

УДК 633.11:581.143.5

МОРФОГЕНЕЗ АНДРОКЛИННЫХ КАЛЛЮСОВ ЗЛАКОВ IN VITRO

Н.Н. КРУГЛОВА¹, О.В. ДУБРОВНАЯ²

¹Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69
e-mail: Kruglova@anrb.ru

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

Обсуждены вопросы индукции и реализации морфогенетического потенциала клеток андроклинных каллюсов злаков в условиях in vitro. Проанализирован не-прямой эмбриоидогенез как путь морфогенеза in vitro андроклинных каллюсов.

Ключевые слова: биотехнология, культура in vitro, андроклиния, пыльник, каллюс, эмбриоид.

Морфогенез как процесс развития многоклеточных организмов из одной клетки или группы клеток остается сложнейшей проблемой биологии. Одним из наиболее перспективных экспериментальных подходов к изучению тонких особенностей морфогенеза растений является метод культуры in vitro изолированных пыльников. Данный метод основан на использовании явления андрогенеза in vitro или, корректнее, андроклинии — феномена образования растений-регенерантов из морфогенетически компетентных микроспор/клеток пыльцевого зерна. Как правило, в результате воздействия внешних стрессовых факторов такие микроспоры/клетки пыльцевого зерна способны, в зависимости главным образом от фитогормонального состава индукционной питательной среды, к формированию эмбриоидов (путем прямого эмбриоидогенеза) или каллюсов (путем каллюсогенеза). Часть клеток каллюсов реализует свой потенциал различными путями морфогенеза in vitro [14, 17, 34].

Каллюсогенез in vitro у злаков как хозяйственно-ценных растений вызывает особый интерес. Цель статьи — проанализировать работы, посвященные исследованиям индукции и реализации морфогенетического потенциала в условиях in vitro клеток андроклинных каллюсов злаков.

Обсуждение термина «андроклинный каллюс». Однозначное понимание термина «каллюс» в литературе отсутствует (подробнее см. [16, 18]). Согласно Батыгиной [1], под каллюсом мы понимаем гетерогенную интегрированную структуру (систему), образующуюся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма; каллюс формируется, как правило, из исходно разных клеток генеративных или вегетативных органов, состоит из групп неоднородных клеток, имеющих морфогенетические потенциалы, которые реализуются различными путями морфогенеза.

Для характеристики каллюса, образовавшегося в культуре изолированных пыльников, предложено использовать термин «андроклинный

каллюс» [16, 18]. Широко распространенный термин «андрогенный каллюс», на наш взгляд, не вполне приемлем, поскольку, как справедливо полагает Тырнов [31], необходимо различать понятия «андрогенез *in vitro*» и собственно «андрогенез».

Формирование и развитие андроклинных каллюсов злаков на индукционной среде *in vitro*. В литературе отсутствует единая периодизация развития андроклинного (как и любого другого) каллюса *in vitro* на индукционной среде. Этот вопрос очевидно надолго останется открытым, поскольку каллюс представляет собой гетерогенную систему групп клеток, каждая из которых, по-видимому, развивается по своим морфогенетическим закономерностям, в том числе временным.

Детальные цитогистологические данные, полученные на примере культивируемых *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы [13], показали следующее. На начальном этапе культивирования (первые 5—6 сут) инициальная клетка каллюса (сильновакуолизированная микроспора, по нашей периодизации [12]) претерпевает аномальное равное (симметричное) деление с образованием двуклеточного каллюса. Дальнейшие деления двух образовавшихся клеток с последовательным заложением клеточных оболочек ведут сначала к формированию четырехклеточного (на 7—9-е сутки культивирования), а затем — многоклеточного каллюса (на 10—12-е сутки культивирования). На этом этапе все клетки многоклеточного каллюса имеют сходные размеры и одинаковую морфологию. В ходе дальнейшего культивирования пыльников клеточная масса каллюса интенсивно увеличивается путем многократных митотических делений составляющих его клеток; в каллюсе постепенно формируется определенная зональность клеток. В целом мы предлагаем выделять следующие принципиальные стадии генезиса андроклинного каллюса на индукционной среде *in vitro*: инициальная клетка (сильновакуолизированная микроспора) — двуклеточный каллюс — четырехклеточный каллюс — многоклеточный каллюс.

