

ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН У КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

О. В. ДУБРОВНА, С. І. МИХАЛЬСЬКА *orcid* 0000-0002-6644-5921,
А. Г. КОМІСАПЕНКО *orcid* 0000-0003-2081-4055

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська 31/17, Київ, 03022, Україна
e-mail: dubrovny@ukr.net

Резюме. Морфогенез рослин є результатом складних взаємодій генетичних, епігенетичних та гормональних факторів, що визначають розвиток клітин і тканин у культурі *in vitro*. Протягом останніх десятиліть фундаментальні дослідження значно поглибили розуміння генетичних механізмів, які контролюють ключові процеси морфогенезу, такі як калюсогенез, соматичний ембріогенез і органогенез *de novo*. Виявлено, що певні структурні та регуляторні гени відіграють вирішальну роль у перепрограмуванні клітин до тотипотентного стану, де вони здатні формувати різні морфологічні структури. Гормони, такі як ауксини і цитокініни, сприяють індукції цих процесів, змінюючи експресію генів, відповідальних за поділ, диференціацію й інші аспекти морфогенезу. У літературному огляді представлено сучасні уявлення щодо генетичного контролю морфогенезу в культурі рослин *in vitro*. Наведено широкий спектр ключових генів, які детермінують утворення калюсу; беруть участь у соматичному ембріогенезі та посиленні соматичної ембріогенної відповіді; залучених до ектопічного формування соматичних зародків або меристем; контролюють органогенез *de novo* та беруть участь у трансдукції гормонального сигналу. Показано взаємодію різних транскрипційних факторів, які беруть участь в індукції морфогенезу та задіяні в сигнальному шляху гормонів.

Ключові слова: морфогенез, генетичний контроль, калюсогенез, соматичний ембріогенез, органогенез *de novo*.

Вступ. Здатність рослинних клітин до тотипотентності відкрила можливість їх широкого застосування в біотехнологічних дослідженнях. Практично будь-яка жива клітина, яка має ядро, після періоду дедиференціації в умовах *in vitro*, під впливом компонентів живильного середовища може почати нескінченну проліферацію у вигляді калюсних або суспензійних культур, піти шляхом утворення пагонів, коренів або соматичного ембріогенезу. Сьогодні ці унікальні властивості морфогенетичної відповіді активно використовуються у біотехнології рослин. Калюсна маса недиференційованих клітин, отримана з різних органів і культур, широко застосовується у виробництві цінних вторинних метаболітів, а здатність до пагоноутворення використовується в технологіях мікроклонального розмноження для збереження цінних генотипів, унікальних гібридів, рідкісних видів рослин та для оздоровлення посадкового матеріалу.

Морфогенез *in vitro* охоплює низку процесів, зокрема сприйняття фітогормонів, дедиференціацію клітин для набуття здатності до органогенезу, повторне залучення спочиваючих клітин до клітинного циклу, а також координацію поділу клітин для формування примордіїв органів і меристем. Це комплексний процес просторового та часового розвитку тканин, органів і ембріонів, який контролюється гормональними сигналами та регулюється послідовною або синхронною дією генетичних мереж (Gordon-Kamm, 2019). Складність цього явища у рослин зумовлена цілісним характером морфогенетичних подій і їх залежністю від численних взаємодій між внутрішніми та зовнішніми факторами.

Наразі здатність утворювати калюс *in vitro* виявлена у багатьох родинах рослин. Різні дослідження продемонстрували можливість використання вегетативних, генеративних та ембріональних органів як експлантів для отримання калюсних культур. Існує значний обсяг експериментальних даних щодо калюсоутворення *in vitro* та процесів морфогенезу, що забезпечують отримання регенерантів (Kunakh, 2005; Bidabadi, Jain, 2020; Twaij et al., 2020). На сьогодні досягнуто значних успіхів у виявленні молекулярних аспектів цих процесів та участі в них ряду специфічних генних систем (Lee et al., 2022; Shin et al., 2022; Wan et al., 2023).

Здатність клітин до формування калюсу *in vitro* і розвитку з нього повноцінних регенерантів розглядають як один із проявів пластичності розвитку рослин, зумовлений їх нерухомим способом життя (Bidabadi, Jain, 2020). На основі використання калюсних культур *in vitro* розроблено біотехнології масового виробництва регенерантів господарсько та економічно цінних рослин (Twaij et al., 2020).

Калюс — це цілісна система, яка утворюється в результаті проліферації поверхневих або глибинних клітин різних рослинних тканин. Така система спочатку складається з гомогенних клітин, які поступово трансформуються в групи гетерогенних із видоспецифічними морфогенетичними потенціями, які реалізуються різними шляхами морфогенезу. Експериментально встановлено, що успішність калюсоутворення *in vitro* визначається комплексом взаємопов'язаних ендогенних і екзогенних факторів. Сучасні дослідження зосереджені на вивченні генетичних та епігенетичних регуляторних мереж, залучених до формування калюсу *in vitro* (Ibanez et al., 2020). Гістологічно основним ендогенним фактором є наявність морфогенетично компетентних клітин у тканинах експланта. Екзогенні фактори, зокрема гормони в живильному середовищі та стресові умови (наприклад, поранення), індують перепрограмування таких клітин у напрямі калюсоутворення *in vitro*.

Морфогенез тканин і органів у культурі *in vitro* є жорстко контрольованим процесом, який здійснюється за участі генних мереж, що функціонують послідовно або узгоджено (Gordon-Kamm et al., 2019). Фундаментальні дослідження останніх десятиліть розширили розуміння функцій генів, що регулюють морфогенез, а також сигнальних мереж, необхідних для розвитку ембріодів і меристем. Ці дослідження допомагають ідентифікувати нові гени та генні мережі, які беруть участь в ембріогенезі, підтримці меристем і гормональному метаболізмі (Grienenberger, Fletcher, 2015; Ikeuchi et al., 2016; Snipes et al., 2018; Tian et al., 2020).

Отримані результати свідчать, що головну роль у прояві тотипотентності рослинних клітин *in vitro* відіграють гени, відповідальні за розвиток рослин *in vivo*. При цьому їхня активація в культурі *in vitro* може проявлятися непередбачувано. Наприклад, гени *GLAVATA* (*CLV1* та *CLV3*) на рівні рослин не впливають на процеси ембріогенезу, а *in vitro* значно підвищують частоту соматичного ембріогенезу (Mordhorst et al., 1998). У культурі *in vitro* можуть активуватися гени, що зазвичай проявляють специфічну експресію в певних органах або на окремих стадіях розвитку

рослин. Наприклад, гени *LF* та *SN* гороху, які контролюють час цвітіння, також впливають на ріст і пагоноутворення *in vitro*. Ген *LF*, що зазвичай експресується в апікальній меристемі та регулює чутливість до флорального сигналу, в культурі *in vitro* визначає реакцію калюсів на екзогенний ауксин. Водночас ген *SN*, що експресується в листках і забезпечує чутливість до фотоперіоду, впливає на чутливість калюсних клітин до освітлення (Sugiyama, 2000). Ці відмінності у дії генів можуть пояснюватися різним рівнем організації *in vitro*, що включає як клітинний, так і організмний рівень, а також змінами специфічності експресії генів у цих умовах. Активація транскрипції генів зі специфічною експресією *in vitro* може бути викликана екзогенними гормонами, оскільки цис-елементи, чутливі до гормонів, наявні у регуляторних ділянках багатьох генів, залучених у морфогенез.

У даному огляді літератури представлено широкий спектр ключових генів, які детермінують утворення калюсу; беруть участь у соматичному ембріогенезі та посиленні соматичної ембріогенної відповіді; залучених до ектопічного формування соматичних зародків або меристем; контролюють органогенез *de novo* та беруть участь у трансдукції гормонального сигналу.

Гени, які беруть участь у формуванні калюсу. Під час культивування рослинних тканин із експлантів можуть формуватися два основні типи калюсу: ембріогенний і пагоновий / кореневий калюс (Ikeuchi et al., 2013). Калюс починає утворюватися на живильних середовищах за високого співвідношення ауксину до цитокініну. Ембріогенний калюс утворюється з експлантів і здатний до регенерації через органогенез та ембріогенез (Salaün et al., 2021). Під впливом високого співвідношення цитокініну до ауксину калюс може регенерувати пагони (Meng et al., 2017), а в умовах низького рівня ауксину в середовищі — корені (Yu et al., 2017). Таким чином, калюс можна віднести до групи плюрипотентних клітин, здатних до органогенезу *de novo*, які можуть регенерувати як корені, так і пагони.

Поранення тканин, яке часто запускає дедиференціацію, тобто клітинне перепрограмування в культурах тканин рослин, приводить до швидкої експресії гена *CDC2AAT* (*CYCLIN-DEPENDENT KINASES 2*) у арабідопсису (Shaul et al., 1996). Гіпокотилі арабідопсису утворюють калюс на ранових ділянках, і ця клітинна відповідь включає транскрипційну активацію генів, таких як *LOG* (*LONELY GUY*), які кодують ферменти, що беруть участь у біосинтезі цитокініну (Ikeuchi et al., 2017). Це сприяє накопиченню цитокініну і, таким чином, посиленню цитокінінової відповіді,

що приводить до повторного входу в клітинний цикл і утворення калюсу через індукцію експресії генів клітинного циклу, зокрема циклінів *CYCD3*. Поранення також модулює ендогенний гормональний гомеостаз для сприяння регенерації. Часто відбувається перепрограмування клітин та значні зміни в статусі хроматину: не тільки метилювання ДНК, а й також модифікації гістонів, включаючи метилювання або ацетилювання (Lee, Seo, 2018). Загалом, гіпометилювання ДНК або ацетилювання гістонів пов'язані з активацією транскрипції регуляторних генів, які контролюють розвиток або гормональні реакції, відповідальні за тотипотентний стан клітин (Pasternak, Dudits, 2019).

Ауксин активує фактори відповіді на ауксин (ARF), такі як *ARF7* і *ARF19*, які, своєю чергою, стимулюють експресію генів *LBD16* і *LBD29* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN*), що відповідають за розвиток латеральних органів (Okushima et al., 2007). Надекспресія генів *LBD16*, *LBD17*, *LBD18* або *LBD29* сприяє формуванню калюсу (Fan et al., 2012). Було встановлено, що *LBD18* та його близький гомолог *LBD33* активують експресію *E2Fa*, основного регулятора клітинного циклу (Verckmans et al., 2011). Це свідчить про те, що один із транскрипційних модулів, який лежить в основі утворення калюсу під впливом ауксину, включає шлях *ARF-LBD-E2Fa*.

