

УДК 633.11:581.143.5

КУЛЬТУРА *in vitro* АВТОНОМНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ (НА ПРИМЕРЕ ЗЛАКОВ)

© 2021 г. Н. Н. Круглова¹, *, А. Е. Зинатуллина¹

¹Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Одно из направлений экспериментальной оценки стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам в модельных условиях культуры *in vitro* состоит в использовании в качестве эксплантов зиготических зародышей той или иной стадии развития (эмбриокультура *in vitro*). Особенно перспективно в этом отношении культивирование *in vitro* незрелых зародышей, находящихся в критической стадии относительной автономности. Такой зародыш, независимый от физиологических факторов материнского организма, способен самостоятельно дать начало полноценному растению в адекватных условиях *in vitro* и далее *ex vitro*. Это позволяет получать регенеранты напрямую, минуя дополнительный этап формирования морфогенных каллусов. В статье на примере хлебных злаков представлен обзор литературных и собственных данных по выявлению стадии относительной автономности эмбриогенеза *in vivo*, а также по использованию относительно автономных зародышей в оценке засухоустойчивости в селективных условиях *in vitro*. Подчеркивается, что перспективность использования эмбриокультуры *in vitro* как модельной системы в оценке стресс-устойчивости растений определяется тем, что зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма, а также сходством морфогенетических реакций растений *in vivo* и эксплантов/регенерантов *in vitro*, согласно принципу универсальности морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях.

Ключевые слова: эмбриогенез, автономность зародыша, эмбриокультура *in vitro*, стресс, засуха, устойчивость, злаки

DOI: 10.31857/S0042132421050057

ВВЕДЕНИЕ

В условиях экстремальных колебаний факторов внешней среды (Глобальные изменения климата ..., 2009; Wang et al., 2019) проблема стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам и особенно засухе чрезвычайно актуальна, о чем свидетельствует обширнейшая литература (некоторые обзоры последних лет, выполненные по результатам исследований хлебных злаков: Пикало и др., 2020; Raveena et al., 2019; Sallam et al., 2019; Sattar et al., 2019).

Растениями, ведущими прикрепленный образ жизни, на различных уровнях организации выработаны морфологические, физиологические, биохимические и иные способы стратегической адаптации к абиотическим стрессам (Wani et al., 2016; Yadav, Sharma, 2016; Sattar et al., 2019; Ghorbel et al., 2020; Plant life ..., 2020; Jogawat et al., 2021; Yadav et al., 2021). Тем не менее, исследователями активно разрабатываются способы повышения

устойчивости к абиотическим стрессам и создания адаптивных сортов экономически важных сельскохозяйственных культур и особенно хлебных злаков как основного продовольственного ресурса.

Успех селекции на устойчивость к стресс-факторам в значительной степени зависит от правильной оценки этого признака у создаваемых сортов (Драгавцев, 2019; Sallam et al., 2019). Однако решение этой проблемы вызывает трудности. В отличие от устойчивости растений к биотическим стрессам, которая в основном зависит от моногенных признаков, сложные ответы растений на абиотические стрессы относятся к мультигенным (Дубровная, 2017; Falaknaz et al., 2019; Wang et al., 2019). В формировании признака толерантности к абиотическому стрессору у растений задействован ряд транскрипционных факторов из семейств NAC, AP2/EREBP, MYB, WRKY, bZIP, ERF/DREB и других, при этом часть из них участвует в общем контроле развития растения

или отдельных органов (Gupta et al., 2018; Baillo et al., 2019; Kimotho et al., 2019; Yang et al., 2021). Толерантность к абиотическим стрессам – сложный признак и потому, что стрессор воздействует на различные молекулярные, биохимические и физиологические события, вовлеченные в процессы роста и развития растения. В целом, неспецифические реакции растений на абиотические стрессы трудно контролировать и тем более управлять ими (Инжеваткин, Савченко, 2016).

Для хлебных злаков разработаны различные способы оценки устойчивости генотипов к абиотическим стрессам в полевых условиях *in vivo*. Прямым показателем является урожай зерна (Грабовец, Фоменко, 2016; Demydov et al., 2021 и мн. др.), однако влияние стресса оценивается и по косвенным морфологическим, фенотипическим и количественным показателям растений на разных стадиях развития (Грабовец, Фоменко, 2016; Mehraban et al., 2018; Chaichi et al., 2019; Grzesiak et al., 2019 и др.), а также с использованием генетических и молекулярно-генетических подходов (Gahlaut et al., 2016; Eid, 2018; Sonmezoglu, Terzi, 2018; Dehghani et al., 2019; Falaknaz et al., 2019; Leng, Zhao, 2019; Sakkar et al., 2019) и привлечением математического аппарата (Abdolshahi et al., 2015; El-Mowafi et al., 2021). Предложены физиологические способы прогнозирования полевой устойчивости злаковых растений, например, к стресс-фактору засухи по содержанию в листьях гормона стресса абсцизовой кислоты (Веселов и др., 2011) и аминокислот (Yadav et al., 2019), показателю устьичной проводимости (Кудоярова и др., 2013) или в условиях моделирования засухи (Алабушев и др., 2019).

В то же время оценка устойчивости злаков, как и других растений, к абиотическим стресс-факторам в полевых условиях имеет свои ограничения. Для окончательного вывода об устойчивости/неустойчивости конкретного генотипа требуются многолетние трудоемкие исследования и наблюдения. Кроме того, год от года могут меняться характер и степень воздействия изучаемого стресс-фактора, например, формироваться первичная и вторичная виды засухи (Пикало и др., 2020).

Предложен ряд методов физиологической оценки стресс-устойчивости злаков в лабораторных условиях. Традиционным способом такой оценки, применяющимся, как правило, для ранней диагностики селекционного материала, является проращивание зерновок и анализ развития проростков *in situ* в растворах осмотиков, имитирующих, например, недостаток воды (Парфенова и др., 2018; Сельдиминова, 2019 и мн. др.). Несмотря на относительность результатов, использование таких методов позволяет выделить перспективные устойчивые образцы, а комплексная оценка устойчивости одних и тех же генотипов

злаков и в лабораторных *in situ*, и полевых *in vivo* условиях (Баймагамбетова, Булатова, 2013; Бычкова, Хлебцова, 2015) повышает достоверность результатов. Из более точных, хотя и более сложных методов ранней диагностики устойчивости генотипов злаков к стрессам в лабораторных условиях *in situ* можно отметить использование цитологических и молекулярных маркеров, выявляемых с помощью световой флуоресцентной и электронной микроскопии (Kononenko et al., 2020).

