УДК 633.16:57.085.23:57.042

## ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОНТРАСТНЫХ ТИПОВ КАЛЛУСОВ in vitro

© 2020 г. А. Е. Зинатуллина\*

<sup>1</sup>Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия \*e-mail: aneta@ufaras.ru Поступила в редакцию 19.12.2019 г. После доработки 21.12.2019 г. Принята к публикации 30.12.2019 г.

В результате культивирования *in vitro* различных эксплантов на индукционной среде формируются каллусы контрастных типов (морфогенные и неморфогенные, органогенные и неорганогенные, эмбриогенные и неэмбриогенные, регенерационные и нерегенерационные). В статье анализируются литературные и собственные цитофизиологические данные по формированию каллусов из компетентных плюрипотентных инициальных клеток/групп клеток эксплантов; рассматриваются вопросы репрограммирования, дифференциации и дедифференциации инициальных клеток. Основное внимание уделено данным по сравнительным исследованиям цитофизиологических (гистологических и гормональных) особенностей каллусов контрастных типов. Анализируются проблемы, связанные с изучением каллусов контрастных типов, например, их трансформация при определенных условиях культивирования *in vitro*. Подчеркивается важность использования каллусов контрастных типов в качестве модельных систем для исследования сложнейшего биологического феномена – морфогенеза растений.

*Ключевые слова:* морфогенез растений, культура *in vitro*, формирование каллусов, типы каллусов, фитогормоны

DOI: 10.31857/S0042132420020040

#### введение

Каллус — интегрированная система, образующаяся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине этих тканей); изначально состоит из однородных клеток, постепенно преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток, имеющих видоспецифичные морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза (Батыгина, 1987, 2014; Батыгина и др., 2010).

Каллусы, полученные из эксплантов в контролируемых условиях *in vitro*, могут служить модельными системами для изучения различных аспектов морфогенеза — сложнейшей фундаментальной проблемы биологии развития растений. Основанием для использования каллусных моделей служат те морфогенетические события, которые происходят в культивируемых *in vitro* клетках: дифференциация/дедифференциация и рост клеток, темпы и ориентация клеточных делений, клеточный цикл, поляризация клеток, репрограммирование развития клеток, дифференциальная экспрессия генов (Бутенко, 1964, 1999; Носов, 1999; Батыгина, 2014; Ikeuchi et al., 2013, 2015, 2016, 2018, 2019; Feher, 2019), а также универсальность путей морфогенеза растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro* (Батыгина, 1987, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015). В литературе представлены данные об использовании каллусов в качестве модельных систем и при решении ряда прикладных вопросов, например в оценке стрессовых воздействий на растения (Круглова и др., 2018а)

Периодизация развития *in vitro* каллусов отсутствует, хотя отдельные попытки ее разработки предпринимались (Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011; Круглова и др., 2018в; Yu et al., 2019). Этот вопрос 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. Поэтому следует, скорее всего, говорить о формировании каллусов на индукционной среде *in vitro* и развитии клеток/групп клеток сформированных каллусов по различным путям морфогенеза на регенерационной среде *in vitro* (Круглова и др., 2018в).

Выявлено, что на индукционной среде формируются, как правило, два контрастных типа каллусов. Авторы классифицируют образовавшиеся каллусы как морфогенные и неморфогенные, органогенные и неорганогенные, эмбриогенные и неэмбриогенные, регенерационные и нерегенерационные, по способности или неспособности каллусов к морфогенезу in vitro, по различным путям, включая органогенез de novo и соматический эмбриогенез, приводящим или не приводящим к формированию регенерантов. На наш взгляд, употребление иных терминов кроме "морфогенный" и "неморфогенный" по отношению к полученным на индукционной среде каллусам методически не совсем корректно, поскольку пути морфогенеза in vitro и формирование регенерантов будут выявлены или не выявлены только в дальнейшем, на регенерационной среде. Однако в данной статье мы будем использовать терминологию авторов анализируемых работ.

Цель данной статьи, являющейся продолжением обзорных публикаций по проблемам исследования каллусогенеза *in vitro*, — провести анализ литературных и собственных данных по выявлению цитофизиологических особенностей контрастных типов каллусов, сформировавшихся на индукционной среде.

#### ФОРМИРОВАНИЕ КАЛЛУСОВ НА ИНДУКЦИОННОЙ СРЕДЕ *in vitro*

Проблема формирования каллусов затрагивает многие аспекты (Бутенко, 1964, 1999; Круглова и др., 2005, 2018в; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011; Батыгина, 2014; Ikeuchi et al., 2013, 2015, 2016, 2018, 2019; Sugiyama, 2015; Feher, 2019).

Вопросы, касающиеся цитофизиологических особенностей индукции формирования каллусов клетками и/или группами клеток эксплантов, подробно рассмотрены в обзорной статье (Круглова и др., 2018в). Однако необходимо предварительно еще раз кратко коснуться самых принципиальных моментов, связанных с формированием каллусов, поскольку без этих сведений невозможно достигнуть цели данной статьи. Кроме того, количество публикаций по теме индукции каллусогенеза *in vitro* стремительно растет, и в данную статью вошел анализ тех работ, которые не были рассмотрены в предыдущих обзорах.

В результате многочисленных исследований установлено, что в качестве эксплантов для получения каллусов *in vitro* возможно использование различных вегетативных (побеги, корни, листья, соцветия и др.) и генеративных (пыльники, семяпочки) органов, а также зародышей донорных растений.

Как правило, экспланты должны находиться на ранних стадиях развития. Так, у кукурузы Zea mays (Omer et al., 2012), веерника китайского Mis-