Аналогичный способ формирования многоклеточных андроклинных каллюсов из сильновакуолизированных микроспор (зачастую другие авторы не совсем корректно называют эту стадию «одноклеточной микроспорой» или «одноклеточным пыльцевым зерном») отмечен в культуре пыльников других злаков [40—42, 56], а также капусты [55, 65], перца [60], банана [38], нима [46], тополя [49]. В то же время в литературе представлены данные о способах формирования морфогенных андроклинных каллюсов злаков из других инициальных клеток помимо сильновакуолизированной микроспоры. Так, формирование многоклеточного каллюса у риса связано с аномальным делением так называемой средней одноядерной микроспоры (эмбриологически корректнее — слабовакволизированной микроспоры, по нашей периодизации [12]) [47], тогда как у пшеницы [43, 58, 62, 63] и кукурузы [27] этот процесс состоит в аномальном делении вегетативной клетки двуклеточного пыльцевого зерна. У риса [68] в образовании каллюса принимают участие и генеративная, и вегетативная клетки пыльцевого зерна (хотя их участие в этом процессе более характерно для представителей семейства пасленовых (по [40])).

В целом абсолютное большинство авторов сходятся во мнении, что формирование морфогенного каллюса связано с аномальным развитием микроспор или клеток пыльцевого зерна. Отдельные авторы полагают, что симметричность или асимметричность деления микроспоры не столь

важна в «судьбе» производных этой клетки; гораздо более важную роль в формировании каллюса играют условия культивирования [76]. Таким образом, единое мнение в этом вопросе отсутствует.

Особое внимание, на наш взгляд, следует уделить такой малоизученной проблеме, как влияние тканей стенки гнезда пыльника на индукцию формирования каллюсов. Культивирование изолированных пыльников с использованием метода «няньки», а также работы по прекультивированию пыльников свидетельствуют о том, что соматические клетки стенки гнезда пыльника воздействуют на микроспоры и клетки пыльцевого зерна как своеобразные индукторы или ингибиторы морфогенеза *in vitro* по пути каллюсогенеза. Так, по данным Махешвари и др. [66, 67], в начальный период культивирования в стенке пыльника пшеницы образуются некие вещества, индуцирующие «каллюсогенный» путь развития пыльцевых зерен; затем стареющая стенка высвобождает ингибиторы этого процесса.

В литературных источниках отсутствует единое мнение о том, какие именно ткани стенки пыльника участвуют в образовании и развитии каллюсов. Рагхаван [74] на белене показал, что вещества, индуцирующие развитие «каллюсогенных» пыльцевых зерен, поставляют тапетум. В то же время Роуз и др. [79] указывают на полную дегенерацию тапетума в пыльниках сорго к моменту их инокуляции. Некоторые авторы сообщают об активной роли экзотеция и эндотеция в развитии каллюса в пыльниках риса [51, 84] и пшеницы [61]. В целом же такого рода работы немногочисленны.

Таким образом, участие соматических тканей стенки пыльника в индукции и (или) ингибировании формирования и развития андроклинового каллюса *in vitro* очевидно. Однако проблема, связанная с выяснением роли каждой из соматических тканей в этих процессах, весьма далека от окончательного решения. В связи с этим необходимо развивать перспективный подход к культивируемым пыльникам как к сложным интегрированным системам [1, 14, 26].

В ходе дальнейшего развития многоклеточные каллюсы высвобождаются из оболочки микроспоры/пыльцевого зерна, затем, по мере наращивания клеточной массы, разрывают стомуум и оказываются на поверхности пыльника.

Отмечено морфологическое разнообразие появившихся на поверхности пыльников андроклиновых каллюсов у различных растений, в том числе злаков. Большинство авторов выделяет два контрастных типа каллюсов, различающихся окраской, структурой и консистенцией: морфогенные — как правило, белого цвета, компактные, узловатые, плотные, и неморфогенные — преимущественно желтоватого или светло-коричневого цвета, мягкие, рыхлые, водянистые [23, 25, 36, 44, 45, 83]. Разрабатываются способы регуляции морфогенеза микроспоры *in vitro*, ведущие к получению и использованию в экспериментальной работе только плотных белых морфогенных андроклиновых каллюсов (например, у пшеницы [7, 22, 23, 34] и риса [83]).

В то же время морфологические признаки не в полной мере отражают морфогенетический потенциал андроклиновых каллюсов. Например, у ряда злаков (пшеницы [44, 52], кукурузы [39], гибрида райграсса и овсяницы [88]) выделены андроклиновые морфогенные каллюсы рыхлой консистенции. Аналогичные данные получены в культуре пыльников других растений (сливы [73], огурца [37], банана [38], нима [46], манио-

ка [35], спаржи [64], баклажана [69], томата [87]), а также в каллюсных культурах, полученных из вегетативных органов, например листа кормовой свеклы [9]. Кроме того, детальный гистологический анализ рыхлых андроклинных каллюсов пшеницы, морфологически идентифицированных как неморфогенные, позволил установить, что в зависимости от фитогормонального состава питательной среды часть таких каллюсов может содержать меристематические клетки, способные к дальнейшему формированию органов (мы назвали такие каллюсы потенциально морфогенными) [23].