В последние годы исследователи все чаще обращаются к такому направлению диагностической лабораторной оценки стресс-устойчивости злаковых растений, как использование биотехнологических методов культуры *in vitro* клеток, тканей и органов (Дубровная, 2017; Основы биотехнологии ..., 2017; Круглова и др., 2018а; Пикало и др., 2020; Perez-Clemente, Gomez-Cadenas, 2012; Maleki et al., 2019). Особенно обширные исследования посвящены анализу *in vitro* засухоустойчивости представителей этого семейства (Россеев, 2011; Тагиманова и др., 2013; Круглова и др., 2019б; Farshadfar et al., 2012; Pykalo et al., 2018, 2019). Кроме того, эффективность методов культуры *in vitro* злаков показана по отношению к действию засоления (Khuder, AL-Taei, 2015; Alhasnawi et al., 2017; Kononenko et al., 2020), гипоксии и апоксии (Вартапетян и др., 2014), повышенной концентрации ионов токсических металлов (Баранова и др., 2015) и других стресс-факторов.

Использование методов культуры *in vitro* в качестве экспериментальных способов оценки стресс-устойчивости эксплантов имеет ряд преимуществ. Помимо возможности проводить исследования большой выборки генотипов практически круглый год в одних и тех же стандартизированных условиях и изучать реакцию большого количества эксплантов на относительно небольшой площади, к таким преимуществам следует отнести возможность осуществлять строгий контроль и манипуляцию эксплантами (и далее регенерантами) на всех этапах их развития *in vitro*. Параметры условий культуры *in vitro*, заданные аналогично экстремальным условиям *in vivo*, дают возможность детально анализировать реакции эксплантов/регенерантов на действие конкретных абиотических стрессов (в ряде случаев – нескольких стресс-факторов в комплексе), что сложно изучить в тепличных и полевых условиях из-за изменчивого характера действия этих стрессов. Кроме того, в культуре *in vitro* при добавлении стресс-агента в селективную среду происходит непосредственное взаимодействие со стрессором практически всех клеток экспланта с их генетическим аппаратом. Важно и то, что в результате использования селекции *in vitro* возможно получение регенерантов, устойчивых сразу к нескольким стрессовым факторам (Зинченко и др., 2013; Perez-Clemente, Gomez-Cadenas, 2012;

Merks, Guravage, 2013; Abdelnour-Esquivel et al., 2020). Основным преимуществом, по нашему мнению, следует считать сходство морфогенетических реакций растений *in vivo* и эксплантов/регенерантов *in vitro*, согласно принципу универсальности морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях (Батыгина, 2014).

Безусловно, использование культивируемых в селективных условиях эксплантов/регенерантов, как и любой метод, имеет свои ограничения. Так, введение эксплантов в культуру — сам по себе стрессовый фактор, предполагающий адаптацию клеток к условиям *in vitro*. Кроме того, при длительном культивировании возможны снижение или даже потеря клетками морфогенетического потенциала. Ограничения вносят и изменчивость генома, и гетерогенность культивируемых клеток, обусловленная эпигенетическими особенностями экспланта. Условия селективных систем *in vitro* могут индуцировать изменения морфологических, биохимических, физиологических и вызванных соматоклональной изменчивостью генетических показателей полученных регенерантов (Дубровная, 2017; Круглова и др., 2018а; Рукало, Dubrovna, 2018; Ikeuchi et al., 2019). Все это свидетельствует о важности тщательного изучения полученных регенерантов, обязательного проведения полевых испытаний для подтверждения их генетической стабильности.

Тем не менее, в селективных условиях культуры *in vitro* получены регенеранты злаков, толерантные к различным экологически неблагоприятным абиотическим факторам, например, засухе (Россеев и др., 2011; Никитина и др., 2014; Шуплецова, Щенникова, 2016; Круглова и др., 2019б; Farshadfar et al., 2012; Рукало et al., 2018, 2019). При этом подтверждено сохранение повышенной толерантности к засухе у потомков большинства форм, полученных в результате клеточной селекции *in vitro*, что указывает на мутационную природу толерантности (Дубровная, 2017).

Отдельное направление оценки стресс-устойчивости растений в условиях культуры *in vitro* связано с использованием так называемой эмбриокультуры *in vitro*. Безусловная перспективность этого направления определяется тем, что зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциалами взрослого организма (Терехин, 1996), в том числе способностью противостоять стрессам, хотя эта способность может и не реализоваться.

Многочисленными исследованиями выявлены два пути формирования регенерантов в эмбриокультуре *in vitro* — прямой и непрямой (последний состоит в образовании регенерантов через этап формирования морфогенных каллусов). Ранее авторами данной статьи были выполнены обзоры, посвященные анализу данных по изучению устойчивости злаков к стрессовым абиотическим

факторам с использованием морфогенных зародышевых каллусов *in vitro* и полученных из них регенерантов (Круглова и др., 2018а, 2021а; Зинатуллина, 2020). Цель данной работы — анализ литературных и собственных данных, посвященных оценке засухоустойчивости злаков с использованием регенерантов, полученных в эмбриокультуре *in vitro* напрямую, минуя этап формирования морфогенных каллусов.

КУЛЬТУРА *in vitro* АВТОНОМНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В ОЦЕНКЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ЗЛАКОВ

Эмбриокультура in vitro
как биотехнологический прием

Метод эмбриокультуры состоит в культивировании *in vitro* разновозрастных зиготических зародышей (Plant embryo culture ..., 2011). Ханнинг (Hannig, 1904, по: Raghavan, 2003) был первым, кто выделил в асептических условиях зрелые зиготические зародыши растений родов *Raphanus* и *Cochlearia* и культивировал их на дополненной сахарозой минеральной среде до получения проростков. Далее этот метод активно разрабатывался многими исследователями на примере представителей различных семейств как покрытосеменных, так и голоосеменных растений. История развития метода эмбриокультуры *in vitro* подробно изложена в работах Рагхавана (Raghavan, 2003), Хэслэма и Еунга (Haslam, Yeung, 2011).

В настоящее время метод культивирования *in vitro* разновозрастных зародышей используется экспериментаторами в целях, например, изучения физиологических факторов, контролирующих морфогенез и дифференциацию зародышей; исследования развития зародышей, полученных путем экстракорпорального оплодотворения яйцеклеток; анализа преждевременного прорастания семян; разработки способов преодоления покоя семян (Батыгина, 2014; Raghavan, 2003; Haslam, Yeung, 2011; Hussain et al., 2012). Этот метод незаменим как прием “спасения зародыша” (embryo rescue) по отношению к гаплоидным зародышам ячменя, полученным с помощью так называемого метода *bulbosum* путем межвидового скрещивания культурных форм ячменя *Hordeum vulgare* L. с гаплопродюсером — многолетней самостерильной луковичной формой ячменя *Hordeum bulbosum* 2х (Kumari et al., 2018). Метод хорошо зарекомендовал себя в биотехнологических исследованиях злаков для получения и сохранения амфидиплоидных и интерплоидных межвидовых гибридов (Дьячук и др., 2009) и как эффективный способ получения растений-регенерантов через этап формирования морфогенных каллусов из незрелых зародышей (подробнее см.: Круглова и др., 2021б).