canthus sinensis (Qi et al., 2012), астераканты длиннолистной Asteracantha longifolia (Kumar, Nandi, 2015) наибольшая частота индукции каллусообразования получена при использовании апексов побегов. Сравнение зрелых и незрелых зародышей пшеницы (Круглова, Катасонова, 2009) и кукурузы (Manivannan et al., 2010; Favad et al., 2014) показало, что именно незрелые зародыши характеризуются максимальной способностью ĸ каллусогенезу in vitro. Согласно гистологическим данным, каллусы пшеницы берут начало от зачатка семядоли - щитка незрелых зародышей, представленного активно делящимися меристематическими клетками (Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдимирова, 2011, 2013; Круглова и др., 2019; Seldimirova et al., 2016), в которых отмечено интенсивное иммуногистохимическое окрашивание на ИУК (Сельдимирова и др., 2017б). На примере апельсина (De Almeida et al., 2006) и тмина (Ebrahimie et al., 2007) выявлено, что на путь каллусогенеза in vitro также вступают менее дифференцированные клетки зародыша, имеющие статус меристематических (к сожалению, авторы не указывают, в клетках какого именно органа зародыша индуцируется формирование каллуса). Интенсивное каллусообразование выявлено и в незрелых пыльниках (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Soriano et al., 2013; Doubled haploidy..., 2016; Yan et al., 2017). Сообщается о влиянии "старого возраста" семядоли Arabidopsis на потерю клетками свойства формировать каллус in vitro (Raizada et al., 2017). Отметим, что при исследовании прямого, не связанного с формированием каллуса, органогенеза in vitro в листьях Boea hygrometrica также выявлено снижение показателя регенерации с увеличением возраста донорных растений (Sun et al., 2019). Все эти результаты можно прокомментировать так, что индукция каллусообразования in vitro предполагает репрограммирование (см. ниже) инициальных клеток экспланта, к чему, по-видимому, предрасположены клетки онтогенетически более молодых органов. В таких клетках легче стимулируется дедифференциация в плюрипотентное состояние путем эпигенетической модификации ДНК и специфических факторов транскрипции (Duclercq et al., 2011; Raizada et al., 2017).

На принципиальный вопрос о том, обладают ли инициальные клетки морфогенетической компетентностью к формированию каллуса в условиях *in planta* или именно условия предварительного стресса *in situ* (в зависимости от используемой методики) и/или культивирования на индукционной среде *in vitro* индуцируют приобретение инициальными клетками свойства такой морфогенетической компетентности, единого ответа нет. Большинство исследователей полагают, что формирование каллуса – это результат индуцированного репрограммирования изначально "нор-

мальных" клеток экспланта в плюрипотентное состояние при стрессовой предобработке in situ или в культуре *in vitro* (Круглова, 2002; Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Wang et al., 2011; He et al., 2012; Ikeuchi et al., 2015, 2016, 2018, 2019; Feher, 2019). Например, в работе, посвященной исследованию генной регуляторной сети при регенерации растений, выявлена роль ряда транскрипционных факторов в клеточном репрограммировании при образовании каллуса, предваряющем регенерацию (Ikeuchi et al., 2018). Аналогичные результаты получены при индуцировании формирования каллуса из проростков табака, при этом выявлено участие ряда генов (Li et al., 2019). Установлено, что репрограммирование инициальных клеток сопровождается значительными изменениями в состоянии хроматина (Birnbaum, Roudier, 2017; Lee, Seo, 2018) и в профилях транскриптов (Pasternak, Dudits, 2019). Высказано, однако, иное мнение: каллусообразование связано с функционированием уже существующей в экспланте популяции стволовых плюрипотентных клеток, как, например, в корнях Arabidopsis (Sugimoto et al., 2010, 2011). О микроспорах пыльника *in planta* как стволовых клетках, способных к репрограммированию развития с гаметофитного пути на спорофитный в условиях культивирования in vitro (в том числе через этап формирования каллуса. – Авт.), сообщается в концептуальных работах Т.Б. Батыгиной (Батыгина, Рудский, 2006; Батыгина, 2014).

Важно подчеркнуть, что морфогенетически компетентные клетки должны характеризоваться соответствующим состоянием хроматина, которое ассоциируется с отдельными программами экспрессии генов (Ojolo et al., 2018; Hajheidari et al., 2019; Maury et al., 2019), однако на примере инициальных клеток каллуса эта проблема детально не разработана.

Индукция формирования каллусов *in vitro* клетками эксплантов в значительной степени определяется условиями культивирования, важнейшие среди которых — гормональный состав индукционной среды, а также генотип донорной особи и физиологический статус экспланта в момент инокуляции на среду (Круглова и др., 2005, 2018в; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2010, 2011; Ikeuchi et al., 2013; Colebrook et al., 2014; Doubled haploidy..., 2016).

Особенно большое значение придается индуцирующему действию гормонов (как правило, ауксинов, цитокининов и АБК) питательной среды (Ikeuchi et al., 2013; Yu et al., 2017; Shin, Seo, 2018). Так, в работе, посвященной индуцированию каллусогенеза в культивируемых *in vitro* зерновках *Pogonatherum paniceum*, показано, что использование различных концентраций ауксина 2,4-Д приводило к формированию эмбриогенных, органогенных и нерегенерационных каллусов, тогда как использование различных концентраций ауксина НУК индуцировало формирование только органогенных каллусов (Wang et al., 2008). Тип ауксина и его концентрация были важны в индукции формирования органогенных каллусов кукурузы (Rakshit et al., 2010) и *Asteracantha longifolia* (Kumar, Nandi, 2015), органогенных или эмбриогенных каллусов *Vanilla planifolia* (Palama et al., 2010). Эмбриогенный каллус из зародышей дефицитного по АБК мутанта ячменя AZ34 получен при введении в среду АБК (Сельдимирова и др., 2019).

Концентрация гормонов в индукционной среде обычно подбирается эмпирически. Однако в ряде работ выявлено, что большую роль в индукции формирования каллуса играет оптимальный баланс эндогенных (в экспланте в момент инокуляции) и экзогенных (в составе индукционной среды) гормонов (Горбунова и др., 2001; Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Сельдимирова, Круглова, 2015). Подчеркнем, что баланс эндогенных/экзогенных гормонов расценивается как важнейший фактор, определяющий индукцию иного, помимо каллусогенеза, пути морфогенеза in vitro клеток эксплантов - прямого соматического эмбриогенеза (эмбриоидогенеза) и его модификации – полиэмбриоидогенеза (Титова и др., 2016; Zur et al., 2016).

В литературе представлены и данные о совместном, как правило, синергетическом, действии различных гормонов при формировании тех или иных типов каллуса *in vitro*. Например, введение в индукционную среду ауксинов 2,4-Д и НУК приводило к формированию эмбриогенного и органогенного каллусов у Pogonatherum paniceum (Wang et al., 2008) и органогенных каллусов у подсолнечника (Abd Elaleem et al., 2015), АБК и предшественника ауксина ИУК антраниловой кислоты - к формированию органогенных каллусов у риса (Huang et al., 2012), ауксина НУК и цитокинина 6-БА – к формированию органогенных каллусов у Asteracantha longifolia (Kumar, Nandi, 2015), ауксина 2,4-Д и кинетина – к формированию органогенного каллуса у Torenia bicolor (Thomas, Hoshino, 2015). Такого рода данные подтверждают важность взаимовлияния гормонов, что хорошо изучено на разных этапах и при различных условиях развития растений in planta (Творогова и др., 2012; Додуева и др., 2014; Galinha et al., 2009; Kakani et al., 2009; Stahl, Simon, 2010; Su et al., 2011; Wang, Irving, 2011; Vanstraelen, Benkova, 2012; Schuster et al., 2014; Gaillochet et al., 2015; Pacifici et al., 2015; Rahni et al., 2016; Wani et al., 2016; Maury et al., 2019).