Субклад транскрипційних факторів *APETALA2*, що належить до сімейства факторів відповіді на етилен (*AP2/ERF*), під назвою *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1-4* (*WIND1-WIND4*), швидко активується після поранення та відіграє важливу роль у процесах дедиференціації та формуванні калюсів. Рослини з надекспресією будь-якого з генів *WIND1-WIND4* здатні утворювати калюс, який може регенерувати як пагони, так і корені, а також ініціювати соматичний ембріогенез. Надмірна та ектопічна експресія *WIND1* сприяє формуванню калюсів навіть на безгормональних середовищах.

Ген *WOX11* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN BOX 11*) разом з ауксином активує експресію генів *LBD16* і *WOX5/7* на етапі поділу клітин-засновників калюсу, що веде до утворення зачатка калюсу (Liu et al., 2018). Ауксин також сприяє експресії *WOX11* під час переходу клітин від здатних до регенерації до клітин-засновників калюсу (Hu et al., 2017). Крім *LBD16* і *WOX5/7*, багато генів, пов'язаних зі стовбуровими клітинами, активують процес індукції під час формування примордію калюсу, зокрема *PLT1/2* (*PLETHORA 1 і 2*) та *SCR* (*SCARECROW*) (Gordon et al., 2007). Ген *PLT3/5/7* експресуються на всіх етапах утворення калюсу (Kareem et al., 2015).

Втрата або пригнічення вищезгаданих ключових генів може призвести до втрати плюрипотентності в калюсі, що, у свою чергу, спричинить дефекти в регенерації пагонів та / або коренів (Hu et al., 2017). Після ініціації примордію калюс продовжує поділ клітин і часткову диференціацію, формуючи тканини, необхідні для утворення зрілого калюсу. Крім того, формування калюсу, набуття ним плюрипотентності та подальша регенерація пагонів вимагають участі епігенетичної мережі, яка регулює експресію цих ключових генів (Ishihara et al., 2019; Wu et al., 2022).

Гени, які беруть участь у соматичному ембріогенезі. Соматичний ембріогенез (СЕ) ґрунтується на тотипотентності рослинних клітин, тобто на їх здатності до дедиференціації та диференціації у новому типі клітин (Choi et al., 2009). СЕ поділяється на індуктивну фазу та фазу розвитку, де відбуваються зміни в статусі диференціації та надбання ембріогенної компетентності (Magnani et al., 2017). Прямий СЕ відбувається у тому випадку, коли соматичні ембріоїди (біполярні структури, які не мають судинного зв'язку з експлантами) індукуються безпосередньо з культивованих рослинних тканин *in vitro* (наприклад незрілих зародків) на середовищі з низьким вмістом ауксину. Непрямий СЕ може індукуватися шляхом культивування ембріогенних тканин, таких як калюс, на багатому ауксином середовищі, а його перенесення на середовище з низьким вмістом ауксину сприяє утворенню соматичних ембріоїдів (Tian et al., 2020).

Сиванесан та ін. (Sivanesan et al., 2022), вважають соматичний ембріогенез способом стимульованої тотипотентності рослинної клітини. Автори приділили велику увагу СЕ *in vitro* як способу регенерації рослин у калюсах та представили огляд робіт, присвячених впливу основних факторів (природа експланта, стресові чинники, концентрація та варіація регуляторів росту рослин) на індукцію та регуляцію СЕ, включаючи непрямий соматичний ембріогенез у калюсних культурах *in vitro*. Ряд оглядів (Méndez-Hernández et al., 2019; Wójcik et al., 2020) відображують великий інтерес дослідників до вивчення впливу генетичних (мікроРНК, фактори транскрипції) та епігенетичних (метилювання ДНК, ремоделювання хроматину) факторів на регуляцію подій соматичного ембріогенезу *in vitro*. У цих роботах проаналізовано молекулярні механізми, що лежать в основі контролю обох морфогенетичних шляхів, органогенезу *de novo* та соматичного ембріогенезу *in vitro*, підтверджені результатами, що включають профілі на основі протеомів, метаболомів і транскриптомів.

Показано, що вирощування рослинних тканин *in vitro* на середовищах з високими концентраціями ауксину викликає загальне перепрограмування транскриптомів соматичних клітин і модулює експресію багатьох СЕ-асоційованих факторів транскрипції (ТФ) (Wójcik et al., 2020). Крім того, при культивуванні протопластів у середовищі, що містить високі концентрації 2,4-Д, розмір їхніх ядер значно збільшується, що свідчить про реорганізацію хроматину. Рівень метилювання ДНК у калюсі також зменшується під час ембріогенезу (Pasternak, Dudits, 2019). Використання інгібіторів деацетилювання або деметилювання показує, що профіль хроматину є визначальним фактором для індукції СЕ і безпосередньо бере участь у перепрограмуванні клітин та формуванні калюсу під час СЕ (Li et al., 2019).

Гормональний стрес приводить до активації ТФ таких як гени WUS (WUSCHEL), LEC (LEAFY COTYLEDON) або BBM (BABY BOOM), які є специфічними для ембріогенних програм (Pasternak, Dudits, 2019). Ці результати показують, що гормони, особливо ауксин, викликають загальне перепрограмування генної експресії через модифікацію хроматину та активацію специфічних факторів транскрипції. Крім того, деякі мікроРНК є вирішальними для процесів індукції СЕ, включаючи міРНК, пов'язані з ауксином, які спрямовані на гени сприйняття, біосинтезу та сигналізації ауксину, наприклад: miR165/166, miR167, miR164, miR390 та miR393 (Wójcikowska et al., 2020). Мутант по гену DCL1 (DICER-LIKE1), який залучений до утворення міРНК, не здатний індукувати соматичний ембріогенез (Wójcik, Gaj, 2016).

Індукція СЕ зазвичай передбачає використання регуляторів росту рослин (PPR), часто зі стресовою обробкою. Обробка PPR/стрес може призвести до повторної диференціації клітин, які є компетентними до СЕ, через де- або транс-диференціацію та встановлення ембріопроему шляхом ембріоіндукції. Найчастіше СЕ індукуються ауксином, як правило, синтетичним ауксином 2,4-Д, іноді в поєднанні з цитокиніном (Wójcik et al., 2020).

Встановлено, що фактори відповіді на ауксин (ARF) супроводжують індукцію СЕ, при цьому показано, що ген *ARF5*, який кодує білок MONOPTEROS (MP), може відігравати фундаментальну роль у регулюванні різних аспектів СЕ, контрольованих ауксином. Виявлено, що *ARF5* характеризується найбільшою активністю під час індукції СЕ, тоді як мутант *ARF5* має значно знижену здатність до ембріогенної відповіді (Wójcikowska et al., 2017). *ARF5* може

сприяти ембріогенному розвитку *in vitro*, контролюючи інші гени ТФ, які мають підтверджену активність у соматичному ембріогенезі, включаючи *HOMEOBOX GENE8 (ATHB8)* і *TARGET OF MONOPTEROS3 (TMO3)*, *TMO5*, *TMO6* і *TMO7* (Gliwicka et al., 2013). Ген *ARF10*, який має позитивний регуляторний вплив на регенерацію пагонів *de novo* через активацію генів, специфічних для меристеми пагонів, був високо експресований за СЕ у арабідопсису (Wójcikowska et al., 2017). *ARF10* разом з *ARF16* і miR160 сприяє *LEC2*-контрольованому біосинтезу ауксину в ембріогенній тканині (Wójcik et al., 2017). Значне накопичення транскриптів *ARF10* і *ARF16* супроводжувалося підвищеною експресією генів *PLETHORA (PLT1 і PLT2)* в ембріогенній культурі арабідопсису (Wójcikowska et al., 2017).

Гени *TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1)* і *AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)* є ключовими для контролю індукції соматичного ембріогенезу через механізм, опосередкований мікроРНК *miR393* (Wójcik, Gaj, 2016). Під час СЕ у бавовни було виявлено зниження регуляції *TIR1* та *AFB2*, хоча точний регуляторний шлях їх експресії поки не визначений (Cao et al., 2017). Мутації в генах *IAA16*, *IAA29*, *IAA30* та *IAA31*, які порушують ембріогенну відповідь експлантів арабідопсису, підтверджують їхню участь в індукції СЕ (Gliwicka et al., 2013).

Транскрипційний фактор *AHL15*, який бере участь у процесі соматичного ембріогенезу, є важливим для відкриття хроматину і здатен за умов надекспресії індукувати СЕ навіть без наявності ауксину (Karami et al., 2021). Під час гормонально обумовленої індукції СЕ *AHL15* і його гомологи активуються та відіграють важливу роль у цьому процесі, зокрема через надекспресію гена *BBM*. Крім того, *AHL15* впливає на рівень гетерохроматину в соматичних клітинах: у мутантів з втратою функції цього гена в культурі *in vitro* спостерігається підвищений рівень гетерохроматину, що зменшує здатність клітин утворювати соматичні ембріоїди на середовищах з 2,4-Д.

На початкових стадіях соматичного ембріогенезу спостерігається індукція експресії багатьох генів, пов'язаних зі стресом, зокрема тих, що кодують транскрипційні фактори з родин AP2 / ERF, MYB, AUX / IAA та B3 (Nowak, Gaj, 2016). Було ідентифіковано низку ТФ, які модулюються під час СЕ, контролюють метаболізм ауксину та передачу сигналів; водночас регулятори сигнальних шляхів ауксину впливають на СЕ-залучені ТФ. Зокрема, *LEC1*, *LEC2*, *BBM*, *AGL15* та *WUS* утворюють центральну частину складної регуляторної мережі, яка спрямовує соматичні клітини

рослин до ембріогенного розвитку у відповідь на дію ауксину (Salaün et al., 2021).

Ген *BBM* (*BABY BOOM*), також відомий як *PLETHORA 4* (*PLT4*), є транскрипційним фактором із родини AP2/ERF, який містить ДНК-зв'язуючий домен із 70 амінокислотних залишків, вперше охарактеризованих у APETALA2 (*AP2*) та чутливих до етилену. *BBM* має два домени AP2/ERF і належить до підродини AIL (*AINTEGUMENTA-LIKE*), що складається з восьми генів, кожен з яких виконує специфічні функції у поділі меристематичних і ембріональних клітин і бере участь в індукції та регуляції СЕ, коли його експресія підвищується (Wójcik et al., 2020). *BBM* / *PLT4* відіграє ключову роль у регуляції СЕ, хоча інші *PLT*-гени, такі як *PLT1*, *PLT2*, *PLT3*, *EMK* / *PLT5* і *PLT7*, також сприяють ембріогенній індукції за умов надекспресії (Tsuwamoto et al., 2010). *BBM* здатен стимулювати проліферацію клітин і морфогенез під час СЕ, контролюючи ідентичність і тотипотентність ембрію рослин. Він активує мережу генів *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* для запуску соматичного ембріогенезу, безпосередньо зв'язуючи промоторні області генів *LAFL* через свій зв'язувальний мотив ANT / AIL та взаємодіючи з *AGL15* через інші мотиви або білкові посередники (Horstman et al., 2017b).