Приведенные наблюдения заставляют пересмотреть сложившиеся представления о неморфогенной природе рыхлых каллюсов. Более того, рыхлый эмбриогенный каллюс вызывает большой интерес исследователей, поскольку, с одной стороны, он сохраняет регенерационную способность в течение длительного времени, с другой — является ценным источником клеточных суспензий и протопластов, также обладающих регенерационной способностью.

В литературе приводятся немногочисленные данные по сканированию каллюсов, появившихся на поверхности пыльников. Например, в результате изучения плотных белых (в дальнейшем — способных к морфогенезу) андроклинных каллюсов пшеницы с применением сканирующего электронного микроскопа установлено, что поверхность каллюса характеризуется различной формой — гладкой, узловатой, ворсистой, бугорчатой [19].

Одно из перспективных направлений исследования каллюсов — совмещение данных, полученных при сканировании их поверхности, с результатами светооптического анализа состояния тканей и отдельных клеток внутри этих же каллюсов. Такой подход позволяет сопоставить пространственные характеристики каллюсов с их цитогистологическим статусом. Установлено, например, что морфогенные андроклинные каллюсы пшеницы, по данным сканирующей электронной микроскопии представляющие собой комплексы однородных плотно расположенных мелких клеток полусферической формы, при светооптическом анализе характеризуются наличием нескольких клеточных зон, состоящих из однородных меристематических клеток, и зон вакуолизированных клеток паренхиматозной природы [19]. Сопоставление данных сканирующей электронной микроскопии и световой микроскопии позволяет отбирать и использовать в биотехнологической практике заведомо морфогенные каллюсы, что дает возможность оптимизировать получение андроклинных растений-регенерантов.

В ходе исследований клеток появившихся на поверхности пыльника плотных белых каллюсов пшеницы методом трансмиссионной электронной микроскопии установлены следующие их характеристики: цитоплазма электропрозрачна, содержит небольшое количество полирибосом; митохондрии с хорошо развитой структурой разнообразны по размерам и форме; характерно явление автолиза; аппарат Гольджи развит слабо; амилопласты содержат одно—два крахмальных зерна и небольшое количество осмиофильных включений [5, 14]. В клетках таких каллюсов есть основные цитологические предпосылки для процессов, связанных с энергетическими затратами, что подтверждает их морфогенный статус.

Морфогенез андроклинных каллюсов злаков на регенерационной среде *in vitro*. Андроклинные морфогенные каллюсы, появившиеся на поверх-

ности пыльника, далее переносят на регенерационную среду *in vitro*.

Выявлены такие пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинных каллюсов злаков и представителей других семейств на регенерационной среде, как непрямо́й эмбриоидогенез — формирование эмбриоида, гемморизогенез — формирование почки и корня, геммогенез — формирование почки, ризогенез — формирование корня, гистогенез — формирование тканей [4, 14, 17, 28, 30, 34, 35, 37, 38, 44, 46, 50, 53, 61, 64, 73, 78, 83, 89]. Важно, что такие же пути морфогенеза отмечены в культуре *in vitro* других органов и структур злаковых растений, например незрелых зародышей сорго [33] и пшеницы [11]. Сделан вывод об универсальности путей морфогенеза в каллюсах злаков различного происхождения [15] и тем самым подтверждена универсальность путей морфогенеза растений в целом [1].

Установлено участие фитогормонов в индукции конкретного пути морфогенеза *in vitro* андроклинных каллюсов у представителей различных семейств растений [21]. Особый интерес в этом отношении вызывает индолил-3-уксусная кислота (ИУК) как один из важнейших индукторов и координаторов процессов морфогенеза растений *in vitro* [6]. Так, участие ИУК в морфогенезе детально изучено на примере культивирования андроклинных каллюсов яровой мягкой пшеницы после предварительного определения методом иммуноферментного анализа содержания в них эндогенной ИУК по критерию высокоауксиновый/низкоауксиновый. Выявлено, что индукция конкретного пути морфогенеза определялась обратно пропорциональной зависимостью между содержанием эндогенного ауксина ИУК (в составе каллюса) и концентрацией экзогенно внесенного ауксина ИУК (в составе регенерационной среды). При этом для индукции одного и того же пути морфогенеза в каллюсах пшеницы «высокоауксиновых» сортов требовалась более низкая концентрация экзогенного ауксина ИУК по сравнению с каллюсами «низкоауксиновых» сортов [7, 29].

Рассмотрим подробнее особенности наиболее интересного, по нашему мнению, пути морфогенеза в андроклинном каллюсе — непрямого эмбриоидогенеза *in vitro*, заключающегося в формировании и развитии так называемого эмбриоида.