В целом, вопросы формирования каллусов из инициальной клетки/группы клеток экспланта и лежащих в их основе механизмах следует отнести к дискуссионным.

#### ОСОБЕННОСТИ СТАТУСА ОБРАЗОВАВШИХСЯ *in vitro* КАЛЛУСОВ КОНТРАСТНЫХ ТИПОВ

Морфологические показатели каллусов, образовавшихся из различных эксплантов на заключительных этапах их культивирования in vitro на индукционной среде, сходны практически у всех изученных в этом отношении растений. Как правило, морфогенные, органогенные, эмбриогенные, регенерационные каллусы представляют собой компактные, узловатые, плотные структуры белого цвета, тогда как неморфогенные, неорганогенные, неэмбриогенные и не способные к регенерации растений каллусы характеризуются как рыхлые обводненные структуры желтого цвета (Круглова и др., 2005, 2018в; Круглова, Катасонова, 2009; Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011; Мирошниченко и др., 2014; Сельдимирова и др., 2017a; Jimenez, Bangerth, 2001b; Cha-um et al., 2009; Manivannan et al., 2010; Praveena, Giri, 2012; Slesak et al., 2013; Sun et al., 2013; Bevitori et al., 2014; Favad et al., 2014; Pilahome et al., 2014; Abd Elaleem et al., 2015; Kumar, Nandi, 2015; Doubled haploidy..., 2016 и др.). Сканирование поверхности каллусов различных типов подтвердило их морфологические различия (Круглова и др., 2001; Сельдимирова и др., 2016; Shang et al., 2009; Narciso, Hattori, 2010; Zuraida et al., 2011; Sun et al., 2013; Bevitori et al., 2014; Mohd Din et al., 2016).

Гистологический анализ морфогенных каллусов пшеницы (Круглова и др., 2005; Евсеева и др., 2007; Сельдимирова и др., 2011, 2016) и гречихи (Betekhtin et al., 2017), органогенных каллусов гречихи (Халилуев и др., 2014), эмбриогенных каллусов кукурузы (Sun et al., 2013), сахарного тростника (Silveira et al., 2013) и сахарной свеклы (Klyachenko et al., 2013), а также регенерационных каллусов цикория (Dakshayini et al., 2016) и пшеницы (Сельдимирова и др., 2017а) свидетельствует о формировании в их толще или на поверхности зон, представленных плотно прилегающими друг к другу клетками мелких размеров, округлой или изодиаметрической формы, с высоким соотношением ядро/цитоплазма, то есть меристематическими, согласно критериям таких клеток (Meristematic tissues.., 2002). Подчеркивается важность тесных межклеточных симпластических взаимодействий между меристематическими клетками, необходимых для транспорта ионов и продуктов метаболизма, а в целом для функционирования и координации дальнейшего развития каллусов (Сельдимирова, Круглова, 2013; Klyachenko et al., 2013), в том числе, по-видимому, контроля дифференциации клеток, как это показано для растений in planta (Marzec, Kurczynska, 2014). Иммуногистохимическими исследованиями выявлено, что в органогенных/эмбриогенных каллусах пшеницы эндогенные ауксины и цитокинины локализуются именно в клетках меристематических зон (Seldimirova et al., 2016), по-видимому, участвуя в создании позиционных сигналов для возникновения органов/соматических зародышей в определенных клеточных "нишах" каллусов при дальнейшем культивировании на регенерационной среде (Круглова и др., 2018в).

Высказано предположение, что меристематические клетки каллусов выполняют функцию, аналогичную инициальным клеткам апикальных меристем побега и корня *in planta* (Евсеева и др., 2007). Этот вопрос интересен с позиции изучения покоящегося центра меристемы корня растений. Известно, что под влиянием различных факторов, включая гормональные, происходит активация делений нижнего слоя клеток (возможно, стволовых, по: Rahni et al., 2016) такого центра в сторону чехлика, что приводит к "открыванию" меристемы (Быстрова и др., 2015; Della Rovere et al., 2013). По-видимому, и в случае каллуса происходит активация части меристематических клеток, например, под действием экзогенных гормонов (Круглова и др., 2018б).

Методом трансмиссионной электронной микроскопии выявлены такие ультраструктурные характеристики клеток морфогенных каллусов пшеницы (Круглова, Сельдимирова, 2011; Сельдимирова, Круглова, 2013; Konieczny et al., 2007), эмбриогенных каллусов риса (Brisibe et al., 1995) и хлопчатника (Shang et al., 2009), как увеличение числа полисом, диктиосом и липидных включений наряду с наличием в митохондриях развитых крист, а в пластидах – крахмальных зерен.

Важно подчеркнуть, что светооптические и электронно-микроскопические данные по морфогенным, органогенным, эмбриогенным, регенерационным каллусам во многом совпадают с аналогичными данными, полученными для зародышей *in planta* и эмбриоидов *in vitro*, например, у пшеницы (Сельдимирова и др., 2017в), что лишний раз подтверждает концепцию универсальности морфогенеза растений в природных и экспериментальных условиях (Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015).

Неморфогенные же каллусы пшеницы (Круглова и др., 2005; Круглова, Сельдимирова, 2011) и сахарной свеклы (Klyachenko et al., 2013) представлены крупными сильно вакуолизированными паренхиматозными клетками, иногда без ядер, а также крупными межклетниками, что и определяет их рыхлую структуру. Крупные межклетники, а также отложенные на клеточных стенках каллоза и лигнин исключают тесные взаимодействия таких клеток, и межклеточный транспорт веществ осуществляется здесь через апопласт. В нерегенерационных каллусах сахарной свеклы, в отличие от каллусов, способных к регенерации растений, не выявлено формирование нормально развитых сосудов (Kagami et al., 2016).

