

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*
МОРФОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.

© 2025 г. Н. Н. Круглова*, **, @, О. А. Сельдимирова**,
А. Е. Зинатуллина*, **, Н. А. Егорова*

*НИИ сельского хозяйства Крыма, ул. Киевская, 150, Симферополь, 295043 Россия

**Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН,

просп. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

@e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

Впервые описаны гистологические события, происходящие в морфогенных каллусах *Lavandula angustifolia* Mill. при длительном (2–5 пассажи) культивирования *in vitro*. В каллусах 2 пассажа выявлены почки и листья нормального строения (путь органогенеза *de novo*), а также соматические зародыши нормальной структуры, берущие начало от клеток эпидермиса почек (путь соматического эмбриогенеза *in vitro*). По мере дальнейшего культивирования каллусы постепенно теряли нормальный морфогенетический потенциал. Если в каллусах 3 пассажа нормальным строением характеризовались только почки, а листья имели аномальную структуру, то в каллусах 4 пассажа отмечены почки преимущественно аномального строения, в каллусах 5 пассажа – только структурно дегенерированные ткани. Обсуждается вопрос о снижении свойств плюри- и totipotentности каллусных клеток по мере культивирования *in vitro*. Полученные гистологические данные могут быть использованы при выборе длительности культивирования *in vitro* каллусов для получения полноценных регенерантов этого ценного эфиромасличного и лекарственного растения в различных клеточных биотехнологиях.

Ключевые слова: морфогенез, каллусная культура *in vitro*, длительность культивирования *in vitro*, органогенез *de novo*, соматический эмбриогенез *in vitro*, *Lavandula angustifolia* Mill

DOI: 10.31857/S1026347025010019

Морфогенез растений определяется как пространственное и временное развитие тканей, органов и зародышей, жестко контролируемое сетью генных систем, действующих последовательно или согласованно (по: Ikeuchi *et al.*, 2019).

К пониманию закономерностей и особенностей морфогенеза интактных растений позволяет приблизиться модельный подход культуры *in vitro* клеток, тканей и органов, дающий возможность изучать сложные морфогенетические процессы и механизмы их регуляции в контролируемых экспериментатором условиях. Методологическим обоснованием использования таких модельных систем служит принцип универсальности путей морфогенеза растений *in planta* и *in vitro* (Батыгина, 2014). Модельный подход культуры *in vitro* в настоящее время активно разрабатывается с различных позиций (обзоры: Long *et al.*, 2022; Bekalu *et al.*, 2023; Kulus, Tymoszuk, 2024; Pasternak, Steinmacher, 2024).

Перспективными модельными системами в этой области исследования являются культивируемые *in vitro* каллусы – интегрированные системы тканей, возникшие в результате неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток эксплантов (по: Ikeuchi *et al.*, 2022).

В современной литературе на примере многих видов растений представлено значительное количество экспериментальных данных, касающихся различных аспектов индуцирования и прохождения путей морфогенеза *in vitro* в каллусах, в оптимальных условиях приводящих к регенерации растений. Обобщению экспериментальных данных в этой области исследований посвящен ряд обзоров последних лет (Shin *et al.*, 2020; Kruglova *et al.*, 2021; Ikeuchi *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Feher, 2023; Rezaei *et al.*, 2023; Wan *et al.*, 2023).

В литературе представлено также немало публикаций, касающихся гистологического анализа как формирования каллусов из различных эксплантов,

так и путей морфогенеза *in vitro* в них (обзор: Kruglova *et al.*, 2023). Однако проблема оценки гистологических событий при реализации морфогенетического потенциала компетентных клеток каллуса при длительном культивировании *in vitro*, на наш взгляд, еще далека от окончательного решения. В то же время такие данные необходимы при оценке перспектив использования каллусов в биотехнологиях массового тиражирования полноценных регенерантов хозяйствственно ценных видов растений.

Объектом данного исследования явилась лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill. – ценное эфиромасличное растение (Паштецкий и др., 2018; Salehi *et al.*, 2018). Морфогенетические и физиолого-биохимические особенности длительного культивирования *in vitro* изучены при клonalном микроразмножении с использованием меристем лаванды в течение 9 (Yegorova *et al.*, 2019) и 16 (Babanina *et al.*, 2023) пассажей. В то же время гистологические аспекты длительного культивирования *in vitro* морфогенных каллусов не изучались, несмотря на то что для этого растения разработаны различные биотехнологии получения регенерантов каллусного происхождения (Devasigamani *et al.*, 2020; Егорова, 2021). Исследования гистологических событий в каллусах *L. angustifolia* ограничены нашей работой, посвященной сравнительной оценке статуса морфогенных и неморфогенных каллусов на самом начальном (1 пассаж) этапе их культивирования *in vitro* (Круглова и др., 2024). В частности, в этой публикации гистологическое подтверждение получили ранее морфологически выявленные у лаванды такие пути морфогенеза *in vitro* в каллусах, как органогенез *de novo* и соматический эмбриогенез *in vitro* (Егорова, 2021; Al-Tai, Mohammed, 2022).

Цель данной работы состояла в изучении гистологических событий в морфогенных каллусах лаванды узколистной *L. angustifolia* при длительном (2–5 пассажи) культивировании *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали растения лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill. сорта Степная.

Применили методы культуры *in vitro* органов и тканей растений как общепринятые (Калинин и др., 1980), так и разработанные авторами для различных клеточных технологий лаванды узколистной (Егорова, 2021). В качестве эксплантов использовали сегменты (5–7 мм) листьев растений, выращенных в условиях закрытого грунта. При введении в культуру *in vitro* материал стерилизовали в 70%-ном этаноле (40 с) и 50%-ном растворе препарата Брадофен 10Н (“Флорин” АО, Венгрия) (12 мин) и трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. Асептические работы

проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-Ламинар-С-1,2 (Россия).