Эмбриоид — зародышеподобная биполярная структура, образующаяся асексуально; зачаток нового растительного организма. Термин предложен Вэзилем и Хильдебрандтом [86]. История изучения эмбриоидогенеза подробно изложена в работах [2, 3, 20]. Батыгиной [2, 3] разработана концепция эмбриоидогении как высокоспециализированной формы вегетативного размножения, одного из типов гомофазной репродукции цветковых растений *in situ*, *in vivo* и *in vitro*. Основным тезисом данной концепции является универсальность морфогенеза эмбриоидов, формирующихся в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и зиготических зародышей, образующихся в естественных условиях.

К настоящему времени непрямо́й эмбриоидогенез *in vitro* в каллюсах, в том числе андроклинных, изучен у многих видов растений различных семейств [8, 28, 34, 48, 53, 70—72, 75, 78, 80]. В то же время вопрос о клеточных механизмах формирования эмбриоидов в андроклинном (и любом другом) каллюсе *in vitro* остается дискуссионным. Еще «первооткрыватели» эмбриоидогенеза в каллюсной культуре *in vitro* Стюард [81] и Райнерт [77] предположили, что эмбриоид развивается из одиночной изолированной клетки каллюса, ведущей себя как зигота и посредством

регулярных делений дифференцирующейся в целые растения. Такая гипотеза базируется на представлении об оплодотворенной яйцеклетке (зиготе) как свободноживущей клетке, не имеющей коррелятивных связей с другими клетками зародышевого мешка. Авторы полагали, что для выражения тотипотентности соматической клетки необходима ее изоляция.

Критическое отношение к гипотезе прямого пути образования эмбриоида из одиночной клетки высказывалось еще более 40 лет назад [59, 82]. Однако из-за недостаточности детальных цито- и гистологических данных о начальных этапах развития эмбриоида из одиночной изолированной клетки *in vitro*, по-видимому, и сейчас преждевременно говорить о прямом и организованном пути образования эмбриоида.

Примерно в то же время Хальперин и Дженсен [57] предложили гипотезу, согласно которой эмбриоиды возникают из одной или нескольких клеток поверхностных слоев так называемого эмбрионального клеточного комплекса (ЭКК), представляющего собой агрегат из двух типов разнородных клеток — периферических и центральных. Эмбриоиды «высвобождаются» из этих клеточных агрегатов на разных стадиях развития и ведут себя как самостоятельные единицы, способные к образованию целого растения. Подтверждение этой гипотезы находим в ряде работ, посвященных гистологическому анализу морфогенных андроклинных каллюсов некоторых злаков. Например, у пшеницы [80] и ячменя [85] выявлен такой путь морфогенеза андроклинного каллюса *in vitro*, как эмбриоидогенез, связанный с формированием эмбриоидов из ЭКК; при этом подчеркивается, что эмбриоиды проходят стадии развития, типичные для зиготического зародыша злаков. У апельсина [53] и чая [70] в андроклинных морфогенных каллюсах также дифференцировались эмбриоиды, демонстрировавшие в своем развитии особенности, типичные для зиготического зародыша двудольных.

Показано, что на регенерационной среде андроклинный каллюс пшеницы формировал небольшие меристематические центры, рассеянные по каллюсу. Эти центры, расположенные глубоко в каллюсе, давали начало адвентивным корням. Некоторые поверхностные клетки каллюса делились с формированием многочисленных выростов, не связанных с остальным каллюсом. Морфология этих выростов (возможно, ЭКК), особенно имеющих узкое основание, напоминала зародыш. Кроме того, в толще пролиферирующих каллюсов, по-видимому, также из меристематических центров, формировались глобулярные структуры, морфологически сходные с зародышами злаков на ранней стадии развития (возможно, ЭКК) [61]. Продемонстрированная в этой работе возможность возникновения эмбриоидов из ЭКК, расположенных в толще андроклинного каллюса, согласуется с данными по формированию эмбриоидов пшеницы [11] и гречихи [8] из ЭКК в зародышевых каллюсах.

Вопрос о происхождении эмбриоида из одной или нескольких клеток приобретает особое значение с той точки зрения, что эмбриоидогенез *in vitro* и последующая регенерация растений из сформированных эмбриоидов рассматриваются как возможная альтернатива недостижимой пока во многих случаях регенерации растений из единичных клеток (протопластов) у злаков. Очевидно, что если эмбриоид возникает в результате случайного объединения нескольких различных клеток, например каллюсной ткани, то его генотип можно считать практически неидентифицируемым. Это обстоятельство исключает возможность ис-

пользования эмбриоидов в генно-инженерных и клеточно-инженерных манипуляциях.