До генів, які є ключовими для розвитку ембрію і зазвичай беруть участь у програмах соматичного ембріогенезу, в ініціації та підтримці ембріогенної долі рослинних клітин, а також дозріванні ембрію відносяться гени *LAFL* такі як *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON 1*), *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 2*), *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*) і *FUS3* (*FUSCA 3*) (Salaün et al., 2021). Ці гени *LAFL* є факторами транскрипції, що утворюють групу *AFL*. Вони належать до рослиноспецифічного сімейства ТФ В3, що характеризується висококонсервативним зв'язуванням ДНК (Carbonero et al., 2017). В3-вмісні фактори можуть розпізнавати специфічну ДНК-мішень із 5'-GATC-3'-послідовністю і зберігаються в промоторах генів (Baud et al., 2016). Експресія генів *LAFL* регулюється ТФ, такими як *BBM*, гормональною передачею сигналів (АБК, ГК, ІОК) (Ledwoń et al., 2011) і модифікацією хроматину (Horstman et al., 2017a). Гени *LAFL* посилюються після індукції *BBM* і разом з *AGL15*. Слід зазначити, що ген *ABI3* не бере участі у СЕ, як інші гени *LAFL*, а залучений в інші процеси, зокрема розподіл та / або гомеостаз ауксину, трансдукції сигналу АБК.

Першим з цих генів, охарактеризованим у арабідопсису, був *LEC1*, який є піонерським транскрипційним фактором, здатним ініціювати модифікації хроматину в різних цільових ге-

нах. Надмірна експресія *LEC1* приводить до спонтанного утворення соматичних ембріюідів на проростках, а мутації з втратою його функції призводять до втрати здатності до СЕ (Maugan, Drouin, 2018; Tao et al., 2019). З-поміж 44 транскрипційних факторів родин *ANAC*, *bZIP* і *WRKY*, пов'язаних з клітинним репрограмуванням (Graf et al., 2011), половина має регуляторні області, які взаємодіють з *LEC1*, що вказує на можливість впливу *LEC1*, подібно до *AGL15*, на дуже ранніх стадіях СЕ (Pelletier et al., 2017).

Існують докази, що *LEC2* діє на більш ранніх етапах порівняно з генами *LEC1* і *FUS3* та активує їх (Santos Mendoza et al., 2005). У випадку надекспресії *LEC2* пенетрантність фенотипу соматичних ембріюідів може бути вищою. Цікаво, що нещодавні дослідження показали, що *LEC2* безпосередньо підсилює експресію генів *WOX2* і *WOX3* під час СЕ, хоча продукти цих генів є необхідними, але самостійно не забезпечують повноцінного соматичного ембріогенезу (Wang et al., 2020).

Надекспресія генів *LEC1* і *LEC2* у проростках арабідопсису привела до формування соматичних ембріюідів, тоді як прості та множинні мутації *LEC1*, *LEC2* і *FUS3* значно пригнічували ембріогенну відповідь експлантів, культивованих *in vitro* (Horstman et al., 2017b). Ектопічна експресія цих генів в арабідопсису та інших видів може індукувати спонтанне утворення соматичних ембріюідів без додавання гормонів у культуральне середовище (Guo et al., 2013; Liu, et al., 2018). Важливо відзначити, що *LEC1* і *LEC2* мають спільну функцію стимуляції СЕ в рослинах, а надекспресія цих ТФ була запропонована як ефективний метод для покращення ембріогенної відповіді у кількох видах культур, включаючи маїок, ріпак, тютюн і какао (Belide et al., 2013; Guo et al., 2013; Fister et al., 2018; Brand et al., 2019). Встановлено, що експресія *GhLEC1*, *GhLEC2* і *GhFUS3* значно вища у генотипів бавовнику (*Gossypium hirsutum*), які утворюють калюс, ніж у тих генотипів, які не здатні до його утворення (Zheng et al., 2014).

Деякі цільових генів білків LEC можуть брати безпосередню участь у регуляції соматичного ембріогенезу (Winkelmann, 2016), наприклад *AGL15*, який бере участь у гормональній сигналізації та контролює ембріогенну індукцію; *IAA30*, головна дійова особа передачі сигналів ауксину (Wang et al., 2015) або ТФ *LOB40*, який імовірно бере участь у формуванні меж органів і передачі сигналів гіберелінів (Wickramasuriya, Dunwell, 2015). Дослідження показали, що *LEC1*, *LEC2* і *FUS3* безпосередньо індукують експресію

генів *YUCCA*, які кодують ферменти, що беруть участь у біосинтезі ауксину.

AGL15 (AGAMOUS-LIKE 15) є ТФ, що належить до сімейства білків домену MADS. Дослідження транскриптомів надекспресії *AGL15* показало, що він може підвищувати ембріогенну компетентність експлантів шляхом сприяння дедиференціації тканин (Perry et al., 2016). Цей ТФ регулює експресію численних генів, пов'язаних з гормонами, включаючи гіберелінову кислоту та метаболізм етилену, а також передачу сигналів ауксину через ген *GA2ox6* (кодує фермент, що інактивує біоактивний гіберелін) (Zheng et al., 2009) і активацію *IAA30* (Zheng et al., 2016), бере участь у гормональній сигналізації та контролює індукцію ембріодів. *AGL15* спроможний підтримувати здатність до СЕ протягом багатьох років (понад 24), що свідчить про його роль у збереженні ембріогенної здатності (Harding et al., 2003). При цьому ефективність СЕ може знизитися з часом через надекспресію цього гена. Його мутації негативно впливають на ефективність індукції СЕ (Jo et al., 2019). Експресія *AGL15* регулюється взаємодіями зворотного зв'язку з іншими ТФ, які включають його пряму регуляцію ТФ *LEC2* і *FUS3* (Sugimoto et al., 2019). Було показано, що *AGL15* негативно регулює компоненти сигналізації ауксину, включаючи пряме пригнічення *ARF6* і убіквітинлігази *TIR1*, непряме пригнічення *ARF8* і пряме посилення *IAA30* (Zheng et al., 2016).

Ген *WUS (WUSCHEL)* належить до суперродини *WOX* генів, що кодують специфічні для рослин гомеобоксні транскрипційні фактори, які відіграють ключову роль у стимулюванні поділу клітин і запобіганні передчасній диференціації стовбурових клітин (Dolzbłasz et al., 2016). Він також виконує важливу роль у СЕ, сприяючи вегетативному переходу до ембріоду та підтримці ідентичності ембріогенної клітини (Zuo et al., 2002). Встановлено, що ген *WUS* бере участь у регуляції ембріогенних клітин (тотипотентність) і меристематичних клітин (плюрипотентність) (Jha et al., 2020). Було показано позитивний вплив *WUS* на ембріогенний потенціал тканини, враховуючи, що надекспресія гена і посилення функціональних мутацій може збільшити утворення соматичних ембріодів або індукувати їх утворення з вегетативних тканин без додавання гормонів у *Arabidopsis thaliana* (Zuo et al., 2002). У багатьох інших видів, наприклад *Gossypium hirsutum* (Bouchabké-Coussa et al., 2013) або *Coffea canephora* (Arroyo-Herrera et al., 2008) надекспресія *WUS* також здатна значно підвищувати здатність рослини утворювати соматичні зародки.

Під час соматичного ембріогенезу *WUS* індукує транскрипцію генів *LEC1*, *LEC2* та *AGL15* (Jha et al., 2020). У механізмі *WUS*-опосередкованого контролю стовбурових клітин він діє як реостат ауксину, який контролює цільові локуси, включаючи численні гени сигнального шляху ауксину, регулюючи ацетилювання гістонів (Ma et al., 2019). Показано, що інсерція чужорідної ДНК активує *WUS*, що починає експресуватися на ембріональній стадії й важливий для виникнення групи стовбурових клітин уже на стадії 16-клітинного ембріону. На постембріональній стадії ген *WUS* відповідає за формування й нормальну активність апікальної та флоральної меристем.

Гени *WOX (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN)* мають схожі послідовності з генами *WUS* і певний бокс *WUS*, розташований нижче гомеодомену (Haescker et al., 2004). Гени *WOX* беруть участь у формуванні раннього ембріонального патерну, а також у різних сигнальних шляхах регулювання кількох аспектів росту рослин та індукції соматичного ембріогенезу (Jha et al., 2020). Як приклад, у люцерни (*Medicago truncatula*) було показано, що надекспресія *MtWOX9-1* покращує ефективність СЕ, пов'язану зі збільшенням рівня накопичення *AGL15* та *AGL8* (Salaün et al., 2021), а експресія гена *WOX5* значно посилюється через два дні після індукції СЕ і може служити маркером дедиференціації (Orłowska, Kerpczyńska, 2018).

Експресія генів *WOX2*, *WOX8* і *WOX9* була виявлена в ембріогенних культурах кількох рослин, таких як виноград, ялина, арабідопсис, бавовник, конюшина, модрина та лонган (Gambino et al., 2010; Palovaara et al., 2010; Wickramasuriya, Dunwell, 2015; Rupps et al., 2016; Cao et al., 2017; Chen et al., 2020). Показано, що гени *WOX*, зокрема *WOX2* та його паралоги *WOX1*, *WOX3* і *WOX5* позитивно регулюють транскрипційні фактори *PHB/PHV*, які в свою чергу активують гени *LEC*, важливі для соматичного ембріогенезу (Zhang et al., 2017). Подібно до зиготичного ембріогенезу, можна очікувати, що існує регуляторна взаємодія між *WOX* і *PHB/PHV* під час формування соматичних ембріодів, оскільки експресія як *WOX5*, так і *PHB/PHV* була продемонстрована в ембріогенних калюсних клітинах арабідопсису (Magnani et al., 2017).

На основі спостережених реакцій росту, гени, які стимулюють утворення ембріодів або меристем за умов надекспресії, були поділені на дві категорії: 1) гени, що посилюють вже існуючу ембріогенну відповідь, і 2) гени, які можуть спричинити утворення ектопічних соматичних зародків або меристем в умовах, де така реак-

ція зазвичай не спостерігається (Gordon-Kamm et al., 2019).