Для получения первичных каллусов сегменты листьев помещали на питательную среду, содержащую макро-, микросоли и витамины по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с введением 1.0 мг/л тиодиазурина (ТДЗ, Sigma, USA). Культивирование эксплантов проводили в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 2–3 клк, 16-часовом фотопериоде. Через 4–6 недель культивирования первичные морфогенные каллусы отделяли от эксплантов, переносили для дальнейшей пролиферации на среду с добавлением α-нафтилуксусной кислоты (НУК, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1.0 мг/л и 6-бензиламинопурина (БАП, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.5 мг/л и культивировали при тех же условиях до получения морфогенных каллусов 1 пассажа. Далее через каждые 35–40 сут каллусы субкультивировали с получением каллусов 2–5 пассажей.

Для гистологического анализа фиксировали морфогенные каллусы 2–5 пассажей в стационарной фазе роста, при максимальном приросте биомассы (30-е сут цикла выращивания). Постоянные гистологические препараты готовили согласно (Световой микроскоп ..., 2013) с применением микротома НМ 325 (Microm, Германия) и окрашиванием срезов реактивом Шиффа. Препараты анализировали с использованием светового микроскопа Axio Imager A1 light microscope (Carl Zeiss, Германия), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL, и фотографировали с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Прижизненную съемку объектов вели с применением стереомикроскопа Technival 2 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой камеры Olympus Camedia C-4000 (Olympus Optical Co., LTD, Япония).

При оценке стадий развития соматических зародышей использовали периодизацию эмбриогенеза двудольных растений, представленную в работе Ка-прона с соавт. (Capron *et al.*, 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные каллусы *L. angustifolia* формировались на абаксиальной и адаксиальной сторонах, в основном в области раневой поверхности листовых эксплантов, через 2–3 недели после их введения в асептическую культуру. Через 4–6 недель культивирования *in vitro* первичные морфогенные каллусы отделяли от эксплантов и субкультивировали в течение 1–5 пассажей. Ниже приводятся данные гистологического анализа морфогенных каллусов 2–5 пассажей.

Морфогистологический анализ каллусов *L. angustifolia* 2 пассажа

В исследованных каллусах 2 пассажа по морфологическим данным отмечено множество морфогенных структур (рис. 1, а). Как показал анализ гистологических данных, такие морфогенные структуры представляют собой различные образования. Преимущественно это листовые почки на разных стадиях развития: сформированный апекс с примордиями листа 1 и 2 порядков (рис. 1, б, в), почка с развернутыми листьями (рис. 1, г). Кроме того, в таких каллусах выявлены морфогенные структуры,

которые гистологически расцениваются как соматические зародыши, находящиеся на разных стадиях эмбриогенеза: проэмбрио (рис. 1, д), глобулярный (рис. 1, е), триангулярный (рис. 1, ж), сердечковидный (рис. 1, з), торпедовидный (рис. 1, и), зрелый двусемядольный (рис. 1, к) зародыши. Важно подчеркнуть, что соматические зародыши берут начало от эпидермальных клеток апексов почек, при этом сами почки приобретают аномальное строение или дегенерируют. Необходимо также отметить, что на изученных гистологических препаратах раннего соматического эмбриогенеза не выявлена такая временная структура, как супензор.

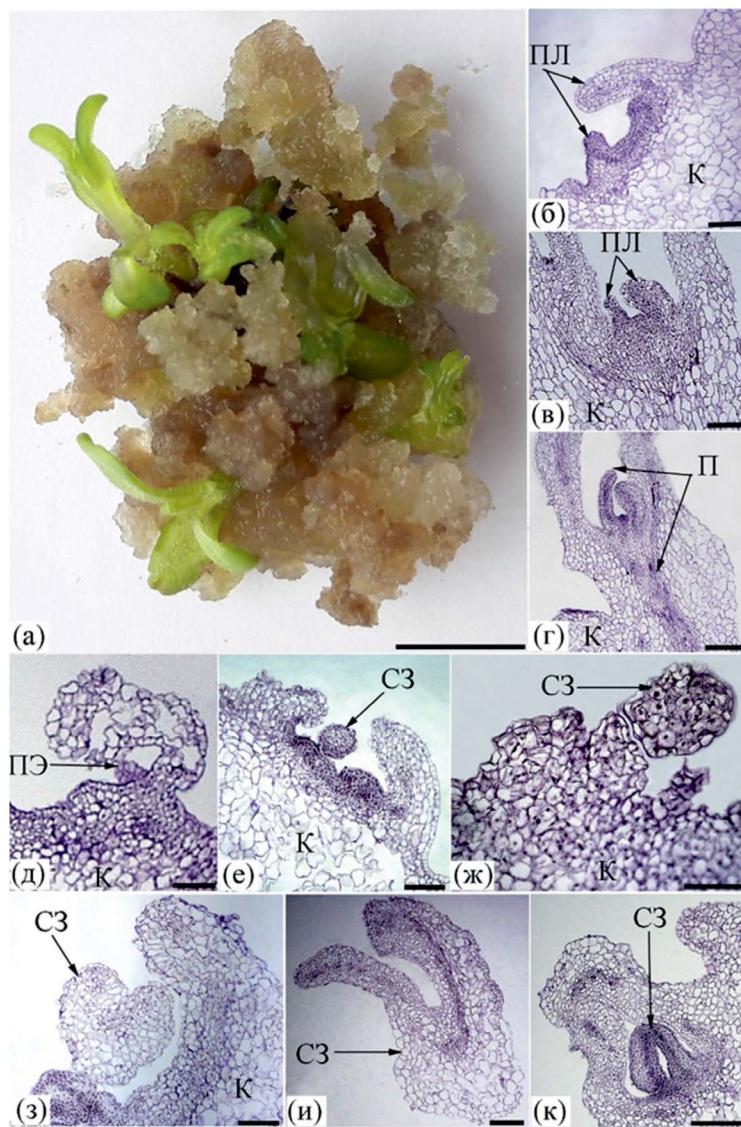


Рис. 1. Каллусы *L. angustifolia* 2 пассажа: общий вид (а); апекс с примордиями листа 1 и 2 порядков (б, в); почка с развернутыми листьями (г); проэмбрио (д); глобулярный (е), триангулярный (ж), сердечковидный (з), торпедовидный (и), двусемядольный (к) соматические зародыши. Все срезы продольные. Условные обозначения: К – каллус, П – почка, ПЛ – примордий листа, ПЭ – проэмбрио, СЗ – соматический зародыш. Масштаб: а – 10 мм; б, в, д–з – 100 мкм; г, и, к – 200 мкм.