Данные, полученные при культивировании *in vitro* каллюсов, еще раз подтверждают положение, что для запуска и поддержания тех или иных морфогенетических программ необходимо качественное сочетание и количественное соотношение фитогормонов. Так, установлено, что ведущими эндогенными фитогормонами, участвующими в процессе формирования эмбриоидов в андроклинных каллюсах пшеницы, являются ауксины и цитокинины [29]. На примере пшеницы установлена и важная роль экзогенного внесения абсцизовой кислоты (АБК) в индукции формирования эмбриоидов и растений-регенерантов в каллюсах пыльничкового [24] и зародышевого [11] происхождения.

Большой интерес вызывает изучение клеточных и тканевых механизмов влияния эндогенных и экзогенных фитогормонов на индукцию и процесс эмбриоидогенеза (как и других путей морфогенеза *in vitro*) в каллюсах различного происхождения. Так, методами иммуногистохимии выявлена локализация эндогенных ауксинов и цитокининов в клетках развивающихся андроклинных каллюсов пшеницы. Сопоставление данных цитогистологического анализа с данными иммунолокализации фитогормонов дало авторам основание сделать вывод о том, что как ауксины, так и цитокинины преимущественно локализируются в очагах меристематических клеток каллюсов [10].

В то же время использование экзогенных факторов (в том числе фитогормонов) для индукции морфогенеза клеток каллюса далеко не всегда приводит к получению эмбриоидов, поскольку дифференциация клеток в культуре *in vitro* зависит не только от внешних стимулов, но во многом определяется генотипом и текущим состоянием клеток эксплантата [54].

Для объяснения путей морфогенеза *in vitro* клеток андроклинного каллюса, по-видимому, применима концепция о существовании особого класса наследственных единиц — эпигенов как систем генов, имеющих не менее двух устойчивых режимов функционирования подчиненных им генов и способных сохранять каждый из режимов в последовательном ряду генераций [32]. Вполне вероятно, что в данном случае реализуются эпигеномные подпрограммы развития компонентной клетки каллюса. Рассматриваемая ситуация усложняется тем, что сами каллюсные клетки, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием органов, зародышеподобных структур или тканей, берут начало от одной клетки — микроспоры или клетки пыльцевого зерна. Более того, в зависимости от условий культивирования (главным образом, от фитогормонального состава индукционной питательной среды) микроспора/клетка пыльцевого зерна может развиваться не только по пути формирования каллюса, как рассматривалось выше, но и альтернативно — по пути формирования эмбриоида непосредственно (так называемый прямой эмбриоидогенез) (см. [34]).

Таким образом, изучение различных аспектов морфогенеза *in vitro* андроклинных каллюсов открывает широкие перспективы для решения ряда сложнейших проблем современной биологии.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук О.А. Сельдимировой за помощь в подготовке рукописи статьи к печати.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 08-04-97045), Академии наук республики Башкортостан (проект № 40/40-П) и программы «Ведущие науч-

ные школы РФ» (грант НШ 2096.2008.04, лидер школы — чл.-кор. Российской академии наук Т.Б. Батыгина).

1. *Батыгина Т.Б.* Хлебное зерно: атлас. — Л.: Наука, 1987. — 103 с.
2. *Батыгина Т.Б.* Эмбрионид // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семья. — СПб.: Мир и семья, 1997. — С. 624—628.
3. *Батыгина Т.Б.* Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. — СПб.: Мир и семья, 2000. — С. 35—39.
4. *Белинская Е.В.* Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогенезу in vitro и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1, 2. — С. 11—20.
5. *Галиева Э.Р., Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.* Сравнительное исследование ультраструктуры клеток андроклинных эмбрионидов и каллусов пшеницы в процессе их развития // Цитология. — 2001. — 43, № 4. — С. 333—334.
6. *Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г.* Ауксины в культурах тканей и клеток растений. — Новосибирск: Наука, 1990. — 243 с.
7. *Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н.* Индукция андрогенеза in vitro у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Изв. РАН. Сер. Биология. — 2001. — № 1. — С. 31—36.
8. *Гумерова Е.А., Чуенкова С.А., Гатина Е.А., Румянцева Н.И.* Соматический эмбриогенез и геммогенез в культуре гипокотилей *Fagopirum esculentum* Moench. // Физиология растений. — 2003. — 50, № 5. — С. 716—721.
9. *Дубровная О.В., Тищенко Е.Н.* Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 6. — С. 23—30.
10. *Зайцев Д.Ю., Высоцкая Л.Б.* Метод иммунолокализации цитокининов и ауксинов и оценка начальных этапов морфогенеза in vitro андроклинных каллусов пшеницы // Аграрная Россия. — 2009. — Спецвыпуск. — С. 108—109.
11. *Катасонова А.А., Круглова Н.Н.* Методический подход к оптимизации технологии получения регенерантов яровой мягкой пшеницы в культуре in vitro зародышей // Там же. — С. 110—111.
12. *Круглова Н.Н.* Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза in vitro // Изв. РАН. Сер. Биология. — 1999. — № 3. — С. 275—281.
13. *Круглова Н.Н.* Критические фазы развития спорогенной клетки пыльника злаков: к постановке проблемы // Цитология. — 2001. — 43, № 3. — С. 86—87.
14. *Круглова Н.Н.* Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. — Уфа: Гилем, 2001. — 203 с.
15. *Круглова Н.Н.* Морфогенез in vitro клеток каллусов различного происхождения // Цитология. — 2007. — 49, № 9. — С. 762—763.
16. *Круглова Н.Н.* К проблеме унификации терминологии при разработке биотехнологии андроклинной гаплоидии яровой мягкой пшеницы // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — 6, № 2. — С. 246—255.
17. *Круглова Н.Н.* Инновационная биотехнология андроклинной гаплоидии яровой мягкой пшеницы // Аграрная Россия. — 2009. — № 1. — С. 34—39.
18. *Круглова Н.Н.* Унификация терминологии при разработке инновационной биотехнологии андроклинной гаплоидии in vitro: к постановке проблемы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 6. — С. 476—486.
19. *Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н., Сельдимирова О.А.* Андрогенные эмбриониды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Изв. РАН. Сер. Биология. — 2001. — № 2. — С. 191—197.
20. *Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Батыгина Т.Б.* Эмбрионидогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи соврем. биологии. — 1995. — 115, № 6. — С. 692—705.
21. *Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Куксо П.А.* Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Там же. — 1999. — 119, № 6. — С. 567—577.
22. *Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Катасонова А.А.* Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре in vitro в целях адаптивной селекции в условиях Южного Урала // Изв. Челяб. НЦ УрО РАН. — 2006. — Вып. 2(32). — С. 94—98.
23. *Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю.* Цитофизиологические особенности различных типов андроклинных каллусов пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 1. — С. 42—50.