В то же время, метод эмбриокультуры *in vitro* — один из немногих, если не единственный, биотехнологический способ прямого получения растений-регенерантов злаков, минуя этап формирования морфогенных каллусов. Исследователи при этом используют как зрелые (Rostami et al., 2013; Delporte et al., 2014 и др.), так и незрелые (Круглова, Сельдиминова, 2011; Игнатова, 2011; Голева и др., 2014; Никитина, Хлебцова, 2014; Бычкова, 2016; Бычкова и др., 2016; Основы биотехнологии ..., 2017; Круглова и др., 2019б; Zuraida et al., 2011; Zhang et al., 2015; Noga et al., 2016) зародыши представителей этого семейства. Выявлено, что в данном случае более эффективна эмбриокультура *in vitro* именно незрелых зародышей.

Следует отметить, что при биотехнологических исследованиях злаков с применением культивирования *in vitro* незрелых зародышей, за редким исключением (Круглова и др., 2019б; Zuraida et al., 2011), авторы не сообщают, на какой именно стадии развития находятся инокулируемые зародыши. Как правило, указывается время, прошедшее от опыления до инокуляции зародышей на индукционную среду, реже — длина инокулируемых зародышей; в ряде публикаций сообщается о том, что в качестве экспланта использован “незрелый зародыш”, без детализации. Причина этого заключается, по-видимому, в отсутствии общепринятой периодизации эмбриогенеза злаков, во-первых, основанной на детальных гистологических данных с выявлением четких морфологических и временных границ стадий эмбриогенеза, во-вторых, удобной в биотехнологической практике, особенно при массовой сезонной работе. Заметим, что нами (Круглова, 2012б; Kruglova, 2013) разработана такая периодизация для яровой мягкой пшеницы, пока не получившая широкого распространения.

В то же время, данные о стадии эмбриогенеза, на наш взгляд, принципиально важны при использовании эмбриокультуры *in vitro*, когда необходимо инокулировать незрелый зародыш, способный напрямую дать начало проростку и далее растению-регенеранту. Действительно, разновозрастные зародыши одного и того же генотипа по-разному реагируют на аналогичные условия культивирования *in vitro*, как это выявлено, например, в ходе специальных детальных исследований обширной коллекции сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы (Круглова, 2012а,б, 2014; Круглова и др., 2018б,в). В контексте анализируемой проблемы важно охарактеризовать ту стадию развития, когда незрелый зародыш способен самостоятельно дать начало полноценному растению. Рассмотрим этот важный вопрос на примере злаков.

Выявление критической стадии относительной автономности как методологический подход к прямому получению регенерантов в эмбриокультуре in vitro

Развитие зародыша растений представляет собой единый процесс, в результате которого из исходной тотипотентной клетки — зиготы — формируется зрелый зародыш, согласно определенным паттернам клеточных делений (Эмбриология цветковых ..., 2000; Батыгина, 2014; Methods in ..., 2008; De Vries, Weijers, 2017). Эмбриогенетические законы (закон происхождения, закон чисел, закон расположения, закон экономии, по: Шамров, 1997) отражают сложность этого процесса.

Особенно сложен эмбриогенез у злаков. Зародыш представителей этого семейства характеризуется становлением дорзовентральности строения с первых этапов развития (начиная с зиготы) и спецификой органогенеза, приводящей к уникальности его строения (наличие таких высокодифференцированных и специализированных органов, как эпибласт, щиток, лигула и др.). Все это дало основание выделить особый тип эмбриогенеза злаков — Graminad (Батыгина, 2014 и ранее). Правомочность выделения Graminad-типа эмбриогенеза подтверждается исследованиями различных видов злаков (Круглова и др., 2019а).

Хорошо известно, 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 (Батыгина, 2014).

Ряд стадий эмбриогенеза исследователи относят к критическим.

В литературе представлены различные мнения о критериях выделения критических стадий эмбриогенеза растений. Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой (Батыгина, Васильева, 1983) в основу выделения таких стадий положен системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций в развитии эмбриональных структур; при этом критическими стадиями авторы называют отрезки времени, характеризующиеся сменой структурно-функциональных характеристик в развитии зародыша и окружающих тканей семени и плода. И.И. Шамров с соавт. (Шамров, 2008; Shamrov, Anisimova, 2003 и др.) в работах, посвященных периодизации развития семязачатка и

семени цветковых растений, на основании морфогенетических и морфофизиологических корреляций критическими стадиями называют относительно короткие отрезки времени, связанные со структурно-функциональными перестройками семязачатка и семени и названные по основной образующейся эмбриональной структуре. Как полагают Уоринг и Филипс (Wareing, Phillips, 1981), в критические стадии эмбриогенеза растений происходит переключение программы развития зародыша на альтернативные пути, а те или иные его части становятся “детерминированными” в отношении их дальнейшей дифференциации. Эта точка зрения во многом согласуется с понятием эмбриональной индукции у животных – взаимодействием эмбриональных закладок, ведущим к формообразовательному эффекту посредством ткани-мишени, которая становится детерминированной к определенному типу развития; затем детерминированное состояние ткани реализуется в процессе дифференциации (Gilbert, 2018).

Цикл работ Т.Б. Батыгиной и В.Е. Васильевой (Батыгина, 1987, 2014; Батыгина, Васильева, 1987; Васильева, Батыгина, 1997; Batygina, Vasilyeva, 1987, 1988; Vasilyeva, Batygina, 2006) посвящен анализу критической стадии относительной автономности зародыша цветковых растений как проявлению автономизации онтогенеза особи. Исследователи полагают, что, в отличие от полной автономности, когда прекращаются все структурные и функциональные связи зародыша с материнским организмом (плодом, семенем), и не зависимый от окружающих тканей зародыш способен к саморегуляции и образованию проростка, на стадии относительной автономности зародыш становится независимым от физиологических и биохимических факторов материнского организма, главным образом гормонов. Иначе говоря, на стадии относительной автономности закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша как нового организма. Учитывая, что становление автономности – сложный длительный процесс, исследователи предлагают ввести понятие “степень автономности” как количественное и временное выражение зависимости зародыша от материнского организма.

Проблема относительной автономности зародышей на примере злаков в сравнении с представителями других семейств цветковых растений проанализирована в работе (Круглова и др., 2020). Авторы полагают, что, с одной стороны, выявление этой критической стадии эмбриогенеза, во многом обусловленной структурными особенностями зародыша злаков, способствует решению ряда проблем теоретической морфологии и эволюции высших растений. С другой стороны, данные об относительной автономности зародыша имеют практическое значение при выявлении

и характеристике статуса незрелых зародышей злаков, оптимальных для использования в эмбриокультуре *in vitro* с целью прямого получения растений-регенерантов в условиях *in vitro* и далее *ex vitro*.

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 (Батыгина, Васильева, 1987); 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 (Круглова, 2013).