Таким образом, в каллусах 2 пассажа гистологическое подтверждение получили такие пути морфогенеза *in vitro*, как органогенез *de novo* и соматический эмбриогенез *in vitro*.

Морфогистологический анализ каллусов *L. angustifolia* 3 пассажа

В проанализированных каллусах 3 пассажа отмечены морфогенные структуры, морфологически расцениваемые как почки и неразвернутые листья (рис. 2, а). Результаты гистологического анализа показали, что почки характеризуются нормальным строением (рис. 2, б, в), тогда как структуры, морфологически определяемые как листья, представляют собой аномальные листоподобные (рис. 2, г, д), в том числе фасцированные (сросшиеся) (рис. 2, е, ж), структуры.

В целом, в каллусах 3 пассажа гистологически подтвержден только один путь морфогенеза *in vitro* – органогенез *de novo*. При этом выявлены почки нормального строения, а также аномальные листоподобные (в том числе фасцированные) структуры.

Морфогистологический анализ каллусов *L. angustifolia* 4 пассажа

В изученных каллусах 4 пассажа выявлены морфогенные структуры, по морфологическим данным представляющие собой почки (рис. 3, а). Согласно гистологическим данным, незначительная часть почек имеет нормальную куполообразную форму апексов и последовательно заложившихся примордиев (рис. 3, б), однако большинство почек характеризуются аномальным строением. В таких почках можно видеть сильно разросшийся апекс (рис. 3, в), изменение формы апекса на коническую (рис. 3, г), при деформации примордиев. Наиболее часто аномальную структуру приобретает вся почка (рис. 3, д–ж).

В целом, в каллусах 4 пассажа выявлены почки главным образом аномального строения. Такие каллусы можно отнести к категории условно морфогенных.

Морфогистологический анализ каллусов *L. angustifolia* 5 пассажа

Каллусы 5 пассажа представляли собой рыхлые образования, без морфологически выявляемых морфогенных структур (рис. 4, а). По результатам гистологического анализа каллусы характеризовались наличием множества инвагинаций, содержащих структурно дегенерированные ткани (рис. 4, б, в). Такие каллусы следует отнести к категории неморфогенных как результату “перерождения” морфогенных каллусов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные аспекты культивирования каллусов *in vitro* изучаются с конца XIX в. (по: Kruglova *et al.*, 2018), в этой области накоплен значительный экспериментальный материал и сделаны важные теоретические обобщения. В то же время остается не до конца решенным важный вопрос, каким образом продолжительность культивирования *in vitro* влияет на проявление морфогенетического и регенерационного потенциала компетентных клеток каллуса.

Анализ литературных данных показывает, что исследования длительного культивирования каллусов *in vitro* различных растений сравнительно немногочисленны и в этой области получены противоречивые результаты. Для большинства изученных видов показано достаточно быстрое, в течение 1 года, снижение морфогенного и регенерационного потенциала клеток каллусов (по: Graner *et al.*, 2019; Егорова, 2021; Liu *et al.*, 2021). Аналогичные данные получены и по отношению к объекту данного исследования – *L. angustifolia*, однако у этого растения выявлены каллусные штаммы, сохраняющие эффективность регенерации в течение 2–3 лет (Егорова, 2021).

Установлено, что снижение и утрата потенций клеток каллусов вызывается рядом причин, главным образом сомаклональной изменчивостью и хромосомной нестабильностью, а также апоптозом (по: Graner *et al.*, 2019).

В этой связи вызывает интерес работа Лиу с соавт. (Liu *et al.*, 2021), в которой продемонстрирована уникальная способность клеток каллуса, полученного из одной почки растения женьшня сорта Damaya, сохранять как хромосомную стабильность, так и практически неизменную эффективность регенерации (6–12 регенерантов/каллус) в течение 12 лет. Авторы объясняют полученные результаты выявленной ими транскрипционной экспрессией специфических генов.

Поиск ответов на вопрос о влиянии длительности культивирования на морфогенез *in vitro* в каллусах следует вести с применением разных подходов. Один из самых важных из них – гистологический, позволяющий выявить взаимодействие и взаимосвязи структуры и функций клеток и тканей. Анализ гистологических данных по длительному (2–5 пассажей) культивированию морфогенных каллусов *L. angustifolia*, в сравнении с ранее полученными данными о гистологических показателях морфогенных каллусов 1 пассажа (Круглова и др., 2024), позволяет приблизиться к ответу на этот вопрос.

Известно, что обязательный начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах, с гистологических позиций, состоит в формировании в их толще так называемого морфогенетического очага (в другой терминологии – “меристемоид”,