Посилення соматичної ембріогенної відповіді. У цій категорії надекспресія рослинного гена приводить до посиленого утворення соматичних ембріоїдів під час культивування *in vitro*, де вже відбувається соматичний ембріогенез. Порівняння спектрів кДНК з ембріогенних і неембріогенних суспензій моркви дозволило ідентифікувати ген *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), який починає експресуватися в клітинах суспензії, що пройшли шлях соматичного ембріогенезу, і припиняє експресію на глобулярній стадії. Ген *SERK* кодує рецепторну протеїнкіназу з позаклітинним LRR-доменом, багатим лейцином (Schmidt et al., 1997). За гомологією із цим геном клонований ген *AtSERK1* з *Arabidopsis thaliana*. Коли ген *SERK1* був надекспресований у арабідопсису, не спостерігалось жодних змін у фенотипі рослин, але утворення ембріогеного калюсу збільшилось у 3-4 рази порівняно з диким типом (Hecht et al., 2001). Подібним чином, надекспресія гена *SERK1 Coffea canephora* збільшила частоту утворення соматичних зародків у 2 рази, тоді як глушіння гена різко знизило реакцію соматичного ембріогенезу (Pérez-Pascual et al., 2018). Цікаво, що *SERK1* і *SERK3* разом із білком BRI1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*) є корецепторами класу регуляторів росту рослин брасиностероїдів (Santiago et al., 2013).

Надекспресія гена *AGL15* посилює утворення вторинних соматичних ембріоїдів у арабідопсису (Harding et al., 2003), збільшує їх кількість у культурах сої (Thakare et al., 2008), і посилює утворення ембріогеного калюсу у бавовни (Yang et al., 2014). У арабідопсису ектопічна експресія гена *AGL15* не тільки підвищує ефективність індукції СЕ, а також приводить до утворення соматичних ембріоїдів без додавання гормонів (Tian et al., 2020). Подібність між надекспресією *SERK1* і *AGL15* не є неочікуваною, оскільки *AGL15* є частиною білкового комплексу *SERK1* (Karlova et al., 2006).

Також повідомлялося про посилення ембріогенних реакцій з використанням генів, більш типово пов'язаних з утворенням меристеми, зокрема гена *WUS* (Laux et al., 1996), або *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) (Long et al., 1996). Трансгенні рослини, що несуть копію гена *WUS*, виявилися здатними до високої частоти соматичного ембріогенезу. Надекспресія *WUS* і посилення функціональних мутацій може збільшити започаткування соматичних ембріоїдів або індукувати їх утворення з вегетативних тканин без додавання екзогенних гормонів у арабідопсису

(Zuo et al., 2002). У багатьох інших видів, наприклад *Gossypium hirsutum* (Bouchabké-Coussa et al., 2013) або *Coffea canephora* (Arroyo-Herrera, 2008) надекспресія *WUS* також здатна значно підвищити частоту утворення соматичних зародків. Наприклад, у трансгенної *Coffea canephora* листові диски, поміщені на естрадіол, збільшували утворення соматичних ембріоїдів від контрольного рівня — 1 ембріоїд на сегмент листка (без обробки) до рівня 3–5 соматичних ембріоїдів на трансгенний сегмент листка (Arroyo-Herrera et al., 2008). Так само в експериментах з бавовником, вектор pBI121 з геном *WUS* арабідопсису вводили в сегменти гіпокотилу і спостерігали триразове збільшення утворення соматичних ембріоїдів (Bouchabké-Coussa et al., 2013). Крім того, соматичні зародки, отримані в результаті надекспресії гена *WUS*, утворювали листкоподібні структури, але не змогли регенерувати в рослини, ймовірно, через шкідливий вплив ектопічної надекспресії *WUS* на подальшу регенерацію. У *Gossypium hirsutum* ектопічна експресія *AtWUS*, підвищує ефективність калюсної диференціації неподатливих генотипів (Zheng et al., 2014).

Конститутивна надекспресія гомологів *STM* у *Brassica napus*, *B. oleracea* або *B. rapa* у сім'ядолях арабідопсису, розміщених на середовищі з ауксином, привела до приблизно дворазового збільшення формування соматичних ембріоїдів порівняно з контролем дикого типу (Elhiti et al., 2010). У трансгенних рослин *B. napus*, що містять конструкцію 35S:VnSTM, подібне дворазове збільшення соматичних зародків спостерігалось за ембріогенезу з мікроспор (Elhiti et al., 2010).

Істотне збільшення здатності до соматичного ембріогенезу виявлено в мутантів арабідопсису за генами *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV3*) (Mordhorst et al., 1998). Ген *CLV1* кодує рецепторну протеїнкіназу (ПК) із трансмембранним і позаклітинним лейцин-збагаченим LRR-доменом. Активація ПК-домену спостерігається після приєднання до LRR-домену невеликого білка, який кодується геном *CLV3*. Встановлено, що ген *CLV1* пригнічує проліферативну активність меристем, здійснюючи непряму негативну регуляцію експресії гомеобоксного гена *WUS*, який у свою чергу активує транскрипцію гена *CLV3* (Schoof et al., 2000). Очевидно, підвищення здатності до ембріогенезу в мутантів *CLV1* й *CLV3* пояснюється збільшенням популяції меристематичних клітин *in vitro*, зв'язаним зі зняттям негативної регуляції проліферації меристем продуктами цих генів (Mordhorst et al., 1998).

Ектопічне формування соматичних ембріонів або меристем. Надмірна експресія рослинного гена може викликати ектопічне ут-

ворення або спонтанне формування структур, схожих на ембріоїди або меристеми, навіть без наявності індуктивних факторів. Ектопічна експресія гена *BVM* у *Arabidopsis thaliana* та *Brassica napus* приводить до спонтанного утворення соматичних ембріонів та сім'ядолеподібних структур (Boutillier et al., 2002). Однак, інші фенотипи також індукуються ектопією експресії *BVM* у цих видів, наприклад проліферація калюсу, утворення пагонів, зміни морфології листя та краща регенерація експлантів під час культивування *in vitro* без додавання гормонів у середовище.

Срінівасан та ін. (Srinivasan et al., 2007) досліджували здатність різних ортологів гена *BVM* індукувати ембріогенні відповіді. Вони не спостерігали спонтанного соматичного ембріогенезу у тютюну. Однак при використанні індукваного стероїдами посттрансляційно контрольованого злитого білка *AtBVM* (*AtBVM-GR*) для створення стабільних трансгенних ліній та оцінки потомства, спонтанне ектопічне утворення пагонів і коренів стало можливим після додавання індукуючого ліганду дексаметазону (DEX). Крім того, коли гіпокотили піддавалися впливу DEX, індукувались соматичні ембріоїди за умови, що середовище для росту містило або зеатин, або бензиламінопурин. Автори також зазначили, що експресія *BVM* з арабідопсису або ріпаку в тютюні може приводити до розвитку реакцій, що відрізняються від тих, які спостерігаються при використанні ендогенного гена *BVM* тютюну.

На іншому прикладі, за експресії ортолога гена *BVM* сої, який був трансформований у арабідопсис (El Ouakfaoui et al., 2010), спостерігалось, що ектопічні соматичні ембріоїди ростуть із сім'ядолей, апікальної меристеми пагона та гіпокотилів стабільно трансформованих рослин. Використовуючи геномний клон *Theobroma cacao BVM* (*TcBVM*) Флорез та ін. (Florez et al., 2015) продемонстрували, що він стимулював утворення соматичних ембріодів із сім'ядолей *Theobroma*, культивованих на безгормональних середовищах. Хоча соматичні ембріоїди були сформовані в какао за допомогою *TcBVM*, його конститутивна експресія перешкоджала нормальній регенерації рослин. Коли ортолог *BVM* з олійної пальми (*Elaeis guineensis*) трансформували в арабідопсис було помічено, що сегменти сім'ядолі, листя або кореня зі стабільних трансгенних подій показували підвищені показники формування пагонів порівняно з контролем дикого типу (Morcillo et al., 2007). Однак у всіх цих роботах не було представлено жодних даних щодо відновлення зрілих фертильних рослин. Цувамото та ін. (Tsuwamoto et al., 2010) з використанням гена арабідопсису *AtEMK* (*EMBRYOMAKER*), пов'язаного з *BVM*

(обидва входять до суперродини ТФ AP2/ERF), отримали трансгенні проростки, які можна було оцінити фенотипово. У цих експериментах ектопічна надекспресія *AtEMK* сприяла у 23 % проростків утворенню світло-зелених ембріоноподібних структур на кінчику сім'ядолей.

Ще один ген, який експресується під час раннього розвитку ембріоїда у арабідопсису, — це *RKD4* (також називається *GROUNDED*), член сімейства факторів транскрипції RWP-RK, необхідний для першого асиметричного поділу зиготи для формування двох клітин, які дадуть початок ембріоїду та суспензору (Waki et al., 2011). Мурсьянті та ін. (Mursyanti et al., 2015) продемонстрували на орхідеї, що хімічна індукція трансгенного *RKD4* у листі привела до ектопічного соматичного ембріогенезу у видів, які зазвичай не продукують прямі соматичні ембріоїди.

Лотан та ін. (Lotan et al., 1998) вперше отримали трансгенні рослини арабідопсису з надекспресією гена *LEC1* методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Насіння потомства було пророщене, і у багатьох проростків спостерігалися ембріоноподібні структури. Однак, функціональних ектопічних соматичних ембріодів не було виявлено. У подібному дослідженні паралог *LEC1 Citrus sinensis* під назвою *L1L* (*LEC1-Like*) був конститутивно надекспресований у епікотилів апельсина і мандарина (Zhu et al., 2014). У цих експериментах автори помітили, що зазвичай непокірні епікотили через місяць утворили деякі ембріоноподібні структури, а ще через два місяці на середовищі культивування утворилися пагони з аберантними листками. Це свідчить про те, що у *Citrus* надекспресія *L1L* є достатньою для отримання функціональних соматичних ембріодів. Удденберг та ін. (Uddenberg et al., 2016) помітили, що надекспресія *PaHAP3A* (ген *LEC1/L1L* з ялини звичайної) не призвела до ектопічного утворення соматичних ембріодів у вегетативних тканинах. Однак, коли експресію індукували під час дозрівання зиготичного ембріона, на його поверхні утворювалися соматичні зародки.