В целом, в морфогенных, органогенных, эмбриогенных, регенерационных каллусах, сформированных в ходе культивирования на индукционной среде *in vitro*, имеются клеточные и тканевые предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Блок экспериментальных исследований посвящен сравнению физиологических (гормональных) показателей образовавшихся каллусов. Так, сравнительный анализ содержания ряда эндогенных гормонов (ИУК. АБК. гиббереллины, зеатин/зеатин рибозид) выполнен на примере эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов пшеницы (Jimenez, Bangerth, 2001a), моркови (Jimenez, Bangerth, 2001b) и кукурузы (Jimenez, Bangerth, 2001с). При этом авторами выявлены различия в показателях ИУК и АБК (в эмбриогенных каллусах содержание этих гормонов выше); показано, что потеря эмбриогенной компетентности клетками каллусов в ходе длительного культивирования происходила одновременно со снижением содержания ИУК практически до уровня, отмеченного для неэмбриогенных каллусов. В нерегенерационных каллусах риса также выявлен более низкий уровень содержания эндогенной ИУК, а также АБК (Huang et al., 2012). В регенерационных каллусах пшеницы отмечено повышенное содержание эндогенных цитокининов (Сельдимирова и др., 2017а). Ход соматического эмбриогенеза in vitro в эмбриогенных каллусах пшеницы и ячменя определялся балансом содержания в них эндогенных ИУК и АБК (Сельдимирова и др., 2019).

Интересно, что в неэмбриогенных клетках моркови был обнаружен маркерный метаболит, идентифицированный как охIAAsp, образование которого авторы объясняют необходимостью устранения избытка эндогенной ИУК (Sasaki et al., 1994). К сожалению, эти исследования не были продолжены, судя по доступной литературе.

Каллусы различаются и по биохимическим показателям. Так, детальное исследование морфогенных каллусов гречихи татарской, в сравнении с неморфогенными, выявило высокую активность каталазы, низкую активность супероксиддисмутазы, низкое содержание перекиси водорода и продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида (Камалова и др., 2009), а также высокое внутриклеточное содержание восстановленной формы глутатиона (Нигматуллина и др., 2014); кроме того, ингибитор каталазы 3-амино-1,2,4-триазол ингибировал рост морфогенного каллуса и вызывал гибель значительного количества клеток неморфогенного каллуса этого растения (Сибгатуллина и др., 2012). В регенерационных каллусах Mesembryanthemum crystallinum выявлено

повышенное содержание ряда ферментов, главным образом каталазы и супероксиддисмутазы (Libik et al., 2005). В эмбриогенных каллусах сахарного тростника отмечен более низкий уровень пероксидазы и путресеина, а также большее содержание растворимых белков, сахаров и свободного пролина (Nieves et al., 2003). В эмбриогенных каллусах сахарного тростника выявлено повышенное содержание свободных эндогенных полиаминов (Silveira et al., 2013), а также глюкозы, фруктозы, сахарозы и аланина, тогда как аспарагин, глутамин, лизин представлены в более низких количествах (Mahmud et al., 2015). В эмбриогенных каллусах маниоки содержание сахарозы снижается, хотя содержание фруктозы и глюкозы также повышено (Ma et al., 2015). В регенерационных каллусах риса содержание крахмала и растворимого сахара было выше, а содержание воды значительно ниже, чем в каллусах, не способных к регенерации (Huang, Liu, 2002). По-видимому, биохимические особенности сформированных морфогенных и неморфогенных каллусов видоспецифичны.

Сравнительный протеомный анализ эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов кукурузы с использованием двумерного электрофореза и масс-спектрометрии выявил только в эмбриогенных каллусах белки, связанные с метаболизмом ряда веществ (сахароза, крахмал, жирные кислоты, фенилпропаноиды), возможно, связанные с будущей индукцией соматического эмбриогенеза, в то же время в обоих типах каллусов отмечены белки, связанные с пролиферацией клеток и реакцией их на стресс (Sun et al., 2013; Liu B. et al., 2018). Аналогичные данные о различиях протеомов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов получены для *Vanilla planifolia* (Tan et al., 2013) и *Larix principis-rupprechtii* Mayr (Zhao et al., 2015).

В неморфогенных каллусах свеклы установлено гиперметилирование цитозина в сайт-специфичных мотивах ДНК; для таких каллусов характерен и более высокий уровень плоидности клеток и частоты хромосомных аберраций уже на первых этапах культивирования *in vitro* (Дубровная, Тищенко, 2003). Нарушение плоидности клеток в виде анеуплоидии выявлено и в неморфогенных каллусах гречихи; кроме того, в таких клетках выявлен и самый высокий уровень повреждения ДНК, в отличие от большей стабильности генома в клетках морфогенных каллусов (Betekhtin et al., 2017).

В целом, комплексные исследования каллусов контрастных типов как модельных систем несомненно перспективны для более полного понимания различных аспектов индукции и регуляции морфогенеза *in vitro*.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В зависимости от соотношения эндогенных и экзогенных факторов, в ходе культивирования in vitro эксплантов возможна реализация морфогенетических сценариев значительно более широкого спектра, чем в природных условиях in planta. Во многом это обусловлено пластичностью (поливариантностью) онтогенеза растений. способностью их к регенерации, а также надежностью развития посредством "включения" невостребованных in planta программ морфогенеза (Носов, 1999; Журавлев, Омелько, 2008; Батыгина и др., 2010; Медведев, Шарова, 2010; Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015; Birnbaum, Sanchez Alvarado, 2008; Plant propagation..., 2008; Batygina, 2011, 2012; Sugimoto et al., 2011; Merks, Guravage, 2013; Xu, Huang, 2014; Gaillochet, Lohmann, 2015; Ikeuchi et al., 2016, 2018, 2019; Birnbaum, Roudier, 2017; Wihovo et al., 2018; Maury et al., 2019; Pasternak, Dudits, 2019).

Один из путей морфогенеза *in vitro* как проявление свойств плюрипотентности, дедифференциации, репрограммирования клеток эксплантов — формирование каллусов. Несмотря на то, что история изучения каллусогенеза *in vitro* насчитывает более ста лет (Круглова и др., 2018в; Ikeuchi et al., 2013; Sugiyama, 2015; Feher, 2019), многие вопросы в этой области исследований остаются дискуссионными до настоящего времени. В числе этих вопросов в контексте данной статьи можно выделить, например, такие.