24. Лобанова Е.И., Шестопал О.Л., Игнатова С.А. Абсцизовая кислота как экзогенный фактор повышения регенерационного потенциала в культуре пыльников мягкой пшеницы // Вестн. Харьков. аграр. ун-та. — 2007. — Вып. 1 (10). — С. 102—110.
25. Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. — Минск: НАН Беларуси, 2001. — 170 с.
26. Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. — М.: Наука, 1984. — 270 с.
27. Сатарова Т.Н. Особенности культуры пыльников кукурузы на примере генотипа В14ХWf9 // Изв. РАН. Сер. Биология. — 1994. — № 5. — С. 771—777.
28. Сатарова Т.Н. Андрогенез и эмбриокультура у кукурузы in vitro: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 2002. — 41 с.
29. Сельдимирова О.А., Веселова С.В., Катасонова А.А., Зайцев Д.Ю. Иммуноферментный анализ каллусов яровой мягкой пшеницы // Изв. Челяб. НЦ УрО РАН. — 2007. — Вып. 1 (35). — С. 131—135.
30. Сельдимирова О.А., Титова Г.Е. Комплексный подход к изучению эмбриоидогенеза в культуре in vitro изолированных пыльников пшеницы // Аграрная Россия. — 2009. — Спецвыпуск. — С. 114—115.
31. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация. — Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. — 41 с.
32. Чураев Р.Н. Контуры неканонической теории наследственности: от генов к эпигенам // Журн. общей биологии. — 2005. — 66, № 1. — С. 13—36.
33. Эльконин Л.А., Тырнов В.С. Гистологическое исследование каллусных культур *Sorghum caffrogum* (Poaceae) со стабильной регенерационной способностью // Ботан. журн. — 1990. — 75, № 1. — С. 44—48.
34. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова и др. — М.: Наука, 2005. — 101 с.
35. Abraham A., Krishnan P.N., Seeni S. Induction of androgenesis, callus formation and root differentiation in anther culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) // Indian. J. Exp. Biol. — 1995. — 33, N 3. — P. 186—189.
36. Adda S., Reddy T.P., Kishor K. Androclinal variation in niger (*Cuzotia abyssinica* Cass) // Euphytica. — 1994. — 79, N 1—2. — P. 59—64.
37. Ashok K.H.G., Murthy H.N., Paek K.Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. // Hort. Sci. — 2003. — 98, N 3. — P. 213—222.
38. Assani A., Bakry F., Kerbellec F. et al. Production of haploids from anther culture of banana *Musa balbisiana* (BB) // Plant Cell Rep. — 2003. — 21, N 6. — P. 511—516.
39. Aulinger I.E., Peter S.O., Schmid J.E., Stamp P. Gametic embryos of maize as a target for biolistic transformation: comparison to immature zygotic embryos // Idid. — P. 585—591.
40. Babbar Sh.B., Kumari N., Mishra J.K. In vitro androgenesis: events preceding its cytological manifestation // Plant Biotechnol. and Mol. Markers. — New Delhi: Anamaya Publ., 2004. — P. 1—17.
41. Bajaj S., Rajam M.V. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine // Plant Cell Rep. — 1995. — 14, N 11. — P. 717—720.
42. Bajaj S., Rajam M.V. Polyamine accumulation and loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. Restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels // Plant Physiol. — 1996. — 112, N 3. — P. 1343—1348.
43. Barnabas B., Szakacs E., Karsai I., Bedo Z. In vitro androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application // Euphytica. — 1991. — 119, N 1—2. — P. 211—216.
44. 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. — 51, N 343. — P. 187—196.
45. Brisibe E.A., Olesen A., Andersen S.V. Characterization of anther culture-derived cell suspensions exclusively regenerating green plantlets in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica. — 1997. — 93, N 3. — P. 321—329.
46. Chaturvedi R., Razdan M.K., Bhojwani S.S. Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture // Plant Cell Rep. — 2003. — 21, N 6. — P. 531—537.
47. Chen Q.F., Wang C.L., Lu Y.M. et al. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement // Euphytica. — 2001. — 120, N 3. — P. 401—408.
48. Datta S.K. Androgenesis in cereals // Current trends in the embryology of Angiosperms. — Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 2001. — P. 471—488.
49. Deutsch F., Kumlehn J., Ziegenhagen B., Fladung M. Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture // Physiol. Plant. — 2004. — 120, N 4. — P. 613—622.
50. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauhar P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // Heredity. — 2001. — 92, N 1. — P. 56—64.