Выявление стадии относительной автономности развивающихся зародышей злаков детально проведено на примере ячменя и пшеницы. Исследование незрелых зародышей культурных форм ячменя *Hordeum vulgare* L., согласно первому критерию, показало, что зародыши этого злака становятся относительно автономными на 10–14 сут в зависимости от генотипа (Игнатова, 2011). В результате анализа обширной коллекции сортов и гибридных комбинаций яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. на основе второго критерия выявлена относительная автономность их зародышей, в зависимости от генотипа, на 12–15 сут после опыления (Круглова, 2014; Круглова и др., 2018б,в). Некоторое несоответствие временных показателей становления относительной автономности зародышей ячменя и пшеницы, помимо климатических условий зон произрастания и погодных условий вегетационных сезонов, можно объяснить таксоноспецифичностью этой критической стадии, которая характеризуется комплексом морфогенетических и физиолого-биохимических признаков зародыша у представителей конкретного таксона (в данном случае – вида). Заметим, что аналогичный таксоноспецифичный “разброс” проявления стадии относительной автономности демонстрируют и исследованные в этом отношении зиготические/соматические зародыши двудольных (Васильева, Батыгина, 1997).

Публикаций, специально посвященных оценке гистологического статуса зародышей злаков в критической стадии относительной автономности, в литературе представлено немного. Так, в сводке (Васильева, Батыгина, 1997) в качестве таковой указана стадия дифференциации щитка и апекса побега. В то же время высказано мнение (Круглова и др., 2020), что критической стадией относительной автономности зародышей злаков следует считать стадию дифференциации всех органов, свойственных зародышу злаков: щиток

(семядоля), лигула, почечка, состоящая из апекса побега и первого листа, колеоптиль, эпибласт, колеориза, мезокотиль, зародышевый корень. Такой гистологический статус выявлен у зародышей пшеницы на 12–15 сут после опыления (Круглова и др., 2018б,в), что лишний раз подтверждает правомерность использования второго, более жесткого, критерия выявления стадии относительной автономности зародышей растений, по крайней мере у исследованных в этом отношении генотипов пшеницы.

В работе (Сельдиминова и др., 2017б) приведены данные ультраструктурных исследований клеток незрелого зародыша пшеницы на 15–17 сут после опыления (частично соответствует стадии относительной автономности – *Авт.*). Выявлено, что клетки щитка такого зародыша содержат липидные капли и крупные амилопласты, аккумулирующие крахмал. В клетках апекса побега имеются митохондрии и единичные хорошо развитые хлоропласты. Представленные в этой работе данные о наличии липидных капель и об аккумуляции крахмала в клетках щитка зародыша пшеницы свидетельствуют о синтезе в этих клетках конституционных веществ, а в целом об их высокой метаболической активности. Это подтверждается и наличием в клетках апекса побега такого зародыша хорошо развитых митохондрий и пластид в виде хлоропластов.

Готовность зародышей в стадии относительной автономности к самостоятельному развитию характеризуется и рядом физиологических признаков, главным образом наличием в них эндогенных гормонов (независимость от экзогенных гормонов подтверждается успешным культивированием относительно автономных зародышей *in vitro* на безгормональной среде).

Известно, что собственная гормональная система злаков, как и других растений, формируется постепенно в ходе эмбриогенеза и активно участвует в регуляции процессов роста и развития зародышей (Круглова и др., 2019а). Можно полагать, что ключевые гормоны морфогенеза – ауксины, влияющие на рост клеток, и цитокинины, влияющие на клеточные деления (Медведев, Шарова, 2011), присутствуют в зародышах злаков на стадии относительной автономности (около 12–15 сут после опыления), хотя специальных исследований не проводилось. Такое предположение подтверждается, например, результатами гормональных исследований сухой массы развивающихся зерновок пшеницы: на 12 сут после опыления в них отмечено резкое увеличение содержания ИУК (индолилуксусной кислоты) и цитокининов, соответствующее быстро увеличению размера зерновки (Hess et al., 2002), а также зерновок ячменя: на 14 сут после опыления зафиксирован максимальный показатель содержания в них

цитокининов (Сельдиминова и др., 2018). Кроме того, интенсивное окрашивание на ИУК отмечено в клетках апикальной части зародыша и в клетках развивающихся органов зародыша пшеницы в фазу органогенеза, включающую стадию дифференциации апекса побега и органов (Сельдиминова и др., 2017а).

В целом, зародыш злаков, находящийся в критической стадии относительной автономности, по своему морфологическому, гистологическому и физиологическому (гормональному) статусу готов к самостоятельному развитию, независимо от материнского организма. В практике биотехнологических исследований методом эмбриокультуры *in vitro* именно относительная автономность является той стадией развития инокулируемых незрелых зародышей, начиная с которой они дадут начало нормальным проросткам и далее растениям в условиях как *in vitro*, так и *ex vitro*.

*Относительно автономные зародыши злаков
в оценке засухоустойчивости в селективных
условиях in vitro*

Физиологическая засуха – неблагоприятное сочетание метеорологических условий, при которых растения испытывают длительный водный дефицит в воздухе и почве (Кузнецов, Дмитриева, 2011). Это один из наиболее распространенных абиотических стресс-факторов не только в засушливых, но и в полузасушливых регионах мира, приводящий к значительным потерям урожая сельскохозяйственных растений и возникновению угрозы продовольственной безопасности (Plant life ..., 2020). Высказано мнение, что недостаток воды в почве наносит значительно больший вред растениеводству, чем все другие стрессовые факторы, вместе взятые (Дубровная, 2017; Пикало и др., 2020). В целом, важность исследований различных аспектов влияния засухи и формирования адаптивной устойчивости к этому стресс-фактору у сельскохозяйственных растений, включая хлебные злаки, невозможно переоценить.

Одно из перспективных биотехнологических направлений, позволяющих дать оценку имеющихся или создаваемых сортов и гибридных комбинаций злаков по признаку устойчивости к стресс-фактору “засуха” – использование эмбриокультуры относительно автономных зародышей *in vitro* на селективной питательной среде, имитирующей дефицит влаги. Действительно, степень структурной и функциональной дифференциации таких зародышей обусловлена не только его генотипом (тип эмбриогенеза, специфика развития), но и генотипом всего материнского организма (условия внутри развивающегося семени, опосредованно связанного с материнским организмом в целом), в том числе способностью

особи противостоять засухе (Васильева, Батыгина, 1997).

