The “embryo in planta – callus in vitro” system: cytophysiological aspects (by wheat example)

Kruglova N.N., Seldimirova O.A.

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia

E-mail: Kruglova@anrb.ru

Key message. Plant regeneration from calli in vitro is an integral part of a number of biotechnologies. Immature embryos (IE) are particularly promising as explants for obtaining morphogenic calli (MC) in cereals.

Keywords: embryo in planta, morphogenic callus in vitro, wheat

The aim of study is to identify the cytophysiological features of “embryo in planta–callus in vitro” system by wheat Zhnitsa cultivar as example. Methods of culture *in vitro*, light and electron microscopy (SEM, TEM), immunocytochemistry, ELISA and the author's periodization of grass embryogenesis were applied. The results of different-age IE culture showed that optimal stage of embryogenesis for obtaining MC is the beginning of organogenesis. In such IE the primordia of scutellum and shoot are laid down, its highly active meristematic cells are not yet covered by a dense wall. MC is formed from the scutellum cells that are in contact with medium. Apparently, the borderline (embryo/medium) position of the scutellum cells promotes the initiation of MC from them, while the successful receipt of the MC formation inducer (2,4-D) is favored by the absence of a dense wall. Localization of endogenous auxins and cytokinins was found in the scutellum and shoot cells. The cytophysiological features of MC in the dynamics of development *in vitro* on induction medium from histologically homogeneous structures to the histological zone installing in them with the formation of morphogenetic foci (MF) are considered. The central zones of MF are represented by highly active meristematic cells, in which endogenous auxins and cytokinins are localized. Thereby in MC the histological and hormonal prerequisites for future implementation of various morphogenesis pathways *in vitro* are created. In our opinion, the leading element of the “embryo in planta – callus in vitro” system is precisely the IE. The competence of IE cells to form MC is determined by its cytophysiological status at the time of inoculation, i.e., the present of meristematic cells of embedded organs in the absence of dense walls, as well as the localization of auxins and cytokinins in them as the key hormones of morphogenesis.

The work was carried out through the state task of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the project no. 075-00326-19-00 according to theme AAAA-A18-118022190099-6.

Система «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы)

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.

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

Аннотация. Регенерация полноценных растений из каллусов *in vitro* – неотъемлемая часть ряда биотехнологий. В качестве эксплантов для получения морфогенных каллусов (МК) у злаков особенно перспективны незрелые зародыши (НЗ).

Ключевые слова: зародыш *in planta*, морфогенный каллус *in vitro*, пшеница

Цель работы – на примере яровой мягкой пшеницы сорта Жница выявить цитофизиологические особенности системы «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*». Применили методы культуры *in vitro*, световой и электронной (СЭМ, ТЭМ) микроскопии, иммуноцитохимии, ИФА, а также авторскую периодизацию эмбриогенеза злаков. Результаты культивирования разновозрастных НЗ показали, что оптимальной для получения МК стадией эмбриогенеза является начало органогенеза. В таких НЗ заложены примордии щитка и побега, высокоактивные меристематические клетки которых еще не покрыты плотной стенкой. МК формируется из клеток щитка, находящихся в контакте с питательной средой. По-видимому, пограничное (зародыш/среда) положение клеток щитка способствует инициации из них МК, при этом успешному поступлению индуктора каллусообразования (2,4-Д в оптимальной концентрации) благоприятствует отсутствие плотной стенки. В клетках щитка и побега выявлена локализация эндогенных ауксинов и цитокининов. Рассмотрены цитофизиологические особенности МК в динамике развития на индукционной среде *in vitro* от гистологически однородных структур до становления в них гистологической зональности с формированием морфогенетических очагов (МО). Центральные зоны МО представлены высокоактивными меристематическими клетками, в которых локализованы ауксины и цитокинины. Тем самым в МК создаются гистологические и гормональные предпосылки для будущей реализации различных путей морфогенеза *in vitro*. По нашему мнению, ведущим элементом системы «зародыш *in planta* – каллус *in vitro*» является именно НЗ. Компетентность клеток НЗ к формированию МК определяется его цитофизиологическим статусом в момент инокуляции, т.е. меристематичностью клеток заложившихся органов при отсутствии плотных стенок, а также локализацией в них ауксинов и цитокининов как ключевых гормонов морфогенеза.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № AAAA-A18-118022190099-6.