Газаріні та ін. (Gazzarrini et al., 2004) використовували епідермальний специфічний промотор *Meristem Layer1* (*ML1*) з арабідопсису для стимулювання експресії його гена *FUSCA* (*AtFUS3*). Відповідно до результатів, ектопічна надекспресія *AtFUS3* привела до утворення сім'ядольних листків, які накопичували запасні білкові тіла. В експериментах, подібних до описаних вище, були отримані стабільні трансгенні лінії арабідопсису шляхом введення вектора *pOCA28* з геном *LEC2* в його мутантні лінії *lec2-1* і *lec2-5* і як наслідок, сформувалися ектопічні

соматичні ембріоїди, здатні проростати та утворювати рослини (Stone et al., 2001). Однак, у результаті рослини мали аномальні фенотипи, і автори не коментували фертильність.

На додаток до ключових факторів *LAF1*, описаних вище, багато інших генів виявилися достатніми для надання ідентичності ембріоїда за ектопічної експресії, але не були необхідними для нормального зиготичного розвитку ембріона. Вони лише сприяють СЕ на певних тканинах (наприклад, корінні; зокрема, *WUS*) або в конкретних умовах культивування (наприклад, *AGL15*, *AGL18*). Надекспресія цих ТФ різко збільшувала утворення вторинних ембріонів із експлантів зиготичних зародків за відсутності екзогенних гормонів (Adamczyk et al., 2007).

Подібно до спостережень, у яких надекспресія генів, задіяних у ініціації та підтримці меристеми, посилювала вже існуючу ембріогенну реакцію, також повідомлялося, що їх ектопічна надекспресія стимулює утворення соматичних ембріоїдів там, де інакше їх не спостерігали б. Перший звіт про ген «меристеми», що стимулює формування ембріоїда, був зроблений Цзо та ін. (Zuo et al., 2002), які отримали естрадіол-індуковану активаційно-мічену мутантну лінію *rga6-1* у арабідопсису, яка формувала соматичні ембріоїди з кінчиків коренів.

Галуа та ін. (Gallois et al., 2002) проаналізували вплив генів *STM* і *WUS* на ініціацію ектопічної меристеми, використовуючи два різні методи для контролю їх експресії у арабідопсису (хімічна індукція та тепловий шок, відповідно). Автори припустили, що експресія *STM* і *WUS* приведе до створення кластерів клітин, прилеглих до вогнища *WUS*, які представляють початкові меристеми. Ці молоді ектопічні меристеми були ініційовані, але меристеми, що самовідновлюються, не були утворені. В інших дослідженнях цих авторів (Gallois et al., 2004), були отримані стабільні трансгенні лінії арабідопсису, де експресія *WUS* була активована або через HSP:CRE-опосередковану ексцизію, або через систему активації GAL4-VP16. За будь-якого типу активації *WUS* унікальні фенотипи спостерігалися у кінчиках коренів, і тип відповіді залежав від інших змінних, таких як гормональний режим або спільна експресія іншого морфогенного ТФ. Наприклад, коли *WUS* експресували окремо у середовищі без гормонів, спостерігалось утворення ектопічних пагонів та листя. Коли *WUS* експресувався в присутності екзогенного ауксину (2,4-Д), індукувались ектопічні соматичні ембріоїди. Квіткові структури спостерігалися, коли *WUS* індукували разом із конститутивно експресованим геном *LEAFY*, основним регулятором розвитку квітів.

Індукція естрадіолом *AtWUS* у тютюну привела до прямої органогенної відповіді, коли кінчики коренів набухали та розвивали зелені пагони, а не соматичні ембріоїди (Rashid et al., 2007). Ектопічна експресія гена *KN1* (*KNOTTED 1*), або *KN1*-гомологів у тютюну й арабідопсису викликала формування адвентивних пагонів на незвичних органах у декількох випадках, зокрема — додаткових осередків меристем на листках у трансгенних рослин арабідопсису (Nishimura et al., 2000).

Використовуючи естрадіол-індуковану систему, Ван та ін. (Wang et al., 2009) ідентифікували гени, що активують ріст рослин, такі як *PGA37* (*PLANT GROWTH ACTIVATION*), надекспресія яких приводила до переходу від вегетативного до ембріогенного розвитку в арабідопсису. Ген *PGA37* кодує транскрипційний фактор MYB118, і його експресія викликала розвиток соматичних ембріоїдів із кореневих експлантів, що супроводжувалося підвищеною експресією *LEC1*. У присутності ауксину, естрадіол-індукована експресія *PGA37* спричиняла формування зелено-жовтуватих ембріогенних калюсів через 7–10 днів, які далі генерували соматичні ембріоїди після 3–5 тижнів культивування. Після вилучення естрадіолу з середовища (що знижувало рівень експресії *PGA37*), соматичні ембріоїди розвивалися у здорові, фертильні рослини. Надекспресія близькоспорідненого гомолога *MYB115*, під естрадіол індукованою системою, також привела до утворення соматичних ембріоїдів з кореневих експлантів. Однак конститутивна і сильна експресія цих морфогенних генів часто викликала небажані плейотропні ефекти, включаючи зниження фертильності. Щоб уникнути цього, потрібно поєднання оптимізованої експресії морфогенних генів рослин з надійним методом обмеження експресії після того, як відбулася регенерація рослин.

Гени, залучені в органогенез *de novo*.

Регенерація органів *de novo* — це процес, у якому додаткові корені або пагони регенерують з відокремлених або пошкоджених органів. Цей процес в культурі *in vitro* відбувається шляхом соматичного ембріогенезу або органогенезу (утворення нових меристем *de novo* або шляхом перегруповання вже існуючих меристем), змінюючи співвідношення ауксин/цитокінін у живильному середовищі (Ikeuchi et al., 2016).

Меристеми генерують клітини, що починають специфічно диференціюватися одночасно з клітинами, які підтримують популяцію проліферуючих дедиференційованих клітин. Генетичні дослідження арабідопсису показали, що мутації генів *STM*, *WUS*, *CLV* порушують баланс між

цими двома процесами. Експресія генів *ZWILLE* і *PINHEAD* є необхідною для ініціації й ідентифікації меристеми пагона, *STM* і *WUS* — для забезпечення її ініціації і підтримки, а *CLV* — для підтримки меристеми пагона. Ген *STM* пов'язаний з формуванням апікальної меристеми на ембріональній стадії розвитку й підтримкою функції апікальної меристеми пагона й флоральної меристеми на постембріональному етапі. Встановлено, що ген *STM* кодує гомеодоменний білок типу *KNOTTED 1* і його експресія корелює з утворенням меристеми пагона в апікальному домені глобулярного зародка.

Тісна кореляція між експресією гена *KN1* (*KNOTTED 1*) і швидким збільшенням пазушних меристем і формуванням додаткових меристем пагонів спостерігалася у ячменя (Zhang et al., 1998). мРНК гена *KN1* кукурудзи ідентифікується в корпусі, а не в шарі L1, у зв'язку з чим передбачається участь цього гена у встановленні межі меристеми та її підтримці в недетермінованому стані. Локалізована експресія інших гомеобокс-генів *KN1*-типу також спостерігається навколо області, з якої у ранньому ембріогенезі розвивається апікальна меристема пагона. Ці дані демонструють залучення гомеобокс-генів типу *KN1* до утворення і підтримки апікальної меристеми пагона, і є підстави припускати спільну дію генів цього класу.

Також повідомлялося про вплив ортолога *STM* кукурудзи *KN1* на органогенез пагонів. Коли ген *KN1* кукурудзи був конститутивно надекспресований (35S::ZmKN1) у тютюні, це призвело до 3-кратного збільшення утворення пагонів порівняно з контролем (Luo et al., 2006). Збільшення частоти утворення пагонів за експресії *KN1* було отримано без відбору на середовищах з антибіотиками чи гербіцидами і без екзогенних гормонів у середовищі, а отримані рослини були кущистими, зі зміненою морфологією листя та недорозвиненим корінням. Надекспресія *KN1* може обійти проміжну фазу калюсу, як повідомили Нішімура та ін. (Nishimura et al., 2000).

Цитокінін сприяє регенерації пагонів шляхом активації *WUS*, і нещодавні дослідження показали, що ключові компоненти сигналу цитокініну, а саме регулятори відповіді арабідопсису типу В *ARR*, безпосередньо зв'язують промотор *WUS* і регулюють транскрипцію цього гена (Meng et al., 2017).

Ключем до регенерації пагонів, викликаної *WIND1*, є здатність цього фактора транскрипції безпосередньо регулювати ген *ESR1* (*ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1*) (Iwase et al., 2017), який разом зі своїм близьким гомологом *ESR2* відіграє важливу роль у

формуванні пагонів, розвитку та регенерації. Інший AP2/ERF ТФ, відомий як *ERF115*, активує гени, які кодують пептидні гормони, такі як PHYTOSULFOKINE 5 (PSK5) (Heuman et al., 2016). Пептиди PSK спочатку були ідентифіковані як дифузійні сигнали, які сприяють проліферації клітин у клітинній культурі, а пізніші дослідження продемонстрували, що вони полегшують відновлення тканин у місцях поранення.

Ген *ARF10* має позитивний регуляторний вплив на регенерацію пагонів *de novo* через активацію генів, специфічних для меристеми пагонів (Wójcikowska et al., 2017). Проведені дослідження виявили ще один ауксин-залежний механізм регенерації пагонів *in vitro*, який опосередковується AP2/ERF ТФ, PLETHORA 3 (PLT3), PLT5 та PLT7 (Kareem et al., 2015). Важливо, що ці PLT є необхідною умовою як для набуття плюрипотентності, так і для ініціації долі меристеми пагона через регуляцію транскрипції *PLT1* і *PLT2*, а також генів сімейства NAM, ATAF1, 2 і CUC2 (NAC), що кодують ТФ *CUC1* і *CUC2* (Kareem et al., 2015). Ген відповіді на ауксин арабідопсису *MP* (*MONOPTEROS*) також представляє інтерес у цьому відношенні. В експериментах, зосереджених на ролі гена *MP* у формуванні пагонів, було виявлено, що використання ендogenous промотору для стимулювання експресії видаленого на С-кінці гена, відомого як *MPΔ* (без домену, що бере участь у взаємодії ауксину/ІОК), збільшує утворення апікальних меристем пагона з калюсу (Skurshumova et al., 2014).

Інші гени, які відіграють важливу роль у формуванні меристеми пагонів, це гени *CUC1* і *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*). Використовуючи гени арабідопсису *CUC1* і *CUC2*, Даймон та ін. (Daimon et al., 2003) показали, що надекспресія цих генів привела до швидкого утворення адвентивних пагонів у трансгенних калюсах, отриманих з гіпокотилів арабідопсису. Калюси з надекспресією *CUC1* та *CUC2* дали в середньому 4,8 і 3,3 додаткових пагона на калюс відповідно, тоді як контрольні мали 0,5 пагона, які розвивалися повільніше. За відсутності фітогормонів додаткові пагони не утворювалися, що вказує на гормонозалежність функції *CUC1* і *CUC2*.