В качестве введенных в питательную среду селективных осмотических агентов, имитирующих засуху, в практике культивирования *in vitro* злаков, как и представителей других семейств растений, используют полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 (ПЭГ 6000) или 10000 (ПЭГ 10000), маннит, сорбит, сахарозу, хлорид натрия различных концентраций (Никитина и др., 2013, 2014; Бычкова, Хлебцова, 2015; Сельдиминова, 2019; Rykalo et al., 2018, 2019 и др.). Особенной популярностью пользуется ПЭГ 6000, который за счет высокой молекулярной массы не проникает в клетки, но вызывает коллапс клеточных стенок и сжатие протопласта, то есть удачно имитирует водный баланс клеток в условиях осмотического стресса (Freitas et al., 2020). В то же время селективная система *in vitro* с введением маннита эффективнее, поскольку обеспечивает более полную элиминацию чувствительных клеток и более высокую жизнеспособность выживших растений-регенерантов (Дубровная, 2017; Пикало и др., 2020). В целом, в каждом конкретном случае исследователи делают свой выбор в пользу того или иного иммитанта засухи, в зависимости от целей и условий экспериментов.

Однако, несмотря на перспективность, исследований незрелых относительно автономных зародышей злаков в культуре *in vitro* на селективных средах с введением иммитатора засухи в доступной литературе сравнительно немного. По мнению О.В. Дубровной с соавт. (Дубровная и др., 2014, по: Пикало и др., 2020), это можно объяснить недостаточной разработанностью такой биотехнологии, и с этим мнением следует согласиться.

Е.Д. Никитиной с соавт. (Никитина и др., 2014) проведена оценка эффективности различных способов клеточной селекции (жесткая, мягкая и смешанная) сортов яровой мягкой и твердой пшеницы, различавшихся по показателю засухоустойчивости в полевых условиях, на устойчивость к индуцированному хлоридом натрия осмотическому стрессу культивируемых *in vitro* незрелых зародышей (авторы не применяют термин “эмбриокультура *in vitro*”). Сравнительный анализ уровня полевой засухоустойчивости сорта и реакции на способ отбора показал, что успех регенерации при мягкой селекции определяется в большей степени регенерационным потенциалом генотипа *in vitro*, а не его устойчивостью к засухе. Жесткая селекция с использованием сублетальной дозы хлорида натрия как селективного агента для отбора стресс-устойчивых регенерантов мягкой пшеницы возможна лишь для генотипов с высоким регенерационным потенциалом. Полученные данные соответствуют общепринятому мнению, что регенерация в куль-

туре *in vitro* определяется в первую очередь особенностями генотипа донорного растения (Ikeuchi et al., 2019; Sugimoto et al., 2019). Эта работа интересна и тем, что авторы провели изучение стресс-устойчивости ряда сортов твердой пшеницы, исследования которой в условиях *in vitro* не столь многочисленны.

Результаты детальных исследований засухоустойчивости относительно автономных незрелых зародышей обширной коллекции родительских сортов и гибридных комбинаций прямых и рецiproкных скрещиваний яровой мягкой пшеницы в селективных условиях культуры *in vitro* приведены в работах Н.Н. Кругловой с соавт. (Круглова, 2012в, 2013, 2014; Круглова и др., 2018б,в, 2019б). Исследователи применили жесткий критерий оценки засухоустойчивости незрелых зародышей по их способности дать начало проростку, развивающемуся до фазы кушения *in vitro* в условиях, имитирующих дефицит влаги введением в состав питательной среды осмотика ПЭГ 6000 сублетальной концентрации 12–14%, оценкой развития проростка до фазы полной спелости зерна в почвенных условиях *ex vitro*, а также проанализировали лабораторную всхожесть полученных зерновок *in situ*. В результате исследований выявлены генотипы пшеницы, характеризующиеся как способностью незрелых зародышей к формированию проростков в условиях имитации засухи, так и достаточно высокой лабораторной всхожестью зерновок. Интересно, что авторами не выявлена зависимость между устойчивостью/неустойчивостью к засухе незрелых зародышей родительских сортов и их гибридов; отмечены случаи, когда при скрещивании засухоустойчивых сортов получены гибриды с достаточно высокой степенью устойчивости незрелых зародышей в селективных условиях *in vitro*. Повидимому, такая отзывчивость зародышей гибридов определяется сложным взаимодействием генотипов родительских форм; возможно, этот признак контролируется множественными генами, что характерно для количественных признаков (Драгавцев, 2019). Выявленные в результате многолетних наблюдений засухоустойчивые генотипы рекомендованы 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 в стадии относительной автономности 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 можно отнести к селекционным исследованиям всех хлебных злаков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стресс-устойчивость растений – сложный процесс, определяемый количественными признаками мультигенного наследования, поэтому так перспективны разработки различных модельных экспериментальных систем для исследования этого биологического феномена. К таким системам можно отнести культуру *in vitro* клеток, тканей и органов, дающую возможность приблизиться как к пониманию закономерностей и особенностей ответных реакций растений на воздействие абиотических стресс-факторов, так и к разработке способов управления адаптацией растений к стресс-условиям.

Одной из экспериментальных систем для изучения клеточных и тканевых механизмов реакции растений на различные стресс-факторы может служить такое направление эмбриокультуры *in vitro*, как культивирование незрелых зиготических зародышей в стадии относительной автономности. Основанием для использования такой системы является обладание зародышем всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма, а также основанное на универсальности путей морфогенеза сходство ответных реакций растений *in vivo* и эксплантов (в данном случае – автономных незрелых зародышей) *in vitro*.

В то же время, несмотря на более чем 110-летнюю историю изучения эмбриокультуры *in vitro*, работ, посвященных использованию этого метода в стресс-оценке растений, в отличие от использования в аналогичных целях зародышевых каллусных культур *in vitro*, не так много. Тем не менее, биотехнологии с использованием незрелых зародышей в стадии относительной автономности могут способствовать прямому получению стресс-устойчивых регенерантов. Преимущество данного подхода состоит в инокуляции незрелых зародышей, уже не зависимых от физиологических факторов материнского организма. Структурная и физиологическая готовность относительно автономных зародышей к дальнейшему нормальному развитию и формированию полноценных регенерантов позволит сэкономить время исследований. Так, согласно нашим подсчетам по пшенице, при этом достигается выигрыш во времени не менее чем в 15 сут в сравнении с использованием зрелых зародышей. Кроме того, использованием культуры *in vitro* незрелых автономных зародышей можно избежать дорогостоящих и трудоемких этапов формирования морфогенных каллусов и индуцирования в них регене-

рации растений путем чередования питательных сред. Это особенно важно и в тех случаях, когда цель биотехнологии состоит в минимизации соматональной изменчивости, обычно связанной с использованием каллусных культур *in vitro*.

В целом, использование культуры *in vitro* незрелых зародышей в стадии относительной автономности можно оценивать как удобный и надежный биотехнологический инструмент для экспресс-тестирования генотипов хозяйственно ценных растений на действие различных стрессов и как один из способов создания устойчивых к стресс-факторам районированных сортов – конечной цели селекции.

