in Cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018. V. 49. P. 245–259.
6. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. et al. Embryo of Flowering Plants at the Critical Stage of Embryogenesis Relative Autonomy // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. P. 1–15.
7. 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.
8. Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* // Биомика. 2021. Т. 13. № 1. С. 8–19.
9. Raizada M.N., Goron T.L., Bannerjee O. et al. Loss of developmental pluripotency occurs in two stages during leaf aging in *Arabidopsis thaliana* // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2017. V. 53. P. 178–187.
10. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е. Эмбриокультура *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков // ТВАН. 2021. № 2(26). С. 127–144.
11. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
12. Plant life under changing environment: responses and management / Ed. by Tripathi D.K. Academic Press (Elsevier), 2020. 1020 p.
13. Сельдиминова О. А. Тестирование селективных агентов для оценки яровой мягкой пшеницы на устойчивость к засухе // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 1. С. 51–62.
14. Kruglova N.N., Zinatullina A.E. *In Vitro* Culture of Autonomous Embryos as a Model System for the Study of Plant Stress Tolerance to Abiotic Factors (on the Example of Cereals) // *Biology Bulletin Reviews.* 2022. No 2. P. 201–211.
15. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. 2014. № 3. С. 46–50.
16. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406.
17. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 57–61.
18. Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 1. С. 42–45.
19. Круглова Н.Н. Выявление автономности зародыша пшеницы как этап разработки экспресс-диагностической биотехнологии получения засухоустойчивых образцов // Пермский аграрный вестник. 2014. № 1. С. 38–43.
20. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление относительной автономности *in planta* зиготических зародышей яровой мягкой пшеницы для оптимизации биотехнологических исследований // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3. С. 28–33.
21. Круглова Н.Н., Сельдиминова 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.
22. Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Лабораторная оценка регенерантов гибридных комбинаций пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro* // Экобиотех. 2021. Т. 4. № 2. С. 81–88.
23. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Эмбриогенез *in vivo* засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы, полученных в эмбриокультуре *in vitro* // ТВАН. 2022. № 1(29). С. 65–78.
24. Зинатуллина А.Е. Оценка засухоустойчивости хлебных злаков на основе эмбриологических данных (на примере пшеницы) // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 1. С. 26–40.
25. Зинатуллина А. Е. К вопросу о комплексной оценке засухоустойчивости пшеницы в полевых и лабораторных условиях // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 3. С. 108–117.
26. 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.* 2018. V. 8. P. 518–526.
27. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллусные культуры *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков // ТВАН. 2021. № 1(25). С. 124–139.
28. Seldimirova O.A., Bezrukova M.V., Galin I.R. et al. 24-Epibrassinolide Effect on *in vitro* Callus Tissue Formation, Growth, and Regeneration in Wheat Varieties with Contrasting Drought Resistance // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 919–929.
29. 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.
30. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // *Biology Bulletin Reviews.* 2020. V. 10. № 2. P. 115–126.
31. Зинатуллина А.Е. Периодизации зиготического эмбриогенеза злаков *in planta* и их использование в биотехнологических исследованиях *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2022. № 1. С. 60–69.

32. Kruglova N.N., Titova G.E., Zinatullina A.E. Critical stages of cereal embryogenesis: theoretical and applied significance // Russ. J. Dev. Biol. 2022. V. 53. № 6. P. 405–420.

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

34. Круглова Н.Н. Тактика выбора экспланта при биотехнологических исследованиях засухоустойчивости пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro* в селекционных целях // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 2. С. 41–58.

35. Kruglova N.N., Titova G.E. Criteria for distinguishing the critical stages of early ontogenesis in flowering plants // Trends in Developmental Biology. 2022. V. 15. In press.

---

**EMBRYO CULTURE *IN VITRO* AS A BIOTECHNOLOGICAL METHOD:  
CAPABILITIES AND LIMITS (ON THE CEREALS EXAMPLE)**

© A.E. Zinatullina

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

The review article considers the use of the embryo culture *in vitro* method, which consists in the culture *in vitro* of zygotic embryos of different ages, in modern biotechnological studies of cereals, using the example of the literature and own data. Special attention is paid to the analysis of immature embryos culture *in vitro* as more effective explants in comparison with mature embryos, with a possible explanation for this effectiveness. The analysis of the cereal embryogenesis periodization and the identification of the critical stage of the relative autonomy of immature embryos on its basis is given. The method for obtaining regenerants from immature embryos under *in vitro* and *ex vitro* conditions through the stage of morphogenic callus formation, as well as the method for directly obtaining regenerants by passing the stage of callus formation, are discussed. Examples of successful application of the method in the elaboration of techniques to increase the adaptation of immature embryos/morphogenic callus/regenerants to the stress factor of drought are given. Both the possibilities and limitations of embryo culture *in vitro* as a biotechnological method are evaluated. The principle of universality of plant morphogenesis processes in natural and experimental conditions, put forward by T. B. Batygina (2014 and earlier), is confirmed.

Keywords: plant embryogenesis, embryo culture *in vitro*, biotechnology, cereals.