Результаты некоторых исследований не соответствуют тому обобщению, что к морфогенным, органогенным, эмбриогенным, регенерационным следует относить каллусы плотной консистенции белого цвета, а рыхлые желтые каллусы расценивать как контрастные им. У ряда растений при определенных условиях культивирования *in vitro* получены морфогенные (Brisibe et al., 2000; Foilling, Olesen, 2001; Zare et al., 2002), opraногенные (Kumar, Nandi, 2015; Naaz et al., 2019), эмбриогенные (Bespalhok, Harroti, 1998; Oduor et al., 2006; Omer et al., 2008; Manivannan et al., 2010; Sun et al., 2013; Favad et al., 2014; Ma et al., 2015) каллусы рыхлой и даже водянистой (Abd Elaleem et al., 2015) консистенции, тогда как, например, у крокусов описаны плотные неэмбриогенные каллусы (Verna et al., 2016). Данные о морфогенетических потенциях рыхлых каллусов заставляют пересмотреть сложившееся представление об их неморфогенной природе. Более того, рыхлые морфогенные каллусы могут использоваться в процессах генетической трансформации (Gordon-Camm et al., 2019), а также стать ценным источником клеточных суспензий и протопластов, также обладающих регенерационной способностью.

Результаты ряда исследований не соответствуют и обобщению о белой окраске морфогенных, органогенных, эмбриогенных, регенерационных каллусов и желтой окраске – контрастных им каллусов. Так, у маниоки получены желтые эмбриогенные каллусы (Ma et al., 2015), у Cichorium intybus – желтые регенерационные каллусы (Dakshavini et al., 2016), v Asteracantha longifolia (Kumar, Nandi, 2015), Lathyrus sativus u L. cicera (Li et al., 2016) – зеленые органогенные каллусы. У подсолнечника, в зависимости от сочетания введенных в индукционные среды ауксинов, получены желтые, зеленые, коричневые органогенные каллусы (Abd Elaleem et al., 2015). По-видимому, окраска полученных каллусов напрямую не связана с морфогенетической компетентостью/некомпетентностью типов каллуса, а зависит от многих эндогенных и экзогенных факторов.

К нерешенным однозначно вопросам следует отнести и трансформацию каллусов контрастных типов при определенных условиях культивирования in vitro. Например, каллусы пшеницы, по морфологическим показателям охарактеризованные как неморфогенные, на свежей индукционной среде того же состава преобразуются в морфогенные (Круглова, Сельдимирова, 2018). Неэмбриогенные каллусы кукурузы через два пассажа на индукционной среде того же состава переходили в статус эмбриогенных (Sun et al., 2013). Трансформация каллусов отмечена и при их длительном культивировании на индукционной среде. Так, изначально неморфогенный каллус Dianthus caryophyllus спустя 8 недель культивирования на индукционной среде без пассирования проявлял свойства морфогенности (Arif et al., 2014). Возможно, длительное культивирование это сложный процесс, включающий изменения модификации генома, экспрессии генов и субклеточную реконструкцию. Как бы то ни было, трансформации каллусов вносят дополнительные сложности в понимание процесса каллусогенеза *in vitro*.

В последние годы достигнут значительный прогресс в выявлении молекулярно-генетических особенностей формирования каллусов in vitro. У ряда растений, главным образом Arabidopsis, идентифицированы гены и транскрипционные факторы, участвующие в образовании каллусов (Sugimoto et al., 2010; Iwase et al., 2011; He et al., 2012; Fan et al., 2012; Xu et al., 2012, 2018; Cheng et al., 2015; Silva et al., 2015; Lee et al., 2017, 2018; Ikeuchi et al., 2018; Kim et al., 2018; Xu et al., 2018; Li et al., 2019, а также обзоры: Ikeuchi et al., 2013; Liu et al., 2014; Liu W. et al., 2018; Shin, Seo, 2018; Feher, 2019; Gordon-Camm et al., 2019). Это направление исследований должно способствовать решению дискуссионных вопросов, связанных как с формированием различных типов каллусов и их трансформацией, так и с выявлением особенностей каллусогенеза in vitro в целом.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы №АААА-А18-118022190099-6 государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-0.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.

- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Батыгина Т.Б., Осадчий Я.В. Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур // Успехи соврем. биол. 2015. Т. 135. № 4. С. 337–345.
- Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль стволовых клеток в морфогенезе растений // ДАН. 2006. Т. 410. № 5. С. 1–3.
- *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
- *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
- Быстрова Е.И., Жуковская Н.В., Ракитин В.Ю., Иванов В.Б. Роль этилена в активации деления клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 2. С. 82-86.
- Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Изв. РАН. Серия биол. 2001. № 1. С. 31–36.
- Додуева И.Е., Ганчева М.С., Осипова М.А. и др. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // Физиол. раст. 2014. Т. 61. № 5. С. 611–631.
- Дубровная О.В., Тищенко Е.Н. Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы // Цитол. и генет. 2003. Т. 37. № 6. С. 23–30.
- Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. и др. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 2. С. 306–311.
- *Журавлев Ю.Н., Омелько А.М.* Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. 2008. Т. 55. № 5. С. 643–664.
- Камалова Г.В., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Сравнение редокс-статуса клеток морфогенных и полученных

из них неморфогенных каллусов гречихи татарской // Биохимия. 2009. Т. 74. № 6. С. 842–852.

- Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. ... д-ра биол. наук. СПб.: БИН РАН, 2002. 42 с.
- Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. биохим. культ. раст. 2009. Т. 41. С. 124–131.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинных каллусах злаков: цито-гистологические особенности // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130. № 3. С. 247–257.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза in vitro клеток андроклинного каллюса пшеницы // Физиол. раст. генет. 2013. Т. 45. № 5. С. 382–389.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro* // Изв. Уфим. науч. центра РАН. 2018. № 2. С. 61–65.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.
- Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н., Сельдимирова О.А. Андрогенные эмбриоиды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Изв. РАН. Серия биол. 2001. № 2. С. 191–197.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи соврем. биол. 2018а. Т. 138. № 3. С. 283–293.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Участие абсцизовой кислоты в стимулировании соматического эмбриогенеза растений *in vitro* // Успехи соврем. биол. 20186. Т. 138. № 5. С. 516–528.
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018в. Т. 49. № 5. С. 273–288.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Гистологический статус зародыша пшеницы в стадии органогенеза *in vivo*, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro* // Изв. Уфим. науч. центра РАН. 2019. № 1. С. 25–29.
- Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия биол. 2010. № 3. С. 109–129.
- Мирошниченко Д.Н., Соколов Р.Н., Аликина О.В., Долгов С.В. Скрининг регенерационного потенциала ди-, тетра- и гексаплоидных сортов и видов пшеницы в культуре *in vitro* // Биотехнология. 2014. № 1. С. 38–51.
- Нигматуллина Л.Р., Румянцева Н.И., Костюкова Ю.А. Влияние D,L-бутионин-S,R-сульфоксимина на соотношение форм глутатиона и рост каллусов гречихи татарской // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 1. С. 50–62.