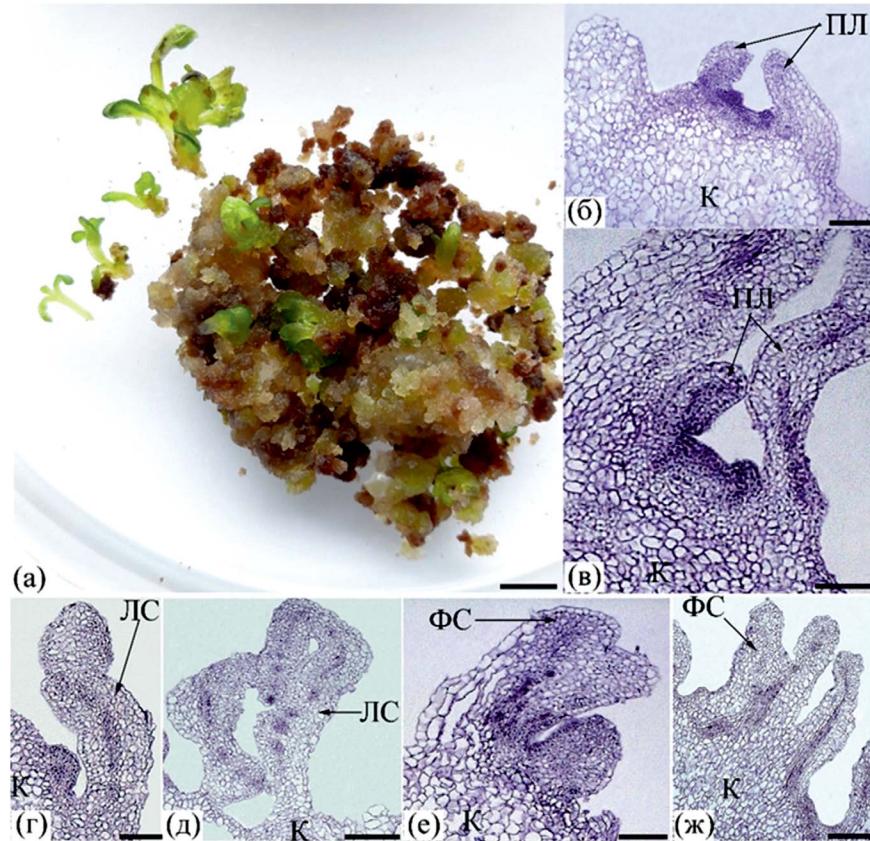


Рис. 2. Каллусы *L. angustifolia* 3 пассажа: общий вид (а); апекс почки с примордиями листа 1 и 2 порядков (б, в); листоподобная структура (г, д); фасцированная структура (е, ж). Все срезы продольные. Условные обозначения: К – каллус, ЛС – листоподобная структура, П – почка, ФС – фасцированная структура. Масштаб: а – 10 мм; б–г – 100 мкм; д–ж – 200 мкм.

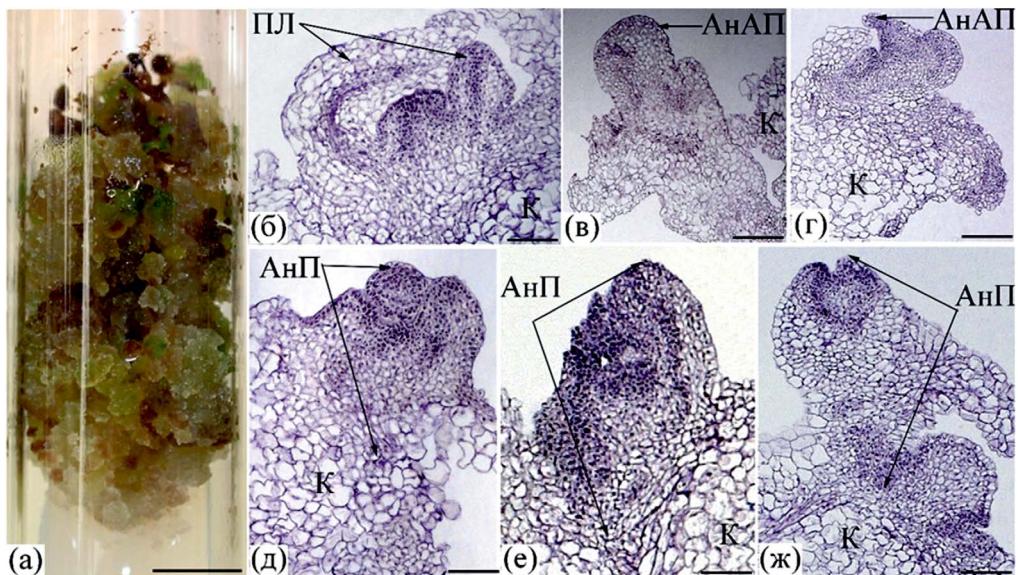


Рис. 3. Каллусы *L. angustifolia* 4 пассажа: общий вид (а); апекс почки с примордием листа 1 порядка (б); почка с аномальным апексом (в, г); аномальная почка (д–ж). Все срезы продольные. Условные обозначения: АнАП – аномальный апекс почки, АнП – аномальная почка, К – каллус, ПЛ – примордий листа. Масштаб: а – 5 мм; б, д–ж – 100 мкм; в, г – 200 мкм.

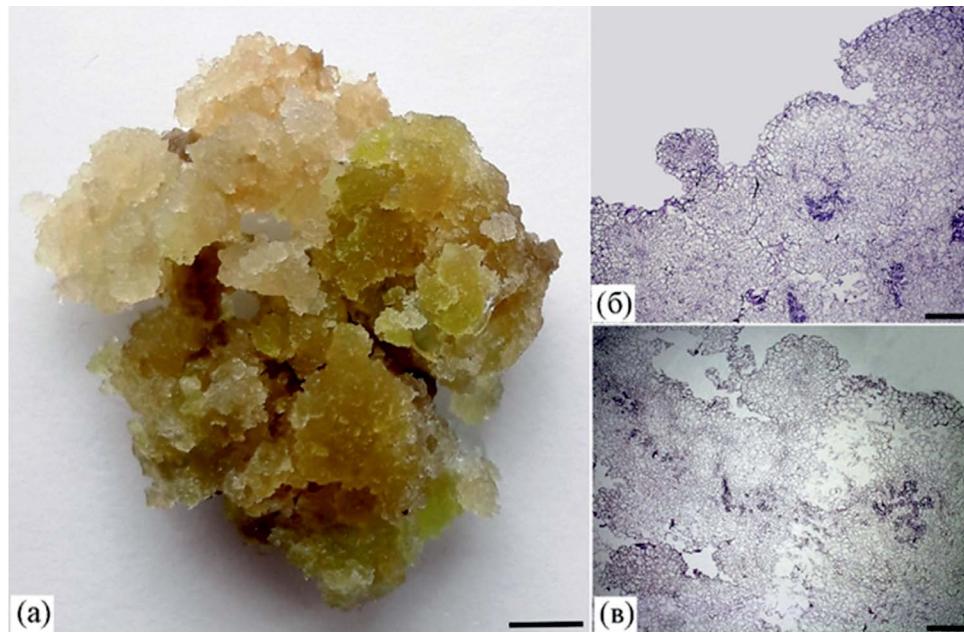


Рис. 4. Каллусы *L. angustifolia* 5 пассажа: общий вид (а); участки каллусов, представленные дегенерированными тканями (б, в). Масштаб: а – 10 мм; б, в – 200 мкм.