51. Fang G.-W., Liang H.-M. Influence of cold pretreatment on the efficiency anther culture of rice // Acta Physiol. Sin. — 1985. — **11**, N 4. — P. 366—380.
52. Folling L., Olesen A. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment // Plant Cell Rep. — 2001. — **20**, N 7. — P. 629—636.
53. Germana M.A., Chiancone B. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration // Ibid. — 2003. — **22**, N 3. — P. 181—187.
54. Gorpenchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P. et al. The *Agrobacterium rhizogenes rolC*-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses // Planta. — 2006. — **223**, N 3. — P. 457—467.
55. Guo Y.-D., Pulli S. In vitro pollen culture and the regeneration on *Brassica campestris* L. plants // Agr. Sci. Finl. — 1995. — **4**. — N 5—6. — P. 513—518.
56. Guo Y.-D., Pulli S. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.) // Plant Cell Rep. — 2000. — **19**, N 1. — P. 761—767.
57. Halperin W., Jensen W.A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures // J. Ultrastr. Res. — 1967. — **18**, N 1. — P. 428—443.
58. Hoffmann B., Schumann G., Kruger H.-U. Histological observations of morphogenesis from androgenetic tissues of *Triticum aestivum* L. I. Callus tissue // Arch. Zucht. — 1990. — **20**, H. 3. — S. 179—187.
59. Homes J.L.A., Guillaume M. Phenomenes d'organogenese dans les cultures in vitro de tissus de carotte (*Daucus carota* L.) // Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique. — 1967. — **100**, N 2. — P. 45—49.
60. Kim M., Kim J., Yoon M. et al. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*) // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2004. — **77**, N 1. — P. 63—72.
61. Konieczny R., Czapliski A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // Ibid. — 2003. — **73**, N 2. — P. 177—187.
62. Kruger H.-U. Zytologische Charakterisierung Androgenetischer Entwicklungsphasen bei Weizen (*Triticum aestivum* L.) // Arch. Zucht. — 1987. — **17**, H. 5. — S. 297—307.
63. Kruger H.-U. Ein Beitrag zum Verlauf der Androgenese bei Weizen (*Triticum aestivum* L.) // Ibid. — 1988. — **18**, H. 3. — S. 133—138.
64. Levi A., Sink K.C. Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* // Hort. Sci. — 1991. — **26**, N 10. — P. 1322—1327.
65. Liu G.-Sh., Li Y., Liu F., Cao M.-Q. Effect of high temperature on the *Brassica campestris* ssp. Pekinensis isolated microspore culture // Acta Bot. Sinica. — 1995. — **37**, N 2. — P. 140—146.
66. Maheshwari S.C., Rashid A., Tyagi A.K. Haploids from pollen grains — retrospect // Amer. J. Bot. — 1982. — **69**, N 5. — P. 865—879.
67. Maheshwari S., Tyagi A., Malhorta K., Sopory S. Induction of haploidy from pollen in Angiosperms — the current status // Theor. Appl. Genet. — 1980. — **58**, N 5. — P. 193—203.
68. Mercy S.T., Zapata F.J. Initiation of androgenesis in rice (*Oryza sativa* L. var. Taipei 309) // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. — 1987. — **53**, N 3. — P. 253—258.
69. Miyoshi K. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) // Plant Cell Rep. — 1996. — **15**, N 6. — P. 391—395.
70. Mondal T.K., Bhattacharya A., Laxmikumar M., Ahuja P.S. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2004. — **76**, N 3. — P. 195—254.
71. Palmer C.E., Keller W.A. Pollen embryos // Pollen biotechnology for crop production and improvement. — Cambridge: Cambridge Univ. press, 1997. — P. 392—422.
72. Pechan P.M., Smykal P. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte // Physiol. Plant. — 2001. — **111**, N 1. — P. 1—8.
73. Peixe A., Barroso J., Potes A., Pais M.S. Induction of haploid morphogenic calluses from in vitro cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv. Harcot // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2004. — **77**, N 1. — P. 35—41.
74. Raghavan V. Origin and development of pollen embryoids and calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (henbane) // Amer. J. Bot. — 1978. — **65**, N 9. — P. 984—1002.
75. Raghavan V. Molecular embryology of flowering plants. — Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997. — 565 p.
76. Redway F.A., Vasil V., Lu D., Vasil I.K. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. — 1990. — **79**, N 5. — P. 609—617.
77. Reinert J. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen // Berl. Deutsch. Bot. Ges. — 1958. — **71**, H. 1. — S. 218—226.