- Носов А.М. Культура клеток высших растений уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 565–573.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклинных каллусах пшеницы *in vitro* // Изв. Уфим. науч. центра РАН. 2015. № 1. С. 33–39.
- Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин И.Р. и др. Влияние 24-эпибрассинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов *in vitro* контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиол. раст. 2017а. Т. 64. № 6. С. 461–472.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфим. науч. центра РАН. 20176. № 3 (1). С. 114–118.
- 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.
- 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. 2017в. Т. 48. № 3. С. 220–233.
- Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н. и др. 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.
- Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Изв. РАН. Серия биол. 2016. № 2. С. 155–161.
- Сибгатуллина Г.В., Румянцева Н.И., Хаертдинова Л.Р. и др. Получение и характеристика устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса Fagopyrum tataricum // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 5. С. 701– 709.
- Творогова В.Е., Осипова М.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Взаимодействие транскрипционных факторов и фитогормонов в регуляции активности меристем у растений // Экол. генет. 2012. Т. 10. № 3. С. 28–40.
- Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., 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.
- Халилуев М.Р., Богоутдинова Л.Р., Баранова Г.Б. и др. Зависимость каллусообразования и органогенеза побегов томата (Solanum lycopersicum L.) in vitro от генотипа, типа экспланта и состава питательной среды // Изв. РАН. Серия биол. 2014. № 6. С. 586–596.

- Abd Elaleem K.G., Saeed B.E.A.E., Ahmed M.M. Effect of plant growth regulators on *Helianthus annuus* L. callus induction // Int. J. Inn. Appl. Stud. 2015. V. 13. P. 348– 354.
- Arif M., Rauf S., Din A.U. et al. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of *Dianthus caryophyllus* L. // Amer. J. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 2454–2463.
- *Batygina T.B.* Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants // Stem Cell Res. J. 2011. V. 3. P. 45–120.
- Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. P. 107–120.
- Bespalhok J.C., Harotti F.K. Friable embryogenic callus and somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold (*Tagetes erecta* L.) // Plant Cell Repts. 1998. V. 17. P. 870–875.
- Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J. et al. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn. // PLoS One. 2017. V. 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537
- Bevitori R., Popielarska-Konieczna M., dos Santos E.M. et al. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 545– 554.
- Birnbaum K.D., Roudier F. Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants // Regeneration. 2017. V. 4. P. 15–20.
- Birnbaum K.D., Sanchez Alvarado A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals // Cell. 2008. V. 132. P. 697–710.
- Brisibe E.A., Gajdosova A., Olesen A., Andersen S.B. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 187–196.
- Brisibe E.A., Nishioka D., Miyake H., Taniguchi T. Ultrastructural changes leading to plantlet differentiation in callus cultures of African rice // Jap. J. Crop Sci. 1995. V. 64. P. 121–130.
- Cha-um S., Srianan B., Pichakum A., Kirdmanee Ch. An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp. indica) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2009. V. 45. P. 171–179.
- Cheng Y., Liu H., Cao L. et al. Down-regulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in Arabidopsis // Front. Plant Sci. 2015. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00825
- Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L., Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. P. 67–75.
- Dakshayini K., Vaman R.C., Karun A. et al. High-frequency plant regeneration and histological analysis of callus in *Cichorium intybus*: an important medicinal plant // J. Phytol. 2016. V. 8. P. 7–12.
- De Almeida W.A.B., de Mourao F.F., Mendes B.M.J., Rodriguez A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis* // Biol. Plant. 2006. V. 50. P. 321–325.

- Della Rovere F., Fattorini L., D'Angeli S. et al. Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of Arabidopsis // Ann. Bot. 2013. V. 112. P. 1395–1407.
- Doubled haploidy in model and recalcitrant species / Ed. J.M. Segui-Simarro. Lausanne: Frontiers Media, 2016. 119 p.
- Duclercq J., Sangwan-Norreel B., Catterou M., Sangwan R.S. De novo shoot organogenesis: from art to science // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 597–606.
- *Ebrahimie E., Naghavi M.R., Hosseinzadeh A. et al.* Induction and comparison of different *in vitro* morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2007. V. 90. P. 293–311.
- Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration // Cell Res. 2012. V. 22. P. 1169–1180.
- Favad A., Ahsan M., Saeed N.A. et al. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (Zea mays) // Int. J. Agric. Biol. 2014. V. 16. P. 111–117.
- *Feher A*. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // Front. Plant Sci. 2019. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536
- Foilling L., Olesen A. Transformation of wheat (Triticum aestivum L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment // Plant Cell Repts. 2001. V. 20. P. 629–636.
- *Gaillochet C., Daum G., Lohmann J.U.* O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem pattering // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 23. P. 91–97.
- *Gaillochet C., Lohmann J.U.* The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity // Development. 2015. V. 142. P. 2237–2249.
- Galinha C., Bilsboroudh G., Tsiantis M. Hormonal input in plant meristems: a balancing act // Semin. Cell Dev. Biol. 2009. V. 20. P. 1149–1156.
- Gordon-Camm B., Sardesai N., Arling M. et al. Using morphogenic genes to improve and regeneration of transgenic plants // Plants. 2019. V. 8. https://doi.org/10.3390/plants8020038
- Hajheidari M., Koncz C., Bucker M. Chromatin evolutionkey innovations underpinning morphological complexity // Front. Plant Sci. 2019. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00454
- 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. P. e1002911.
- Huang W.L., Liu L.F. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress // Bot. Bull. Acad. Sin. 2002. V. 43. P. 107–113.
- Huang W.-L., Lee C.-H., Chen Y.-R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2012. V. 108. P. 257–263.