“меристематический центр”, “новая меристема”, “промеристема”, по: Kruglova *et al.*, 2023) как группы недифференцированных меристематических клеток, обособленной от остального каллуса. Меристематические клетки такого очага компетентны к морфогенезу *in vitro* по различным путям (обзоры: Kruglova *et al.*, 2018, 2023; Зинатуллина, 2023). Морфогенетические очаги в толще каллусов 2–5 пассажей нами не выявлены. Что касается каллусов 5 пассажа, то этот результат вполне закономерен, поскольку такие каллусы утратили свой морфогенетический потенциал (рис. 4) и расцениваются нами как неморфогенные. В каллусах же 2–4 пассажей в виде развивающихся почек нормального строения (рис. 1, б–г, рис. 2, б, в, рис. 3, б), скорее всего, получили постепенное развитие морфогенетические очаги, заложенные и сформированные еще в каллусах 1 пассажа.

Особый интерес вызывает тот результат, что в каллусах 2 пассажа кроме нормально развивающихся почек выявлены и нормально развивающиеся соматические зародыши (рис. 1, д–к). Иначе говоря, клетки каллусов и производные этих клеток демонстрируют реализацию двух различных программ развития: органогенез *de novo* как проявление свойства их плuriпотентности (способность к формированию нового органа, подробнее см.: Батыгина, 2014; Bidabadi, Jain, 2020; Zhai, Xu, 2021; Long *et al.*, 2022; Müller-Xing, Xing, 2022; Kruglova *et al.*, 2023) и соматический эмбриогенез *in vitro* как проявление свойства их totipotentности (способности к формированию нового организма, подробнее

см.: Батыгина, 2014; Feher, 2019; Bidabadi, Jain, 2020; Su *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2022; Kruglova *et al.*, 2023). Два аналогичных пути морфогенеза *in vitro* были гистологически выявлены нами и в каллусах *L. angustifolia* 1 пассажа.

Важно подчеркнуть, что последовательные стадии соматического эмбриогенеза *in vitro*, от проэмбрио до зрелого зародыша, в каллусах 2 пассажа принципиально совпадают со стадиями зиготического эмбриогенеза двудольных растений *in planta*, а именно соответствуют Capsella-варианту Onagrad-типа развития зиготического зародыша (по: Capron *et al.*, 2009), хотя и без формирования супензора. Такой результат лишний раз подтверждает перспективность использования каллусных культур *in vitro* в качестве адекватных моделей для исследования сложной проблемы морфогенеза интактных растений, в частности зиготического эмбриогенеза. Более того, даже отсутствие такой временной структуры, как супензор, может способствовать дальнейшему изучению механизмов раннего эмбриогенеза растений *in planta* (по: Peng, Sun, 2018). Кроме того, эти гистологические данные свидетельствуют о более высоком морфогенетическом потенциале клеток каллусов 2 пассажа в сравнении с каллусами 1 пассажа, где нами выявлены соматические зародыши только на ранних стадиях эмбриогенеза – глобулярной и сердечковидной.

Заметим, что сведения о выявленных в каллусах 2 пассажа *L. angustifolia* соматических зародышах на различных стадиях развития, вплоть до зрелой стадии, приводятся в работе Аль-Тай, Мохаммада

(Al-Tai, Mohammad, 2022); авторы, однако, представили только морфологические данные, без их гистологического подтверждения.

Следует подчеркнуть, что соматические зародыши в каллусах 2 пассажа, как и в каллусах 1 пассажа, брали начало от эпидермальных клеток почек. Такого рода сведения в литературе имеются, однако все исследования выполнены на примере прямого соматического эмбриогенеза *in vitro* из эпидермальных клеток различных органов, без этапа формирования каллуса. Так, получены морфологические и гистологические данные по формированию *in vitro* соматических зародышей из клеток эпидермиса листьев *Saintpaulia ionantha* (Mithila *et al.*, 2003), *Tylophora indica* (Mamgain *et al.*, 2022), *Caladium sp.* (Syeed *et al.*, 2022), *Daphne genkwa* (Ku *et al.*, 2023), придаточных корней *Neoregelia johannis* (Graner *et al.*, 2019). Высказано мнение, что такой путь прямого соматического эмбриогенеза *in vitro* представляет собой своеобразную трансдифференциацию инициальных эпидермальных клеток, определяемую избыточной экспрессией генов *WUS* и *WOX5*, а также передачей сигналов ауксинов и цитокининов (Feher *et al.*, 2016). В недавнем обстоятельном обзоре Лонга с соавт. (Long *et al.*, 2022) проанализированы сведения о молекулярных механизмах стрессовой индукции и регуляции прямого соматического эмбриогенеза *in vitro*, по мнению авторов, действующих на трех уровнях (факторы транскрипции, гормональная сигнализация и эпигенетические факторы) и приводящих к изменению “судьбы” соматической клетки и переходу ее в статус эмбриогенной стволовой клетки. Нельзя не отметить в этой связи и хорошо известные данные о развитии соматических зародышей из эпидермальных клеток листьев (фолиарная вивипария) в природных условиях в системе репродукции ряда представителей рода *Bryophyllum* (по: Батыгина, 2014).

Тот впервые полученный результат, что соматические зародыши *L. angustifolia* брали начало от эпидермальных клеток уже сформированных почек, позволяет сделать вывод о том, что путь соматического эмбриогенеза *in vitro* в данном случае вторичен по отношению к пути органогенеза *de novo*. Более позднее появление соматических зародышей в сравнении с почками гистологически выявлено также в каллусах пшеницы (Круглова, 2022). Можно полагать, что последовательность вступления инициальных клеток/групп клеток на тот или иной путь морфогенеза *in vitro* обусловлена как “критической массой” растущего каллуса на последовательных пассажах, так и тканевыми особенностями индукции формирования соответствующих морфогенных структур (почек / соматических зародышей).