Показано, що активна експресія генів *STM* й *CLV1* спостерігалася на самому початку пагоноутворення і їй передувала активна експресія гена *WUS*. Гени *CUC1* й *CUC2*, які забезпечують нормальну активність гена *STM* (Aida et al., 1999), починали експресуватися ще в калюсних культурах до появи ознак регенерації, а при формуванні бруньок експресія *CUC1* ставала більше локальною.

З використанням індукованої естрадіолом системи для контролю експресії гена *WOX* було оцінено дві комбінації цих генів, отриманих з арабідопсису (*WOX2 + WOX8* або *WOX2 + WOX9*) у присутності 1 мкМ 2,4-Д протягом 10 днів. Обидві комбінації привели до значної регенерації пагонів із листових експлантів *Nicotiana tabacum*, на відміну від контролю, де регенерації пагонів не спостерігалось (Куо et al., 2018).

Аналіз структури зародків, що розвиваються, у поєднанні з активністю мРНК і білків, які кодуються генами *KN1*, *STM* і *ATML1* (*ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM L1 LAYER*), свідчить про те, що експресія цих генів, імовірно, визначає межі між клітинами апікальної меристеми та клітинами, які стають основою для формування специфічних тканин і бічних органів. Як тільки доля клітин визначилася, і з апікальної меристеми вони відійшли до листового зачатка або зачатків інших детермінованих органів, експресія цих генів припиняється задовго до того, коли ці зачатки стають морфологічно помітними.

Таким чином, гени *STM*, *KN1*, *WUS*, *CLV1*, *CLV3*, *CUC1* і *CUC2*, відповідальні за підтримку стабільних розмірів апікальних меристем пагона й функції стовбурових клітин, є важливими й для процесів формування пагонових меристем *in vitro*. Важлива роль цих генів у пагоноутворенні *in vitro* показана й при аналізі їхньої експресії на ранніх етапах регенерації пагонів у культурі тканини *A. thaliana* після пересадження калюсів із середовища для калюсоутворення на середовище для пагоноутворення (Cary et al., 2002).

Клітини, які стали компетентними для утворення кореня в результаті дедиференціації, вступають в організований поділ, щоб сформувати примордії додаткових коренів у відповідних умовах культивування. Рослини-регенеранти, що несуть мутацію гена *RAC* (*RAC FAMILY SMALL GTPase*), характеризувалися аномальним розвитком кореня, формуванням калюсоподібних структур на корені. Встановлено, що у мутанта порушена транскрипція одного з генів ауксинової відповіді, що підтверджує припущення про участь гена *RAC* у передачі ауксинового сигналу, необхідного для формування бічних коренів (Lund et al., 1997). Показано, що ген *RAC*, як припускають, залучений у сигнальну систему трансдукції ауксину, що є певною вимогою для додаткового ініціювання коріння, або приймає участь у зміні рівнів чутливості до ауксину, що необхідно для додаткового ініціювання коренів (Lund et al., 1996).

Деякі мутації, що зачіпають формування адвентивних коренів можуть бути пов'язані з

компетентністю до ризогенезу. В *RTCS* мутантах кукурудзи й *Mortal* мутантів білої конюшини, відбувається розвиток додаткових вузлових коренів (White et al., 1998). Пояснення такого фенотипу *RTCS* й *Mortal* мутантів полягає в тому, що клітини вузлів, звичайно компетентні до ризогенезу втрачають компетентність у результаті мутацій і можуть сформувати додаткові корені тільки тоді, коли штучно викликана дедиференціація.

Ген *WOX11* є важливим елементом, залученим до ауксин-опосередкованої регенерації та змін у клітинній долі, сприяючи переходу клітин у стан, здатний до регенерації під дією ауксину. Він також відіграє роль на стадіях праймінгу та ініціації (Liu et al., 2014). Промоторна область *WOX11* містить елементи відповіді на ауксин (*AuxRE*), на які націлені фактори відповіді на ауксин (*ARF*) у сигнальному шляху ауксину (Liu et al., 2014). Коли ауксин полярно транспортується в клітини, здатні до регенерації, сигнальний шлях ауксину може безпосередньо індукувати експресію *WOX11* через ці *AuxRE* в клітинах, здатних до регенерації, хоча все ще незрозуміло, які саме *ARF* беруть участь у цьому процесі. Експресія *WOX11* вказує на перехід долі клітини від клітини, здатної до регенерації, до додаткової клітини-засновника кореня (відомий як етап праймування), а *WOX11* є специфічним маркером клітин-засновників кореня (Liu et al., 2014). Як фактор транскрипції, *WOX11* може безпосередньо зв'язуватися з *WOX*-зв'язуючим цис-елементом (*WOXCE*) у промоторах *LBD16*, *WOX5* і *WOX7*, та активувати їх експресію (Sheng et al., 2017). Генетичні дослідження показують, що мутація гена *WOX11* або інгібування шляху *WOX11* може призвести до зниження здатності до укорінення, а надекспресія *WOX11* може збільшити утворення коріння (Pan et al., 2019).

Ген *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*) є одним із важливих транскрипційних факторів сигналізації абсцизової кислоти та відноситься до генів *LAF1*, що утворюють групу *AFL*. Цей ген необхідний для появи коренів з калюсу після індукції органогенезу та може бути залучений у розподіл та/або гомеостаз ауксину. Мутант *abi3-6* не демонструє жодної регенерації після переходу від середовища, багатого гормонами, до безгормонального (Sengupta, Chaudhuri, 2020).

Регенерація *de novo* коренів з експлантів листя арабідопсису пропонує іншу модельну систему для вивчення індукованої пораненням регенерації органів, і в цьому випадку ендогенний ауксин відіграє центральну роль у сприянні регенерації. Проведені дослідження показали, що як базипетальний транспорт ауксину до ранових ді-

лянок, так і *YUCCA* (*YUC*)-залежний *de novo* біосинтез сприяють цьому типу регенерації коренів (Chen et al., 2016). Хоча зрозуміло, що рановий стрес є основним тригером для регенерації органів, його одного часто недостатньо, щоб запустити весь набір регенеративних реакцій.

Два сімейства ТФ задіяні в ідентифікації пагона і кореня, зокрема сімейство HD-ZIP класу III (Emery et al., 2003) та родина AP2-домени PLETHORA (*PLT*) (Galinha et al., 2007), відповідно. ТФ сімейства HD-ZIP III регулюють формування пагонів, межі між пагоном і сім'ядолями, центральною частиною ембріоїда та дорсальною частиною листя під час постембріонального розвитку. Конститутивна експресія *PLT1* або *PLT2* індукуює гіпокотиль, корінь і нішу стовбурових клітин кореня з базальної області ембріоїда, що вказує на центральну роль *PLT1* і *PLT2* у визначенні долі базальних клітин.

Гени, що беруть участь у трансдукції гормонального сигналу. Дослідження підтверджують, що значний вплив на прояв тотипотентності *in vitro* мають гени, які змінюють рівень гормонів у клітинах або поріг їхньої чутливості. Ауксини, зокрема синтетичний ауксиноподібний регулятор росту 2,4-Д, зазвичай використовуються для індукції соматичного ембріогенезу (Teale et al., 2006). Під час індукції СЕ гени фактора відповіді на ауксин (*ARF*) проявляють специфічність експресії і мають підвищену або понижувальну регуляцію, що свідчить про те, що передача сигналів ауксину є центральною у цьому процесі (Blakeslee et al., 2019). Дані про профіль експресії *ARF* у СЕ арабідопсису та інших рослин також свідчать про те, що *ARF6*, *ARF7*, *ARF8*, *ARF9* і *ARF19* відіграють певну роль у контролі індукції СЕ, однак їх конкретні функції та цілі ще не визначені. Крім того, гени *YUCCA* та *AUX/IAA* залучені до біосинтезу ауксину та транскрипційно регулюються під час СЕ, у тому числі за допомогою факторів транскрипції *LAF1* (Wójcikowska et al., 2017). Полярний транспорт і градієнт ауксину необхідні для формування соматичного ембріоїда (Shani et al., 2017). Органогенез і регенерація рослин також відбувається шляхом додавання регуляторів росту рослин, таких як ауксини та цитокініни (De Rybel et al., 2009).

На раніших етапах досліджень було встановлено, що гени підсилювача регенерації пагонів арабідопсису *ESR1* і *ESR2* (*ENHANCER OF SHOOT REGENERATION*) продемонстрували свою участь у шляху відповіді на цитокінін. Надекспресія як *ESR1*, так і *ESR2* привела до цитокінін-незалежного утворення пагона (Ikeda et al., 2006). Після перенесення калюсів на се-

редовище для пагоноутворення з підвищеним вмістом цитокініну підвищувалася експресія цитокінінрегульованих генів, у тому числі гена *CRE1* (*CYTOKININ RESPONSE 1*), який кодує цитокініновий рецептор, і гена *CK1* (*CYTOKININ-INDEPENDENT1*). Збільшена транскрипція генів *STM* й *KN1*, відзначена у трансгенних рослин *A. thaliana*, які містять бактеріальний ген *IPT*, приводила до температурозалежного збільшення вмісту вільних і зв'язаних цитокінінів (Rupp et al., 1999). Ці дані свідчать про те, що цитокінін може регулювати експресію генів *STM* й *KN1*, і пояснюють, чому цитокініни підвищують здатність до пагоноутворення *in vitro* й *in vivo*.

Окрім генів, які беруть участь у сигнальному шляху гормонів, рівні гормонів можуть впливати на фенотипову відповідь генів, які беруть участь у морфогенезі. Трансгенні експланти арабідопсису з надекспресією *LEC2* продукували соматичні ембріоїди за присутності низьких концентрацій ауксину, тоді як збільшення їх концентрації приводило до утворення калюсів (Liao et al., 2008).

У роботі Франка й співавторів (Frank et al., 2000) вдалося одержати калюси, що формували переважно корінь (*rooty callus*) або пагони (*shooty callus*). Оскільки в даній роботі такий фенотип мали штами, вирощувані на середовищах без гормонів, припустили, що в клітинах отриманих штамів спостерігається підвищений вміст відповідних гормонів або клітини мають підвищену чутливість до них (знижений поріг чутливості). Проведені фізіологічні й молекулярно-генетичні дослідження підтвердили зроблені припущення. У трьох штамів *rooty callus* — *r1*, *r2*, *r6* — виявлено істотне збільшення вмісту вільного й зв'язаного ауксину; у *r3* — збільшений рівень транскрипції генів *IAA1* й *IAA2*, що беруть участь у передачі ауксинового сигналу, а в *r4* і *r5* — збільшений рівень транскрипції гена *IAA9*. У той же час у всіх *shooty callus* виявлений підвищений рівень транскрипції гена *CK1*, що приймає участь у передачі цитокінінового сигналу (Kakimoto, 1996) і функціонує як рецептор цитокініну в процесі індукції пагонового органогенезу, а також збільшення експресії гомеобоксвмістних генів *STM* й *KN1* (Frank et al., 2000).