- *Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al.* Molecular mechanisms of plant regeneration // Ann. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 377–406.
- *Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K.* Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 28. P. 60–67.
- Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms // Development. 2016. V. 143. P. 1442–1453.
- *Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B. et al.* A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 770–782.
- *Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A.* Plant callus: mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159–3173.
- Iwase A., Mitsuda N., Koyama T. et al. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis // Curr. Biol. 2011. V. 21. P. 508–514.
- Jimenez V.M., Bangerth F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001a. V. 67. P. 37-46.
- *Jimenez V.M., Bangerth F.* Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot // Physiol. Plant. 2001b. V. 111. P. 389–395.
- Jimenez V.M., Bangerth F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis in vitro // Plant Sci. 2001c. V. 160. P. 247–257.
- Kagami H., Taguchi K., Arakawa T. et al. Efficient callus formation and plant regeneration are heritable characters in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Hereditas. 2016. V. 153.
  - https://doi.org/10.1186/s41065-016-0015-z
- Kakani A., Li G., Peng Z. Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis* // Planta. 2009. V. 229. P. 645–657.
- *Kim J.Y., Yang W., Forner J. et al.* Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in *Arabidopsis* // EMBO J. 2018. V. 37. https://doi.org/10.15252/embj.201798726
- Klyachenko O.L., Likhanov A., Krylovskaya S.A. Morphogenetic modules formation in sugar beet callus tissues in vitro // J. Microbiol. Biotech. Food Sci. 2013. Special Iss. 2. P. 1396–1408.
- Konieczny R., Swierczynska J., Czaplicki A.Z., Bohdanowicz J. Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 355–363.
- Kumar M.S., Nandi S.C. High frequency plant regeneration with histological analysis of organogenic callus from internode explants of Asteracantha longifolia Nees // J. Genet. Enj. Biotech. 2015. V. 13. P. 31–37.
- Lee K., Park O.S., Seo P.J. Arabidopsis ATXR2 deposits H3K36me3 at the promoters of LBD genes to facilitate cellular dedifferentiation // Sci. Signal. 2017. V. 10. https://doi.org/10.1126/scisignal.aan0316
- Lee K., Park O.S., Seo P.J. ATXR2 as a core regulator of de novo root organogenesis // Plant Signal. Behav. 2018. V. 13. https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1449543

- Lee K., Seo P.J. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 235–247.
- *Li K., Wang J., Liu C. et al.* Expression of *AtLEC2* and *AtIPTs* promotes embryogenic callus formation and shoot regeneration in tobacco // BMC Plant Biol. 2019. V. 19.

https://doi.org/10.1186/s12870-019-1907-7

- Li R.S., Tao V.J., Liu F.J. et al. In vitro plant regeneration via indirect organogenesis from different explants of Lathyrus sativus L. and Lathyrus cicera L. // Phyton. 2016. V. 85. P. 87–93.
- Libik M., Konieczny R., Pater B. et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant // Plant Cell Rep. 2005. V. 23. P. 834– 841.
- *Liu B., Shan X., Wu Y., Su S.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli derived from a maize (*Zea mays* L.) inbred line Y423 // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. https://doi.org/10.3390/ijms19124004
- Liu J., Sheng L., Xu Y. et al. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 1081–1093.
- *Liu W., Yu J., Ge Y. et al.* Pivotal role of LBD16 in root and root-like organ initiation // Cell. Mol. Life Sci. 2018. V. 75. P. 3329–3338.
- *Ma Q., Zhou W., Zhang P.* Transition from somatic embryo to friable embryogenic callus in cassava: dynamic changes in cellular structure, physiological status, and gene expression profiles // Front. Plant Sci. 2015. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00824
- Mahmud I., Shrestha B., Boroujerdi A., Chowdhury K. NMR-based metabolomics profile comparisons to distinguish between embryogenic and non-embryogenic callus tissue of sugarcane at the biochemical level // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2015. V. 51. P. 340–349.
- Manivannan A., Kaul J., Singode A., Dass S. Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds // Afr. J. Biotech. 2010. V. 9. P. 7446–7452.
- Marzec M., Kurczynska E. Importance of symplasmic communication in cell differentiation // Plant Sign. Behav. 2014. V. 9. P. e27931. https://doi.org/10.4161/psb.27931tt
- *Maury S., Sow M.D., Le Gac A.-L. et al.* Phytohormone and chromatin crosstalk: the missing link for developmental plasticity? // Front. Plant Sci. 2019. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395
- Merks R.M.H., Guravage M.A. Building simulation models of developing plant organs / Ed. I. De Smet. Plant organogenesis: methods and protocols // Meth. Mol. Biol. V. 959. New York: Springer Science + Business Media, 2013. P. 333–352.
- Meristematic tissues in plant growth and development / Eds M.T. McManus, B. Veit. Sheffield: Sheffield Acad. Press, 2002. 301 p.
- Mohd Din A.R.J., Ahmad F.I., Wagiran A. et al. Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (Oryza sativa cv. Panderas) // Saudi J. Biol. Sci. 2016. V. 23. Suppl. P. 69–77.

- Naaz A., Hussain S.A., Naz R. et al. Successful plant regeneration system via de novo organogenesis in Syzygium cumini (L.) Skeels: an important medical tree // Agroforest Syst. 2019. V. 93. P. 1285–1295.
- Narciso J.O., Hattori K. Genotypic differences in morphology and ultrastructures of callus derived from selected rice varieties // Philipp. Sci. Lett. 2010. V. 3. P. 59–65.
- Nieves N., Segura-Nieto M., Blanco M.A. et al. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2003. V. 39. P. 343–345.
- Oduor R.O., Ndungu S., Njagi E.N., Machuka J. In vitro regeneration of dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis // Int. J. Bot. 2006. V. 2. P. 146–151.
- *Ojolo S.P., Cao S., Priyadarshani S. et al.* Regulation of plant growth and development: a review from a chromatin remodeling perspective // Front. Plant Sci. 2018. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01232
- Omer R.A., Ali A.M., Matheka J.M., Machuka J. Regeneration of Sudaneses maize inbred lines and open pollinated varieties // Int. J. Biotech. 2008. V. 7. P. 1759–1764.
- Omer R.A., Matheka J.M., Runo S. et al. Effects of auxin and source of explants on callus induction of tropical maize // Biotechnology. 2012. V. 11. P. 225–231.
- Pacifici E., Polverari L., Sabatini S. Plant hormone crosstalk: the pivot of root growth // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 1113–1121.
- Palama T.L., Menard P., Fock I. et al. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of Vanilla planifolia (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 82–90.
- Pasternak T., Dudits D. Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis in planta and in vitro // Front. Plant Sci. 2019. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00778
- Pilahome V., Bunnag S., Suwanagul A. Development of a plant regeneration system from seed-derived shoot segments of rise (*Oryza sativa* L.) // Asian J. Crop Sci. 2014. V. 6. P. 305–319.
- Plant propagation by tissue culture / Eds E.F. George, M.A. Hall, G.-J. De Klerk. Dordrecht: Springer, 2008. 502 p.
- Praveena M., Giri C.C. Plant regeneration from immature inflorescence derived callus cultures of salt tolerant kallar grass (*Leptochloa fusca L.*) // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2012. https://doi.org/10.1007/s12298-012-0134-6
- *Qi X.Z., Yu S., Heng K.H. et al.* Micropropagation and plant regeneration from embryogenic callus of *Miscanthus sinensis* // *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 2012. V. 48. P. 50–57.
- Rahni R., Efroni I., Birnbaum K.D. A case for distributed control of local stem cell behavior in plants // Dev. Cell. 2016. V. 38. P. 635–642.
- Raizada M.N., Goron T.L., Bannerjee O. et al. Loss of developmental pluripotency occurs in two stages during leaf aging in Arabidopsis thaliana // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2017. V. 53. P. 178–187.
- Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J.C. et al. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (Zea

*mays* L.) inbreds // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2010. V. 100. P. 31–37.