В морфогенных каллусах 3 пассажа помимо нормально развитых почек (рис. 2, б, в) выявлены аномальные листоподобные структуры (рис. 2, г, д),

в том числе фасцированные (рис. 2, е, ж). Как показывает анализ литературных данных, формирование листоподобных структур описано в культивируемых *in vitro* черешках *Pelargonium sp.* (Haensch, 2004) и листьях *Neoregelia johannis* (Graner *et al.*, 2019), однако при этом гистологические данные получены не в каллусных культурах этих растений. Сведения же о фасцированных структурах, формирующихся в условиях *in vitro* не только в каллусах, но и иных образованиях, в доступной литературе нами не встречены.

Хорошо известно, что на процессы нормального морфогенеза и регенерации растений *in vitro* напрямую влияют такие гормоны, как ауксины и цитокинины (обзоры: Bidabadi, Jain, 2020; Long *et al.*, 2022; Pasternak, Steinmacher, 2024). Мы предполагаем, что аномальные листоподобные и фасцированные структуры в каллусах 3 пассажа являются результатом аномалий развития части почек 2 пассажа в результате отклонения от нормы показателей функционирования входящих в состав использованной питательной среды ауксина НУК и цитокинина БАП – главным образом, нарушением их транспорта. Такое предположение косвенно подтверждается данными о том, что фасциации зиготических зародышей пшеницы могут быть экспериментально индуцированы нарушениями полярного транспорта экзогенных ауксинов (по: Kruglova *et al.*, 2022). Возможно, нарушения функционирования экзогенных гормонов в каллусах *L. angustifolia* обусловлены, с одной стороны, изменениями содержания эндогенных гормонов в каллусах, с другой стороны – взаимным влиянием как экзогенных, так и эндогенных гормонов в ходе длительного культивирования *in vitro*. Отметим, что взаимное синергетическое или антагонистическое влияние (в англоязычной литературе: crosstalk) гормонов хорошо изучено на примере культивируемых каллусов различных растений, например *Fouquieria splendens* (Salinas-Patino *et al.*, 2018), *Brassica juncea* (Lu *et al.*, 2020), *Arabidopsis thaliana* (Cosic, Raspor, 2022).

Можно полагать, что постепенно накапливающиеся нарушения функционирования ауксина НУК и цитокинина БАП во взаимодействии как друг с другом, так и с эндогенными гормонами в каллусах приводят и к массовым аномалиям в строении почек 4 пассажа (рис. 3, в–ж), и структурной дегенерации тканей каллусов 5 пассажа (рис. 4, б, в). В литературе имеются подтверждающие это предположение сведения о негативном влиянии долгосрочного культивирования *in vitro* на развитие и укоренение побегов *Cedrela fissilis*, обусловленном снижением содержания гормонов индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот, а также увеличением содержания гормонов жасмоновой и салициловой кислот к 4 пассажу (de Oliveira *et al.*, 2021).

В целом, в литературе представлено немало данных об аномалиях в формировании органов *de novo*, причиной которых являются нарушения регуляции гормонального контроля (по: Bustillo-Avendano *et al.*, 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые полученные для *L. angustifolia* гистологические данные по длительному (2–5 пассажей) культивированию морфогенетических каллусов важны для понимания клеточных и тканевых механизмов реализации и постепенного снижения морфогенетического и регенерационного потенциала клеток в условиях *in vitro*.

Особый интерес вызывают каллусы 2 пассажа, в которых выявлены два пути морфогенеза *in vitro* – органогенез *de novo* как реализация свойства плuriпотентности клеток каллуса и соматический эмбриогенез *in vitro* как реализация свойства totипотентности клеток сформированных в каллусах органов, при этом стадии формирования и развития соматических зародышей принципиально совпадают с аналогичными стадиями зиготического эмбриогенеза двудольных растений *in planta*. Эти данные подтверждают перспективность использования каллусов в качестве модельных систем для изучения различных аспектов морфогенеза и регенерации растений, в том числе проявления новых свойств клеток в условиях экспериментов *in vitro*.

Сравнительный анализ результатов гистологического исследования каллусов 2–5 пассажей и ранее полученных данных по гистологии каллусов 1 пассажа позволяет дать рекомендации по выбору направленности биотехнологического получения регенерантов *L. angustifolia*, в зависимости от поставленных целей. Как известно, регенерация путем соматического эмбриогенеза *in vitro* с большей вероятностью обеспечивает генетическую стабильность получаемых регенерантов, а биполярная природа зародышей дает возможность избежать отдельного этапа корнеобразования. С этими целями целесообразно использовать каллусы 1–2 пассажа, в которых выявлены соматические зародыши нормального строения. Отметим, что такие зародыши могут быть использованы и при разработке биотехнологий получения синтетических семян этого ценного растения. Для получения же сомаклональных вариантов предпочтительно использовать каллусы 1–3 пассажей, в которых выявлен путь органогенеза *de novo*, как правило, приводящий к генетическим изменениям регенерантов.

Исследования выполнены на базе Центра коллекционного пользования “Агидель” УФИЦ РАН, а также лаборатории биотехнологии НИИ СХ Крыма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом Российской научного фонда № 23-24-00023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в получение экспериментальных данных и участвовали в обсуждении окончательного варианта статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне благодарны к.б.н. Г.Е. Титовой (БИН РАН, г. Санкт-Петербург) за совместное обсуждение представленных микрофотографий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014. 712 с.
- Зинатуллина А.Е. Формирование морфогенетических очагов как основа гемморизогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Экобиотех. 2023. Т. 6. № 2. С. 81–90.
DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-2-81-90.
- Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Автограф”, 2021. 315 с.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Пилищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. Киев: Наукова думка, 1980. 468 с.
- Круглова Н.Н. Продолжительность культивирования *in vitro* зародышевых каллусов пшеницы влияет на проявление их морфогенетического и регенерационного потенциала // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 3. С. 98–108.
DOI: 10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108.
- Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е., Егорова Н.А. Морфогенез *in vitro* в каллусах лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill.: гистологические аспекты // Изв. РАН. Сер. биол. 2024. № 3. В печати.

- Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишинев А. В., Назаренко Л. Г.* Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ “Ариал”, 2018. 320 с.
- Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.
- Al-Tai A.A.R., Mohammed A.A.* Production of Lavender (*Lavandula Angustifolia*) Plants from Somatic Embryos Developed from its Seedlings Leaf Callus // Raf. J. Sci. 2022. V. 31. P. 12–19.
DOI: 10.33899/RJS.2022.176073.
- Babanina S.S., Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Abdurashitov S.F.* Genetic Stability of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Plants Obtained during Long-Term Clonal Micropagation // Russ. Agricult. Sci. 2023. V. 49. P. 132–139.
DOI: 10.3103/S1068367423020027.
- Bekalu Z.E., Panting M., Holme I.B., Brinch-Pedersen H.* Opportunities and Challenges of In Vitro Tissue Culture Systems in the Era of Crop Genome Editing // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Article number: 11920.
DOI: 10.3390/ijms241511920.
- Bidabadi S.S., Jain S.M.* Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration // Plants. 2020. V. 9. Article number: 702.
DOI: 10.3390/plants9060702.
- Bustillo-Avendano E., Ibanez S., Sanz O., Sousa Barros J.A., Gude I., Perianez-Rodriguez J., Micol J.L., Del Pozo J.C., Moreno-Risueno M.A., Perez-Perez J.M.* Regulation of Hormonal Control, Cell Reprogramming, and Patterning during De Novo Root Organogenesis // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 1709–1727.
DOI: 10.1104/pp.17.00980.
- Capron A., Chatfield S., Provart N., Berleth T.* Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell // The Arabidopsis Book. 2009. V. 7. Article number: e0126.
DOI: 10.1199/tab.0126.
- Cosic T., Raspor M.* The Role of Auxin and Cytokinin Signalling Components in *de novo* Shoot Organogenesis // Aftab T. (ed.). Auxins, Cytokinins, and Gibberellins Signalling in Plants. Signalling and Communication in Plants. Springer: Cham, 2022. P. 47–75.
DOI: 10.1007/978-3-031-05427-3_3.
- De Oliveira T.R., Balfagon D., Sousa K.R., Aragao V.P.M., de Oliveira L.F., Floh E.I.S., Silveira V., Gomes-Cadenas A., Catarina C.S.* Long-Term Subculture Affects Rooting Competence via Changes in the Hormones and Protein Profiles in *Cedrela Fissilis* Vell. (Meliaceae) Shoots // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2021. Preprint.
DOI: 10.21203/rs.3.rs-689426/v1.
- Devasigamani L., Devarajan R., Loganathan R., Rafath H., Padman M., Giridhar L., Kuppan N.* *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from in vitro leaf explants-derived callus as conservation strategy // Biotechnol. Veg. 2020. V. 20. P. 75–82.
- Feher A.* Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // Front. Plant Sci. 2019. V. 26. Article number: 536.
DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
- Feher A.* A Common Molecular Signature Indicates the Pre-Meristematic State of Plant Calli // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Article number: 13122.
DOI: 10.3390/ijms241713122.
- Feher A., Bernula D., Gemes K.* The Many Ways of Somatic Embryo Initiation // Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds). Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer: Cham, 2016. P. 23–37.
DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0_3.
- Graner E.M., Calderan-Meneghetti E., Leone G.F., de Almeida C.V., de Almeida M.* Long-term in vitro culture affects phenotypic plasticity of *Neoregelia johannis* plants // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2019. V. 137. P. 511–524.
DOI: 10.1007/s11240-019-01586-7.
- Haensch K.T.* Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis // Plant Cell Rep. 2004. V. 23. P. 211–217.
DOI: 10.1007/s00299-004-0844-5.
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K.* Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // Annu. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 377–406.
DOI: 10.1146/annurev-applant-050718-100434.
- Ikeuchi M., Iwase A., Ito T., Tanaka H., Favero D.S., Kawamura A., Sakamoto S., Wakazaki M., Tameshige T., Fujii H., Hashimoto N., Suzuki T., Hotta K., Toyooka K., Mitsuda N., Sugimoto K.* Wound-inducible *WUSEL-RELATED HOMEOBOX 13* is required for callus growth and organ reconnection // Plant Physiol. 2022. V. 188. P. 425–441.
DOI: 10.1093/plphys/kiab510.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A.* Callusogenesis as an in vitro Morphogenesis Pathway in Cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018. V. 49. P. 245–259.
DOI: 10.1134/S106236041805003X.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E.* Cytophysiological features of the Cereal-based Experimental System “Embryo In Vivo – Callus In Vitro” // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. P. 199–214.
DOI: 10.1134/S1062360421040044.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Zinatullina A.E.* Critical Stages of Cereal Embryogenesis: Theoretical and Practical Significance // Russ. J. Dev. Biol. 2022. V. 53. P. 405–420.
DOI: 10.1134/S1062360422060042.
- Kruglova N., Zinatullina A., Yegorova N.* Histological Approach to the Study of Morphogenesis in Callus Cultures In Vitro: A Review // Int. J. Plant Biol. 2023. V. 14. P. 533–545.
DOI: 10.3390/ijpb14020042.