Ген *CK1* кодує гістидинкіназу сенсорного типу, що є компонентом двокомпонентної регуляторної системи, що приблизно діє як рецептор цитокініну (Kakimoto, 1996). Інсерція Т-ДНК викликала конститутивне підвищення експресії гена *CK1*, що призводило до підвищення чутливості мутанта до цитокініну. Якщо *CK1* визначає чутливість клітини до пагін-індукуючого сигналу цитокініну, виникає передбачення, що компетентність до пагонового органогене-

зу може відбивати безпосередньо рівень активності *CK11*. Повідомлялося ще про декілька генів, які кодують передбачувану регуляторну відповідь двокомпонентної системи в *Arabidopsis* (Brandstatter, Kieber, 1998). Серед них, *IBC6* й *IBC7* особливо цікаві з погляду цитокінінового сигналу, тому що рівні мРНК цих генів були швидко підняті додаванням екзогенного цитокініну.

Мутації по гену *TSD* (TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT) в арабідопсису *tsd1*, *tsd2*, *tsd3* викликали здатність формувати нескінченно проліферуючі калюси на безгормональних середовищах (Frank et al., 2002). Оскільки в мутантів відзначене збільшення рівня транскрипції генів *CK11*, *KN1* й *STM*, передбачається, що продукти генів *TSD* беруть участь у негативній цитокінінзалежній регуляції меристематичної активності на стадії вегетативного розвитку. Мутації *A. thaliana ire1* та *pom1/erh2* збільшували здатність пагонів до регенерації, підвищуючи компетентність тканин до гормональних сигналів (Cary et al., 2002).

Ген *PKL* кодує білок CHD3 (CHORMATIN ORGANIZATION MODIFIER), який вірогідно регулює транскрипцію, впливаючи на структуру хроматину (Ogas et al., 1997). При культивуванні кореневих експлантів мутанта *pk1* на безгормональних середовищах від 10 до 30 % експлантів формували калюси, здатні до соматичного ембріогенезу. Виявлено також, що в корінні мутанта *pk1* накопичувалися запасні речовини, які в рослинах дикого типу присутні тільки в зиготичних зародках, а також експресується ген *LEC1*. При додаванні в середовище уніконазолу — інгібітора синтезу гібереліну — частота калюсо- і ембріогенезу підвищувалася до 80%, а при додаванні гібереліну ці процеси пригнічувалися. Ці дані свідчать про те, що гіберелін може репресувати програму ембріогенезу за участі гена *PKL*. Подальше вивчення спектра генів, які експресуються на різних стадіях морфогенезу *in vitro* показало, що інкубація експлантів на середовищі для калюсогенезу (з підвищеним вмістом ауксину) приводить до експресії багатьох ауксинрегульованих генів, у тому числі генів родини AUX/IAA.

Вважається, що родина ауксинів AUX/IAA перебуває під контролем *LEC1* (*IAA5*, *IAA16* і *IAA19*) і *LEC2* (*IAA1*, *IAA17*, *IAA30* і *IAA31*) під час ембріонального розвитку (Junker et al., 2012). Також відомо, що *LEC2* швидко індукує експресію пов'язаних з ауксином генів, таких як *IAA* та *ACS4* (1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 4), а також ключових ферментів, що беруть участь у біосинтезі ауксину, таких як гени *YUC* (*YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC10*) (Wójcikowska

et al., 2017). Вплив *LEC2* на полярний транспорт ауксину також не можна виключити, оскільки посилення стимуляторів витоку ауксину, *PIN1* і *PIN2*, спостерігалось в трансгенних рослинах тютюну, які мають надекспресію *LEC2* (Guo et al., 2013). На додаток до функції, пов'язаної з ауксином, гени *LEC1* і *LEC2* разом із *FUS3*, контролюють здатність експлантів до СЕ через регулювання балансу гіберелінів (ГК)/абсцизової кислоти (АБК) у тканині. Гени, пов'язані з ауксином, були виявлені в мішенях *BBM*, які беруть участь у СЕ у арабідопсису, включаючи гени, пов'язані з біосинтезом (*TAA1*, *YUC3* і *YUC8*), транспортом (*PIN1* і *PIN4*) і передачею сигналів ауксину (*ARF2*, *ARF6*, *ARF10*, *IAA2*, *IAA7* та *IAA28*) (Horstman et al., 2017a).

У ембріогенній культурі арабідопсису виявлено шлях *TAA1/YUC*, який контролюється триптофан-амінотрансферазами *TAA1* і *RELATED1-4* (*TAR*) і флавінзалежними монооксигеназами *YUCCA* (Wójcikowska et al., 2013). Було виявлено, що шість з одинадцяти генів *YUC*, *YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC6*, *YUC10* і *YUC11*, експресуються в різних ембріогенних культурах арабідопсису (Wickramasuriya, Dunwell, 2015). У цієї культури обробка експлантів незрілих зиготичних зародків 2,4-Д активувала *YUC1*, *YUC4* та *YUC10*. Збільшення транскриптів *YUC1* і *TAA1*, що корелює з підвищеним рівнем ендогенної ІОК, також спостерігалось в ембріогенних експлантах кави (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Триптофан-залежний *TAA1-YUC* шлях біосинтезу ІОК зазвичай сприяє накопиченню ауксину, що пов'язано з ембріогенним переходом у соматичних клітинах рослин. Дослідження показали, що як базипетальний транспорт ауксину до ранових ділянок, так і *YUCCA* (*YUC*)-залежний *de novo* біосинтез сприяють цьому типу регенерації коренів (Chen et al., 2016).

Заключення. Морфогенез рослин *in vitro* є результатом складних взаємодій генетичних, епігенетичних та гормональних факторів, що визначають розвиток клітин і тканин. Гормони, такі як ауксин і цитокінін, сприяють індукції цих процесів, змінюючи експресію генів, відповідальних за поділ, диференціацію й інші аспекти морфогенезу. Проведені дослідження свідчать, що різні види рослин, а також сорти й лінії одного виду демонструють відмінну здатність до проявів морфогенезу *in vitro*, таких як калюсогенез, утворення пагонів і коренів, а також соматичний ембріогенез. Кожен вид, а інколи й різновиди в межах одного виду, потребують специфічних комбінацій морфогенних тригерів (особливих комбінацій генів або моделей їхньої експресії) для успішного формування соматичних ембріодів або апікаль-

них меристем. Здійснені численні експерименти для встановлення генетичних механізмів, які контролюють процеси морфогенезу *in vitro*. Їхне вивчення виявило ключову роль транскрипційних факторів і гормональних сигналів у детермінації тотипотентності рослинних клітин. Встановлено, що молекулярні механізми, які лежать в основі морфогенезу *in vitro*, включають складні взаємодії між генами, регуляторними факторами та гормональними сигналами, які контролюють процеси дедиференціації, проліферації та диференціації клітин. Епігенетичні фактори також мають значний вплив на тотипотентність клітин, змінюючи їх транскрипційний профіль у відповідь на зовнішні стимули. Отримані результати розширюють перспективи для застосування явища тотипотентності в біотехнології рослин, особливо для розмноження цінних культур і створення рослин з новими корисними ознаками. Очевидно, що найближчим часом для ідентифікації генів будуть усе ширше використовуватися й нові методи, що дозволять порівнювати спектри генів, які експресуються у культурах, що відрізняються за ознаками тотипотентності або на різних стадіях морфогенезу *in vitro*.

References

1. Adamczyk B. J., Lehti-Shiu M. D., Fernandez D. E. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2007. Vol. 50. P. 1007–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03105.x>.
2. Aida M., Ishida T., Tasaka M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development.* 1999. Vol. 126, № 8. P. 1563–1570. <https://doi.org/10.1242/dev.126.8.1563>.
3. Arroyo-Herrera A., Ku Gonzalez A., Canche Moo R., Quiroz-Figueroa F. R., Loyola-Vargas V. M., Rodriguez-Zapata L. C., Burgeff D'Hondt C., Suárez-Solis V. M., Castaño E. Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 2008. Vol. 94. P. 171–180. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9401-1>.
4. Ayil-Gutiérrez B., Galaz-Avalos R. M., Peña-Cabrera E., Loyola-Vargas V. M. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signal. Behav.* 2013. Vol. 8, № 11. e26998. <https://doi.org/10.4161/psb.26998>.
5. Baud S., Kelemen Z., Thévenin J., Boulard C., Blanchet S., To A., Payre M., Berger N., Effroy-Cuzzi D., Franco-Zorrilla J. M., Godoy M., Solano R., Thevenon E., Parcy F., Lepiniec L., Dubreucq B. Deciphering the molecular mechanisms underpinning the transcriptional control of gene expression by master transcriptional regulators in *Arabidopsis* seed. *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171, № 2. P. 1099–1112. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00034>.
6. Belide S., Zhou X. R., Kennedy Y., Lester G., Shrestha P., Petrie J. R., Singh S. P. Rapid expression and validation of seed-specific constructs in transgenic LEC2 induced somatic embryos of *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2013. Vol. 113. P. 543–553. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0295-1>.
7. Berckmans B., Vassileva V., Schmid S. P., Maes S., Parizot B., Naramoto S., Magyar Z., Alvim Kamei C. L., Koncz C., Bögre L., Persiau G., De Jaeger G., Friml J., Simon R., Beeckman T., De Veylder L. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell.* 2011. Vol. 23, № 10. P. 3671–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088377>.
8. Bidabadi S. S., Jain S. M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants.* 2020. Vol. 9, № 6. P. 702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>.
9. Blakeslee J. J., Spatola Rossi T., Kriechbaumer V. Auxin biosynthesis: Spatial regulation and adaptation to stress. *J Exp Bot.* 2019. Vol. 70, № 19. P. 5041–5049. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz283>.
10. Bouchabké-Coussa O., Obellianne M., Linderme D., Montes E., Maia-Grondard A., Vilaine F., Pannetier C. WUSCHEL overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 2013. Vol. 32, № 5. P. 675–686. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1402-9>.
11. Boutilier K., Offringa R., Sharma V. K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.-M., van Lammeren A. A. M., Miki B. L. A., Custers J. B., van Lookeren Campagne M. M. Ectopic expression of BABY-BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell.* 2002. Vol. 14, № 8. P. 1737–1749. <https://doi.org/10.1105/tpc.001941>.
12. Brand A., Quimbaya M., Tohme J., Chavarriga-Aguirre P. *Arabidopsis* LEC1 and LEC2 orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Front Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 673. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00673>.
13. Brandstatter I., Kieber J. J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1998. Vol. 10, № 6. P. 1009–1019. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.1009>.
14. Cao A., Zheng Y., Yu Y., Wang X., Shao D., Sun J., Cui B. Comparative transcriptome analysis of SE initial dedifferentiation in cotton of different SE capability. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 8583–8595. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08763-8>.
15. Carbonero P., Iglesias-Fernández R., Vicente-Carbajosa J. The AFL subfamily of B3 transcription factors: Evolution and function in angiosperm seeds. *J Exp Bot.* 2017. Vol. 68, № 4. P. 871–880. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw458>.
16. Cary A. J., Che P., Howell S. H. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2002. Vol. 32, № 6. P. 867–877. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01479.x>.
17. Chen Y., Xu X., Liu Z., Zhang Z., Han X., Lin Y., Lai Z. Global scale transcriptome analysis reveals differentially expressed genes involve in early somatic embryogenesis in *Dioscorea longan* Lour. *Bmc Genom.* 2020. Vol. 21, № 1. P. 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6393-7>.
18. Chen L., Tong J., Xiao L., Ruan Y., Liu J., Zeng M., Huang H., Wang J.-W., Xu L. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2016. Vol. 67, № 14. P. 4273–4284. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw213>.
19. Kukurshumova W., Smirnova T., Marcos D., Zayed Y., Berleth T. Irrepressible MONOPTEROS/ARF5 promotes *de novo* shoot formation. *New Phytol.* 2014. Vol. 204. P. 556–566. <https://doi.org/10.1111/nph.13014>.
20. Daimon Y., Takabe K., Tasaka M. The CUP-SHAPED COTYLEDON genes promote adventitious shoot formation on calli. *Plant Cell Physiol.* 2003. Vol. 44, № 2. P. 113–121. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg038>.
21. De Rybel B., Audenaert D., Beeckman T., Kepinski S. The past, present, and future of chemical biology in aux-