МОРФОГЕНЕЗ АНДРОКЛИННЫХ КАЛЛЮСОВ ЗЛАКОВ IN VITRO

78. *Rodrigues L.R., Terra T. de F., Bered F., Bodanese-Zanettini M.H.* Origin of embryo-like structures in soybean anther culture investigated using SSR marker // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2004. — **77**, N 3. — P. 287–289.
79. *Rose Ju.B., Dunwell J.M., Sunderland N.* Anther culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. 1. Effect of panicle pretreatment, anther incubation temperature and 2,4-D concentration // *Ibid.* — 1986. — **6**, N 1. — P. 15–22.
80. *Schumann G., Hoffman B., Kruger H.-U.* Histological observations on morphogenesis from androgenetic tissues of *Triticum aestivum* L. II. Embryoids and embryo cell complexes // *Arch. Zucht.* — 1991. — **21**, H. 3. — S. 161–168.
81. *Steward F.G.* Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretation of the growth from free cells to carrot plants // *Amer. J. Bot.* — 1958. — **45**, N 10. — P. 467–473.
82. *Torrey J.G.* Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1967. — **20**, N 2. — P. 134–140.
83. *Trejo-Tapia G., Amaya U.M., Morales G.S. et al.* The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2002. — **71**, N 1. — P. 41–46.
84. *Tsay S.-S., Tsay H.-Sh., Chao C.* Cytochemical studies of callus development from microspore in cultured anther of rice // *Plant Cell Rep.* — 1986. — **5**, N 2. — P. 119–123.
85. *Vagera J., Novotnyr J., Ohnoutkova L.* Induced androgenesis in vitro in mutated populations of barley *Hordeum vulgare* // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2004. — **77**, N 1. — P. 55–61.
86. *Vasil I.K., Hildebrandt A.C.* Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia* // *Amer. J. Bot.* — 1966. — **53**, N 9. — P. 869–874.
87. *Zagorska N.A., Shtereva L.A., Kruleva M.M. et al.* Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants // *Plant Cell Rep.* — 2004. — **22**, N 7. — P. 449–456.
88. *Zare A.G., Humphreys M.W., Rogers J.W. et al.* Androgenesis in a *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrid to generate genotypic variation for drought resistance // *Euphytica.* — 2002. — **125**, N 1. — P. 1–11.
89. *Zheng M.Y.* Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) — doubled haploid production via induced embryogenesis // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 3. — P. 213–230.

Получено 17.02.2010

МОРФОГЕНЕЗ АНДРОКЛИННИХ КАЛЮСІВ ЗЛАКІВ IN VITRO

Н.М. Круглова¹, О.В. Дубровна²

¹Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук, Уфа

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Обговорено питання індукції і реалізації морфогенетичного потенціалу клітин андрокліних калюсів злаків в умовах in vitro. Проаналізовано непрямий ембріодогенез як шлях морфогенезу in vitro андрокліних калюсів.

MORPHOGENESIS OF CEREAL ANDROCLINAL CALLUSES IN VITRO

N.N. Kruglova¹, O.V. Dubrovna²

¹Institute of Biology of Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences
69 pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The questions about induction and realization of morphogenetic potential of cereal androclinal calluses cells in in vitro conditions are discussed. Nondirect embryoidogenesis as a pathway of morphogenesis in vitro of androclinal calluses is analyzed.

Key words: biotechnology, culture in vitro, androclina, anther, callus, embryo.