Дальнейшее развитие биотехнологий культивирования *in vitro* относительно автономных зародышей можно связать с успехом применения молекулярно-генетических подходов, данными функциональной геномики, результатами исследований трансгенеза, что даст новые возможности классической селекции в области разработок повышения стресс-устойчивости хозяйственно ценных растений, в том числе злаков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме № АААА-А18-118022190099-6 в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00326-19-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке данной статьи участие людей и использование животных в качестве объектов исследований не применялось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алабушев А.В., Ионова Е.В., Лиховидова В.А. и др. Оценка засухоустойчивости озимой мягкой пшеницы в условиях модельной засухи // Земледелие. 2019. № 7. С. 35–37.
- Баймагамбетова К., Булатова К. Поэтапная оценка сортов и линий яровой пшеницы на засухоустойчивость // Selekc. i semenars. 2013. V. XIX. Broj. 2. S. 27–34.
- Баранова Е.Н., Чабан И.А., Кононенко Н.В. и др. Морфофункциональная характеристика каллусов ячменя, толерантных к токсическому действию алюминия // Биол. мембраны. 2015. Т. 32. № 3. С. 1–13.
- 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., Васильева В.Е. Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений // Онтогенез. 1983. Т. 14. № 3. С. 304–311.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Прикладные аспекты эмбриологии. Автономность зародыша и эмбриокультура цветковых растений // Ботан. журн. 1987. Т. 72. № 2. С. 155–161.
- Бычкова О.В. Оценка эффективности морфогенеза и регенерации яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biol. Sib. 2016. № 2 (1). С. 139–149.
- Бычкова О.В., Хлебцова Л.П. Физиологическая оценка засухоустойчивости яровой твердой пшеницы // Acta Biol. Sib. 2015. Т. 1. № 1–2. С. 107–116.
- Бычкова О.В., Ерещенко Д.В., Розова М.А. Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biol. Sib. 2016. Т. 2. № 2. С. 76–80.
- Вартапетян Б.Б., Долгих Ю.И., Полякова Л.И. и др. Биотехнологические подходы в создании растений, толерантных к гипоксии и аноксии // Acta Natur. 2014. Т. 6. № 2 (21). С. 21–33.
- Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Автономность зародыша // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 579–588.
- Веселов С.Ю., Шарипова Г.В., Тимергалин М.Д. и др. Прогноз засухоустойчивости по содержанию абсцизовой кислоты и изучение возможности упрощения процедуры ее количественной оценки в растениях пшеницы // Изв. Самарск. науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 5 (3). С. 17–20.
- Глобальные изменения климата и прогноз рисков в сельском хозяйстве России / Ред. А.Л. Иванов, В.И. Кирюшин. М.: Россельхозакадемия, 2009. 518 с.
- Голева Г.Г., Батлук Ю.А., Ващенко Т.Г. и др. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* // Вест. Воронежск. гос. агр. ун-та. Сельскохозяйств. науки. 2014. № 3 (42). С. 17–22.
- Грабовец А.И., Фоменко М.А. Совершенствование методологии селекции пшеницы в условиях недостаточного увлажнения // Зерн. и круп. культуры. 2016. № 2 (18). С. 48–53.
- Драгавцев В.А. Решения технологических задач селекционного повышения урожаев, вытекающие из теории эколого-генетической организации количественных признаков // Бюл. ГНБС. 2019. Вып. 132. С. 17–28.
- Дубровная О.В. Селекция пшеницы *in vitro* на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам // Физиол. раст. генет. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
- Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Столярова С.В. и др. Клеточные биотехнологии в создании исходного материала для селекции тритикале // Агр. вест. Юго-Востока. 2009. № 2. С. 9–10.
- 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.
- Зинченко М.А., Дубровная О.В., Бавол А.В. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к комплексу стрессовых факторов и анализ полученных форм // Изв. Самарск. науч. центра РАН. 2013. Т. 15. № 3 (5). С. 1610–1614.
- Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
- Инжееваткин Е.В., Савченко А.А. Неспецифическая метаболическая реакция клеток на экстремальные условия // Изв. РАН. Серия биол. 2016. № 1. С. 6–16.
- Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2012а. № 3. С. 57–61.
- Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2012б. № 2. С. 21–24.
- Круглова Н.Н. Оценка коллекции генотипов яровой мягкой пшеницы по устойчивости автономных зародышей на селективных средах *in vitro*, имитирующих засуху // Изв. Самарск. науч. центра РАН. 2012в. Т. 14. № 1. С. 2243–2245.
- Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2013. № 1. С. 42–45.
- Круглова Н.Н. Выявление автономности зародыша пшеницы как этап разработки экспресс-диагностической биотехнологии получения засухоустойчивых образцов // Пермск. агр. вест. 2014. № 1 (5). С. 38–43.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
- 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. Критическая стадия автономности зародыша пшеницы *in planta* // Биомика. 2018б. Т. 10. № 1. С. 1–6.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление относительной автономности *in planta* зиготических зародышей яровой мягкой пшеницы для оптимизации биотехнологических исследований // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2018в. № 3. С. 28–33.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // Успехи соврем. биол. 2019а. Т. 139. № 4. С. 326–337.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых гено-

- типов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестн. Башкирск. гос. агр. ун-та. 2019б. Т. 52. № 4. С. 37–41.
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. и др. Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков) // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 3–18.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллусные культуры *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков // Та-врический вестн. аграр. науки. 2021а. № 1 (25). С. 124–139.
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности экспериментальной системы “зародыш *in vivo*–каллус *in vitro*” хлебных злаков // Онтогенез. 2021б. Т. 52. № 4. С. 237–253.
- Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиол. раст. 2013. Т. 60. № 2. С. 155–165.
- Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.: Абрис, 2011. 783 с.
- Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. В 2-х т. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 253 с.
- Никитина Е.Д., Хлебцова Л.П. Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // Изв. Алтайск. гос. ун-та. Биол. науки. 2014. Т. 2. № 3. С. 46–50.
- Никитина Е.Д., Хлебцова Л.П., Соколова Г.Г., Ерещенко О.В. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro* // Изв. Алтайск. гос. ун-та. Биол. науки. 2013. № 3. С. 95–98.
- Никитина Е.Д., Хлебцова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Изв. Алтайск. гос. ун-та. Биол. науки. 2014. Т. 2. № 3. С. 50–54.
- Основы биотехнологии растений / Ред. Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с.
- Парфенова Е.С., Шамова М.Г., Набатова Н.А. и др. Оценка относительной засухоустойчивости сортов озимой ржи способом проращивания на растворе сахарозы // Междунар. журн. прикл. фунд. иссл. 2018. № 11. Ч. 2. С. 347–351.
- Пикало С., Демидов О., Юрченко Т.И. и др. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці // Вісн. Львівськ. ун-ту. Сер. біол. 2020. Вип. 82. С. 63–79.
- Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестн. Алт. гос. агр. ун-та. 2011. Т. 76. № 2. С. 32–34.
- Сельдимирова О.А. Тестирование селективных агентов для оценки яровой мягкой пшеницы на устойчивость к засухе // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 1. С. 51–62.
- Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2017а. № 3 (1). С. 114–118.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Сравнительный ультраструктурный анализ формирующихся микроспориальных эмбрионов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы как основа понимания цитофизиологических аспектов их развития // Онтогенез. 2017б. Т. 48. № 3. С. 220–233.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта *Sterptoe* и его АБК-дефицитного мутанта *AZ34* // Экобиотех. 2018. Т. 1. № 3. С. 134–142.
- Тагимонова Д.С., Ергалиева А.Ж., Райзер О.Б., Хапилина О.Н. Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 2. С. 42–46.
- Терехин Э.С. Семя и семенное размножение. СПб.: Мир и семья-95, 1996. 376 с.
- Шамров И.И. Эмбриогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 297–307.
- Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: КМК, 2008. 350 с.
- Шуплецова О.Н., Щенникова И.Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе // Вавилов. журн. генет. селекц. 2016. Т. 20. № 5. С. 623–628.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. СПб.: Мир и семья, 2000. 652 с.
- Abdelnour-Esquivel A., Perez J., Rojas M. et al. Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>
- Abdolshahi R., Nazari M., Safarian A. et al. Integrated selection criteria for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs using discriminant analysis // *Field Crops Res.* 2015. V. 174. P. 20–29.
- Alhasnawi A.N., Zain C.R., Kadhim A.A. et al. Accumulation of antioxidants in rice callus (*Oryza sativa* L.) induced by β -glucan and salt stress // *Austral. J. Crop Sci.* 2017. V. 11. P. 118–125.
- Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement // *Genes.* 2019. V. 10 (10). P. 771. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>

- Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Some aspects of embryo-culture (autonomy of embryo) of flowering plants // *Phytomorphology*. 1987. V. 37. P. 283–288.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Some aspects of autonomy of embryo in flowering plants // *Phytomorphology*. 1988. V. 38. P. 293–297.
- Chaichi M., Sanjarian F., Razavi K., Gonzalez-Hernandez J.L.* Phenotypic diversity among Iranian bread wheat landraces, as a screening tool for drought tolerance // *Acta Physiol. Plant*. 2019. V. 41. P. 1–15.
- De Vries S.C., Weijers D.* Plant embryogenesis // *Curr. Biol*. 2017. V. 27. P. 870–873.
- Dehghani I., Mostajeran A., Esmaeili A., Ghannadian M.* The role of *DREB2* gene in drought tolerance of common wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with *Azospirillum brasilense* // *Appl. Ecol. Environ. Res*. 2019. V. 17. P. 4883–4902.
- Delporte F., Pretova A., Du Jardin P. et al.* Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // *Protoplasma*. 2014. V. 251. P. 1455–1470.
- Demydov O., Khomenko S., Fedorenko M. et al.* Stability and plasticity of collection samples of durum spring wheat in the forest-steppe conditions of Ukraine // *Am. J. Agr. Forest*. 2021. V. 9. P. 83–88.
- Eid M.* Validation of SSR molecular markers linked to drought tolerant in some wheat cultivars // *J. Plant Breed. Genet*. 2018. V. 6. P. 95–109.
- El-Mowafi H.F., Al Kahtani M.D.F., Abdallah R.M. et al.* Combining ability and gene action for yield characteristics in novel aromatic cytoplasmic male sterile hybrid rice under water-stress conditions // *Agriculture*. 2021. V. 11. (3). P. 226.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11030226>
- Falaknaz M., Aalami A., Mehrabi A.A. et al.* Assessing *Aegilops tauschii* genotypes to drought stress using tolerance indices // *Cereal Res*. 2019. V. 8. P. 483–494.
- Farshadfar E., Jamshidi B., Cheghamirza K. et al.* Evaluation of drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in vivo* and *in vitro* techniques // *Ann. Biol. Res*. 2012. V. 3. P. 465–476.
- Freitas W.C., Medina P.F., Giomoto G.S., Almeida J.A.S.* PEG 6000 and sucrose in the control of the direct somatic embryogenesis capacity in *Coffea arabica* L. // *J. Glob. Biosci*. 2020. V. 9. P. 7364–7376.
- Gahlaut V., Jaiswal V., Kumar A. et al.* Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet*. 2016. V. 129. P. 2019–2042.
- Ghorbel M., Saibi W., Brini F.* Abiotic stress signaling in Brassicaceae plants // *J. Soil Plant Biol*. 2020. V. 1. P. 138–150.
- Gilbert S.F.* Developmental biology. 11th ed. / Ed. R. Mayers. 2018. Электронный документ. Режим доступа: <https://www.pdfdrive.com/developmental-biology-e188565455.html>
- Grzesiak M.T., Hordynska N., Maksymowicz A. et al.* Variation among spring wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in response to the drought stress. II – Root system structure // *Plants*. 2019. V. 8 (12). P. 584.
<https://doi.org/10.3390/plants8120584>
- Gupta S., Mishra V.K., Kumari S. et al.* Deciphering genome-wide WRKY gene family of *Triticum aestivum* L. and their functional role in response to abiotic stress // *Gen. Genom*. 2018. V. 41 (1). P. 79–94.
<https://doi.org/10.1007/s13258-018-0742-9>
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y. et al.* Molecular mechanisms of plant regeneration // *Ann. Rev. Plant Biol*. 2019. V. 70. P. 377–406.
- Jogawat A., Yadav B., Lakra N. et al.* Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review // *Physiol. Plant*. 2021. V. 172 (2). P. 1106–1132.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13328>
- Haslam T.M., Yeung E.C.* Zygotic embryo culture: an overview // *Plant embryo culture: methods and protocols*. Chapter 1. Methods in molecular biology / Eds T.A. Thorpe, E.C. Yeung. N.Y., L., Dordrecht, Heidelberg: Springer, 2011. V. 710. P. 3–16.
- Hess J.R., Carman J.G., Banowitz G.M.* Hormones in wheat kernels during embryony // *Plant Physiol*. 2002. V. 159. P. 379–386.
- Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H. et al.* Plant tissue culture: current status and opportunities // *Recent Adv. Plant In Vitro Cult*. Intech. 2012. P. 1–21.
<https://doi.org/10.5772/50568>
- Khuder H.H., AL-Taei Yu.I.H.* Effect of salt stress on some growth indicators and cellular components of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus // *Int. J. Appl. Agr. Sci*. 2015. V. 1. P. 91–94.
- Kimotho R.N., Baillo E.H., Zhang Z.* Transcription factors involved in abiotic stress responses in Maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era // *Peer J*. 2019. 46 p.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7211>
- Kononenko N., Baranova E., Dilovarova T. et al.* Oxidative damage to various root and shoot tissues of durum and soft wheat seedlings during salinity // *Agriculture*. 2020. V. 10 (3). P. 55.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10030055>
- Kruglova N.N.* Periodization of wheat embryo structure on the base of anatomy and morphology criteria // *Mod. Phytomorphol*. 2013. V. 4. P. 181–183.
- Kumari P., Eshwari T., Hul R.* Embryo rescue in horticultural crops // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*. 2018. V. 7(6). P. 3350–3358.
- Leng P., Zhao J.* Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize // *Theor. Appl. Genet*. 2019. V. 133 (5). P. 1455–1465.
<https://doi.org/10.1007/s00122-019-03494-y>
- Maleki M., Ghorbanpour M., Nikabadi S. et al.* *In vitro* screening of crop plants for abiotic stress tolerance // *Recent approaches in omics for plant resilience to climate change* / Ed. S. Wani. Cham: Springer, 2019. P. 75–91.