- Sasaki K., Shimomura K., Kamada H., Harada H. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. P. 1159–1164.
- Schuster C., Gaillochet C., Medzihradszky A. et al. A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals // Dev. Cell. 2014. V. 28. P. 438–449.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis in vitro in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2016. V. 52. P. 251–264.
- Shang H.-H., Liu C.-L., Zhang C.-J. et al. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between Agrobacterium transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton // J. Integr. Plant Biol. 2009. V. 51. P. 456–465.
- Shin J., Seo P.J. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells // Front. Plant Sci. 2018. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01653
- Silva A.T., Barduche D., do Livramento K.G., Paiva L.V. A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of Coffea arabica L. // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2015. V. 51. P. 93–101.
- Silveira V., de Vita A.M., Macedo A.F. et al. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2013. V. 114. P. 351–364.
- Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. et al. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. P. 30–37.
- Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture // Plant Reprod. 2013. V. 26. P. 181–196.
- Stahl Y., Simon R. Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. V. 13. P. 53–58.
- Su Y.H., Liu Y.B., Zhang X.S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 616–625.
- Sugimoto K., Gordon S.P., Meyerowitz E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? // Trends Cell Biol. 2011. V. 21. P. 212–218.
- Sugimoto K., Jiao I., Meyerowith E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via root development pathway // Dev. Cell. 2010. V. 18. P. 463–471.
- Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 349–359.
- Sun L., Wu Y., Zou H. et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (Zea mays L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2013. V. 113. P. 103–119.
- Sun R.Z., Zuo E.H., Qi J.F. et al. A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves // Funct. Integr. Genomics. 2019. https://doi.org/10.1007/s10142-019-00701-3

- Tan B.C., Chin C.F., Liddell S., Alderson P. Proteomic analysis of callus development in Vanilla planifolia Andrews // Plant Mol. Biol. Repts. 2013. V. 31. P. 1220–1229.
- Thomas T.D., Hoshino Y. Callus induction, high frequency shoot organogenesis and assessment of clonal fidelity in *Torenia bicolor* Dalzell. // J. Appl. Res. Med. Arom. Plants. 2015. V. 2. P. 188–194.
- Vanstraelen M., Benkova E. Hormonal interactions in the regulation of plant development // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2012. V. 28. P. 463–487.
- Verna S.K., Das A.K., Cingoz G.S. et al. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species // Biotech. Repts. 2016. V. 10. P. 66–74.
- Wang W., Zhao X., Zhuang G. et al. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2008. V. 95. P. 57–67.
- Wang X.-D., Nolan K.E., Irwanto R.R. et al. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells // Ann. Bot. 2011. V. 107. P. 599–609.
- Wang Y.H., Irving H.R. Developing a model of plant hormone interactions // Plant Signal Behav. 2011. V. 6. P. 494–500.
- Wani S., Kumar V., Shriram V., Sah S.K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants // Crop J. 2016. V. 4. P. 162–176.
- Wihovo A., Becker C., Durr J. et al. Partial maintenance of organ-specific epigenetic marks during plant asexual reproduction leads to heritable phenotypic variation // PNAS USA. 2018. V. 115. https://doi.org/10.1073/pnas.1805371115
- Xu C., Cao H., Zhang Q. et al. Control of auxin-induced callus formation by bZIP59–LBD complex in Arabidopsis regeneration // Nat. Plants. 2018. V. 4. P. 108–115.
- Xu K., Liu J., Fan M. et al. A genome-wide transcriptome profiling reveals the early molecular events during callus initiation in *Arabidopsis* multiple organs // Genomics. 2012. V. 100. P. 116–124.
- Xu L., Huang H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration // Curr. Top. Dev. Biol. 2014. V. 108. P. 1–33.
- Yan G., Liu H., Wang H. et al. Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding // Front. Plant Sci. 2017. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786
- Yu J., Liu W., Liu J. et al. Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture // Front. Plant Sci. 2017.

https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385

- Yu Y., Qin W., Li Y. et al. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities // Plant Growth Regul. 2019. V. 87. P. 187–199.
- Zare A.G., Humphreys M.W., Rogers J.W. et al. Androgenesis in a Lolium multiflorum x Festuca arundinacea hybrid to generate genotypic variation for drought resistance // Euphytica. 2002. V. 125. P. 1–11.
- Zhao J., Wang B., Wang X. et al. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryo-

genic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2015. V. 120. P. 655–669.

Zur I., Dubas E., Krzewska M., Janowiak F. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis /

# Doubled haploidy in model and recalcitrant species // Front. Plant Sci. 2016. P. 110–109.

Zuraida A.R., Naziah B., Zamri Z., Sreeramanan S. Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 1913–1921.

# Cytophysiological Features of Contrast Callus Types in vitro

### A. E. Zinatullina\*

Ufa Institute of Biology of UFRC RAS, Ufa, Russia \*e-mail: aneta@ufaras.ru

As a result of different explants culture *in vitro* at the induction medium, calluses of contrast types (morphogenic and non-morphogenic, organogenic and non-organogenic, embryogenic and non-embryogenic, regenerative and non-regenerative) are formed. The article analyzes the literature and own cytophysiological data on the formation of such calluses from competent pluripotent initial cells/cell groups of explants; the issues of reprogramming, differentiation and dedifferentiation of initial cells are considered. The main attention is paid to the data on the comparative studies of cytophysiological (histological and hormonal) features of contrast callus types. The problems associated with the study of contrast callus types, for example, their transformation under certain culture *in vitro* conditions are analyzed. The importance of using contrast callus types as model systems for the study of the most complex biological phenomenon – plant morphogenesis is emphasized.

Keywords: plant morphogenesis, culture in vitro, formation of calluses, callus types, phytohormones