- Ku S.S., Woo Y.-A., Shin M.J., Jie E.Y., Kim H.R., Kim H.-S., Cho H.S., Jeong W.-J., Lee M.-S., Min S.R., Kim S.W.* Efficient Plant Regeneration System from Leaf Explant Cultures of *Daphne genkwa* via Somatic Embryogenesis // Plants. 2023. V. 12. Article number: 2175. DOI: 10.3390/plants12112175.
- Kulus D., Tymoszuk A.* Advancements in In Vitro Technology: A Comprehensive Exploration of Micro-propagated Plants // Horticulturae. 2024. V. 10. Article number: 88. DOI: 10.3390/horticulturae10010088.
- Lee K., Kim J.H., Park O.S., Jung Y.J., Seo P.* Ectopic expression of *WOX5* promoters cytokinin signaling and de novo shoot regeneration // Plant Cell Rep. 2022. V. 41. P. 2415–2422. DOI: 10.1007/s00299-022-02932-4.
- Liu S., Zhao J., Liu Y., Li N., Wang Z., Wang X., Liu X., Jiang L., Liu B., Fu X., Li X., Li L.* High Chromosomal Stability and Immortalized Totipotency Characterize Long-Term Tissue Cultures of Chinese Ginseng (*Panax ginseng*) // Genes. 2021. V. 12. Article number: 514. DOI: 10.3390/genes12040514.
- Long Y., Yang Y., Pan G., Shen Y.* New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Article number: 926752. DOI: 10.3389/fpls.2022.926752.
- Lu H., Xu P., Hu K., Xiao Q., Wen J., Yi B., Ma C., Tu J., Fu T., Shen J.* Transcriptome profiling reveals cytokinin promoted callus regeneration in *Brassica juncea* // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2020. V. 141. P. 191–206. DOI: 10.1007/s11240-020-01779-5.
- Mamgain J., Mujib A., Ejaz B., Gulzar B., Malik M.Q., Syeed R.* Flow cytometry and start codon targeted (SCoT) genetic fidelity assessment of regenerated plantlets in *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2022. V. 150. P. 129–140. DOI: 10.1007/s11240-022-02254-z.
- Mithila J., Hall J.C., Victor J.M.R., Saxena P.K.* Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 408–414. DOI 10.1007/s00299-002-0544-y.
- Müller-Xing R., Xing Q.* The plant stem-cell niche and pluripotency: 15 years of an epigenetic perspective // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Article number: 1018559. DOI: 10.3389/fpls.2022.1018559.
- Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Pasternak T.P., Steinmacher D.* Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro // Plants. 2024. V. 13. Article number: 327. DOI: 10.3390/plants13020327.
- Peng X., Sun M.X.* The suspensor as a model system to study the mechanism of cell fate specification during early embryogenesis // Plant Reprod. 2018. V. 31. P. 59–65. DOI: 10.1007/s00497-018-0326-5.
- Rezaei H., Mirzaie-Asl A., Abdollahi M.R., Tohidfar M.* Enhancing petunia tissue culture efficiency with machine learning; A pathway to improved callogenesis // PLoS One. 2023. V. 18. Article number: e0293754. DOI: 10.1371/journal.pone.0293754.
- Salehi B., Mnayer D., Özçelik B., Altin G., Kasapoğlu K.N., Daskaya-Dikmen C., Sharifi-Rad M., Selamoglu Z., Acharya K., Sen S., Matthews K.R., Fokou P.V.T., Sharopov F., Setzer W.N., Martorell M., Sharifi-Rad J.* Plants of the Genus Lavandula: From Farm to Pharmacy // Nat. Prod. Comm. 2018. V. 13. P. 1385–1402. DOI: 10.1177/1934578X1801301037.
- Salinas-Patino V.A., Espinoza-Mellado M.R., Hernandez-Pimentel M.V., García-Pineda M., Montes-Villafan S., Rodríguez-Dorantes A.* Phytohormones Action on *Fouquieria splendens* Callogenesis and Organogenesis Processes // Int. J. Agricult. Innov. Res. 2018. V. 7. P. 2319–1473.
- Shin J., Bae S., Seo P.J.* De novo shoot organogenesis during plant regeneration // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. P. 63–72. DOI: 10.1093/jxb/erz395.
- Su Y.H., Tang L.P., Zhao X.Y., Zhang X.S.* Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming // J. Integr. Plant Biol. 2021. V. 63. P. 228–243. DOI: 10.1111/jipb.12972.
- Syeed R., Mujib A., Malik M.Q., Gulzar B., Zafar N., Mamgain J., Ejaz B.* Direct somatic embryogenesis and flow cytometric assessment of ploidy stability in regenerants of *Caladium × hortulanum* ‘Fancy’ // J. Appl. Genetics. 2022. V. 63. P. 199–211. DOI: 10.1007/s13353-021-00663-y.
- Wan Q., Zhai N., Xie D., Liu W., Xu L.* *WOX11*: The founder of plant organ regeneration // Cell Regen. 2023. V. 12. Article number: 1. DOI: 10.1186/s13619-022-00140-9.
- Yegorova N.A., Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Paliya A.E., Stavtseva I.V.* Morphogenetic, Physiological, and Biochemical Features of *Lavandula angustifolia* at Long-Term Micropropagation In Vitro // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 326–334. DOI: 10.1134/S1021443719010060.
- Zhai N., Xu L.* Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration // Nat. Plants. 2021. V. 7. P. 1453–1460. DOI: 10.1038/s41477-021-01015-8.

Histological aspects of long-term culture *in vitro* of *Lavandula angustifolia* Mill. morphogenic calluses

N. N. Kruglova^{1, 2, @}, A. E. Zinatullina^{1, 2}, O. A. Seldimirova², N. A. Yegorova¹

¹Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya str., 150, Simferopol, 295043 Russia

²Ufa Institute of biology – subdivision of the UFRC RAS, pr. Oktyabrya, 69, Ufa, 450054 Russia

[@]e-mail: kruglova@anrb.ru

Histological events occurring in morphogenic calluses of *Lavandula angustifolia* Mill. are described for the first time during long-term (2–5 passages) *in vitro* culture. In the calluses of passage 2, buds and leaves of normal structure (the *de novo* organogenesis pathway), as well as somatic embryos of normal structure originating from the bud epidermis cells (the somatic embryogenesis *in vitro* pathway) were revealed. As the calluses were cultivated further, its normal morphogenetic potential was gradually lost. If only the buds were characterized by the normal structure in the calluses of passage 3, and the leaves had an abnormal structure, then the buds of mainly abnormal structure were noted in the calluses of passage 4, and only structurally degenerated tissues were noted in the calluses of passage 5. The question about reducing the properties of pluri- and totipotency of callus cells as they were cultured *in vitro* discussed. The histological data obtained can be used in choosing the duration of callus culture *in vitro* to obtain full-fledged regenerants of this valuable essential oil and medicinal plant in various cell biotechnologies.

Keywords: morphogenesis, callus culture *in vitro*, duration of culture *in vitro*, *de novo* organogenesis, somatic embryogenesis *in vitro*, *Lavandula angustifolia* Mill