- Mehraban A., Tobe A., Gholipouri A. et al. Evaluation of drought tolerance indices and yield stability of wheat cultivars to drought stress in different growth stage // World J. Environ. Biosci. 2018. V. 7. P. 8–14.
- Merks R.M.H., Guravage M.A. Building simulation models of developing plant organs // Plant organogenesis: methods and protocols. Methods in molecular biology / Ed. I. De Smet. N.Y.: Springer Science+Business Media, 2013. V. 959. P. 333–352.
- Methods in molecular biology. V. 427: Plant embryogenesis / Eds M.E. Suarez, P.V. Bozhkov. Totowa, N.J.: Humana Press, 2008. 184 p.
- Noga A., Skrzypek E., Warchoł M. et al. Conversion of oat (*Avena sativa* L.) haploid embryos into plants in relation to embryo developmental stage and regeneration media // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 590–597.
- Perez-Clemente R.M., Gomez-Cadenas A. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions // Recent advances in plant *in vitro* culture / Eds A. Leva, L. Rinaldi. Published under CC BY 3.0 license, 2012. <https://doi.org/10.5772/50671>
- Plant life under changing environment: responses and management / Eds D.K. Tripathi et al. USA: Academic Press (Elsevier), 2020. 1020 p.
- Plant embryo culture: methods and protocols / Eds T.A. Thorpe, E.C. Yeung. N.Y., L., Dordrecht, Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.
- Pykalo S.V., Dubrovna O.V. Variability of the triticale genome *in vitro* // *Cyt. Genet.* 2018. V. 52. P. 385–393.
- Pykalo S.V., Demydov O.A., Prokopik N.I. et al. *In vitro* screening of the spring wheat F2 hybrids for water deficit resistance // *ScienceRise: Biol. Sci.* 2018. № 3 (12). C. 12–18.
- Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T. et al. Comparative assessment of methods for evaluation of drought tolerance in winter bread wheat varieties // *ScienceRise: Biol. Sci.* 2019. V. 4 (19). P. 17–21. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2019.186813>
- Raghavan V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2003. V. 39. P. 437–442.
- Raveena, Bharti R., Chaudhary N. Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2019. V. 8. P. 1780–1792.
- Rostami H., Giri A., Nejad A.S.M. et al. Optimization of multiple shoot induction and plant regeneration in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars using mature embryos // *Saudi J. Biol. Sci.* 2013. V. 20. P. 251–255.
- Sakkar T., Thankappan R., Mishra G.P., Nawade B.D. Advances in the development and use of *DREB* for improved abiotic stress tolerance in transgenic crop plants // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2019. V. 25. P. 1323–1334.
- Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F. et al. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (13). P. 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms2013137>
- Sattar S., Afzal R., Bashir I. et al. Biochemical, molecular and morpho-physiological attributes of wheat to upgrade grain production and compete with water stress // *Int. J. Inn. App. Agricult. Res.* 2019. V. 3. P. 510–528.
- Shamrov I.I., Anisimova G.M. Critical stages of ovule and seed development // *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2003. V. 45. P. 167–172.
- Sonmezoglu O.A., Terzi B. Characterization of some bread wheat genotypes using molecular markers for drought tolerance // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2018. V. 24. P. 159–166.
- Sugimoto K., Temman H., Kadokura S., Matsunaga S. To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019. V. 47. P. 138–150.
- Vasilyeva V.E., Batygina T.B. Autonomy of the embryo // *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. V. 2. Seed* / Ed. T.B. Batygina. Enfield, NH, USA: Science Publishers, Inc. 2006. P. 375–382.
- Wang X., Zenda T., Liu S. et al. Comparative proteomics and physiological analyses reveal important maize filling-kernel drought-responsive genes and metabolic pathways // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (15). P. 3743. <https://doi.org/10.3390/ijms20153743>
- 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. 164–176.
- Wareing F.P., Phillips I.D.J. *Growth and differentiation in plants.* Oxford: Pergamon press, 1981. 343 p.
- Yadav S., Sharma K.D. Molecular and morphophysiological analysis of drought stress in plants // *Plant growth. Ch. 10* / Ed. E.C. Rigobelo. 2016. <https://doi.org/10.5772/65246>
- Yadav A.K., Carroll A.J., Estavillo G.M. et al. Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse-imposed drought // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 4931–4948.
- Yadav B., Jogawat A., Rahman M.S. et al. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review // *Gene Repts.* 2021. V. 23. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yang C., Wang D., Zhang C. et al. Comprehensive analysis and expression profiling of PIN, AUX/LAX, and ABCB auxin transporter gene families in *Solanum tuberosum* under phytohormone stimuli and abiotic stresses // *Biology.* 2021. V. 10 (2). P. 127. <https://doi.org/10.3390/biology10020127>
- Zhang W., Wang X., Fan R. et al. 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.
- 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.

***In Vitro* Culture of Autonomous Embryos as a Model System for the Study of Plant Stress Resistance to Abiotic Factors (on Example of Cereals)**

N. N. Kruglova^{a, *} and A. E. Zinatullina^a

^a *Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia*

^{*}*e-mail: kruglova@anrb.ru*

One of the directions of experimental evaluation of plant stress resistance to abiotic factors under *in vitro* culture model conditions is the use of zygotic embryos of a particular stage of development (*in vitro* embryo culture) as explants. Especially prospective in this respect is the culture *in vitro* of immature embryos that are at the critical stage of relative autonomy. Such embryo, independent from the physiological factors of the mother's body, is able to give autonomous rise to the full-fledged plant under adequate conditions *in vitro* and then *ex vitro*. This makes it possible to obtain regenerants directly, avoiding the additional stage of morphogenic callus formation. The article on the example of cereals presents the review of the literature and own data on the identification of the relative autonomy stage of embryogenesis *in vivo*, as well as the use of relatively autonomous embryos in the assessment of drought resistance under selective conditions *in vitro*. It is emphasized that the prospects of embryo culture *in vitro* using as a model system in evaluating of plant stress resistance are determined by the fact that the embryo has all morphogenetic potentials of an adult organism, as well as by the similarity of morphogenetic reactions of plants *in vivo* and explants/regenerants *in vitro* according to the principle of universality of plant morphogenesis in natural and experimental conditions.

Keywords: embryogenesis, embryo autonomy, embryo culture *in vitro*, stress, drought, resistance, cereals