- in research. *ACS Chem Biol.* 2009. Vol. 4, № 12. P. 987–998. <https://doi.org/10.1021/cb9001624>.
22. Dolzblasz A., Nardmann J., Clerici E., Causier B., Van der Graaff E., Chen J., Davies B., Werr W., Laux T. Stem cell regulation by Arabidopsis WOX genes. *Mol. Plant.* 2016. Vol. 9, № 7. P. 1028–1039. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.007>.
 23. El Ouakfaoui S., Schnell J., Abdeen A., Colville A., Labbé H., Han S., Baum B., Laberge S., Miki B. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol Biol.* 2010. Vol. 74, № 4–5. P. 313–326. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9674-8>.
 24. Elhiti M., Tahir M., Gulden R. H., Khamiss K., Stasolla C. Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot.* 2010. Vol. 61, № 14. P. 4069–4085. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq222>.
 25. Emery J. F., Floyd S. K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N. P., Izhaki A., Baum S. F., Bowman J. L. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol.* 2003. Vol. 13, № 20. P. 1768–1774. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.035>.
 26. Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cell Res.* 2012. Vol. 22, № 7. P. 1169–1180. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.63>.
 27. Fister A. S., Landherr L., Peryman M., Zhang Y., Gultinan M. J., Maximova S. N. Glucocorticoid receptor-regulated TcLEC2 expression triggers somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* leaf tissue. *PLoS ONE.* 2018. Vol. 13, № 11. e0207666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207666>.
 28. Florez S. L., Erwin R. L., Maximova S. N., Gultinan M. J., Curtis W. R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biol.* 2015. Vol. 15. P. 121. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0479-4>.
 29. Frank M., Guivarch A., Krupkova E., Lorenz-Meyer I., Chriqui D., Schmülling T. Tumorous shoot development (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J.* 2002. Vol. 29, № 1. P. 73–85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2002.01197.x>.
 30. Frank M., Rupp H.-M., Prinsen E., Motyka V., Van Onckelen H., Schmülling T. Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiol.* 2000. Vol. 122, № 3. P. 721–9. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.721>.
 31. Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., Scheres B. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature.* 2007. Vol. 449, № 7165. P. 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature06206>.
 32. Gallois J. L., Nora F. R., Mizukami Y., Sablowski R. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev.* 2004. Vol. 18, № 4. P. 375–380. <https://doi.org/10.1101/gad.291204>.
 33. Gallois J. L., Woodward C., Reddy G. V., Sablowski R. Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development.* 2002. Vol. 129, № 13. P. 3207–3217. <https://doi.org/10.1242/dev.129.13.3207>.
 34. Gambino G., Minuto M., Boccacci P., Perrone I., Vallania R., Gribaudo I. Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *J Exp Bot.* 2010. Vol. 62, № 3. P. 1089–1101. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq349>.
 35. Gazzarrini S., Tsuchiya Y., Lumba S., Okamoto M., McCourt P. The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell.* 2004. Vol. 7, № 3. P. 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.017>.
 36. Gliwicka M., Nowak K., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Gaj M. D. Extensive Modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, № 7. e69261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069261>.
 37. Gordon S. P., Heisler M. G., Reddy G. V., Ohno C., Das P., Meyerowitz E. M. Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development.* 2007. Vol. 134, № 19. P. 3539–3548. <https://doi.org/10.1242/dev.010298>.
 38. Gordon-Kamm B., Sardesai N., Arling M., Lowe K., Hoerster G., Betts S., Jones T. Using Morphogenic Genes to Improve Recovery and Regeneration of Transgenic Plants. *Plants.* 2019. Vol. 8, № 2. P. 38. <https://doi.org/10.3390/plants8020038>.
 39. Grafi G., Chalifa-Caspi V., Nagar T., Plaschkes I., Barak S., Ransbotyn V. Plant response to stress meets dedifferentiation. *Planta.* 2011. Vol. 233. P. 433–438. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1366-3>.
 40. Grienenberger E., Fletcher J. C. Polypeptide signaling molecules in plant development. *Curr Opin. Plant Biol.* 2015. Vol. 23. P. 8–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.09.013>.
 41. Guo F., Liu C., Xia H. Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, № 8. e71714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071714>.
 42. Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 2004. Vol. 131, № 3. P. 657–668. <https://doi.org/10.1242/dev.00963>.
 43. Harding E. W., Tang W., Nichols K. W., Fernandez D. E., Perry S. E. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-LIKE15. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, № 2. P. 653–663. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023499>.
 44. Hecht V., Vielle-Calzada J.-P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C. The Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase I gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 127, № 3. P. 803–816. <https://doi.org/10.1104/pp.010324>.
 45. Heyman J., Cools T., Canher B., Shavialenka S., Traas J., Vercauteren I., Van den Daele H., Persiau G., De Jaeger G., Sugimoto K., De Veylder L. The heterodimeric transcription factor complex ERF115–PAT1 grants regeneration competence. *Nat Plants.* 2016. Vol. 2, № 11. P. 16165–16167. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.165>.
 46. Horstman A., Bemer M., Boutilier K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration.* 2017a. Vol. 4, № 4. P. 201–216. <https://doi.org/10.1002/reg2.91>.
 47. Horstman A., Li M., Heidmann I., Weemen M., Chen B., Muiño J. M., Angenent G. C., Boutilier K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 2017b. Vol. 175, № 2. P. 848–857. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00232>.
 48. Hu B., Zhang G., Liu W., Shi J., Wang H., Qi M., Li J., Qin P., Ruan Y., Huang H., Zhang Y., Xu L. Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. *Regeneration.* 2017. Vol. 4, № 3. P. 132–139. <https://doi.org/10.1002/reg2.82>.
 49. Ibanez S., Carneros E., Testillano P. S., Perez-Perez J. M. Advances in Plant Regeneration: Shake, Rattle and Roll. *Plants.* 2020. Vol. 9, № 7. P. 897. <https://doi.org/10.3390/plants9070897>.
 50. Ikeda Y., Banno H., Niu Q. W., Howell S. H., Chua N. H. The enhancer of shoot regeneration 2 gene in Arabidopsis regulates cup-shaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol.* 2006. Vol. 47, № 11. P. 1443–1456. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl023>.

51. Ikeuchi M., Iwase A., Rymer B., Lambolz A., Kojima M., Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., De Veylder L., Sakakibara H., Sugimoto K. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol.* 2017. Vol. 175, № 3. P. 1158–1174. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>.
52. Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development.* 2016. Vol. 143, № 9. P. 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>.
53. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell.* 2013. Vol. 25, № 9. P. 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
54. Ishihara H., Sugimoto K., Tarr P. T., Temman H., Kadokura S., Inui Y., Sakamoto T., Sasaki T., Aida M., Suzuki T., Inagaki S., Morohashi K., Seki M., Kakutani T., Meyerowitz E. M., Matsunaga S. Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nat Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 1786. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09386-5>.
55. Iwase A., Harashima H., Ikeuchi M., Rymer B., Ohnuma M., Komaki S., Morohashi K., Kurata T., Nakata M., Ohme-Takagi M. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2017. Vol. 29, № 1. P. 54–69. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00623>.
56. Jha P., Ochatt S. J., Kumar V. WUSCHEL: A master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Rep.* 2020. Vol. 39, № 4. P. 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02511-5>.
57. Jo L., Pelletier J. M., Harada J. J. Central role of the LEAFY COTYLEDON1 transcription factor in seed development. *J Integr Plant Biol.* 2019. Vol. 61, № 5. P. 564–580. <https://doi.org/10.1111/jipb.12806>.
58. Junker A., Mönke G., Rutten T., Keilwagen J., Seifert M., Thi T. M. N., Renou J.-P., Balzergue S., Viehöver P., Hähnel U., Ludwig-Müller J. Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 2012. Vol. 71, № 3. P. 427–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04999.x>.
59. Kakimoto T. CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science.* 1996. Vol. 274, № 5289. P. 982–985. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.982>.
60. Karami O., Rahimi A., Mak P., Horstman A., Boutilier K., Compier M., van der Zaal B., Offringa R. An Arabidopsis AT-hook motif nuclear protein mediates somatic embryogenesis and coinciding genome duplication. *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 2508. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22815-8>.
61. Kareem A., Durgaprasad K., Sugimoto K., Du Y., Pulianmackal A. J., Trivedi Z. B., Abhayadev P. V., Pinon V., Meyerowitz E. M., Scheres B., Prasad K. PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Curr Biol.* 2015. Vol. 25, № 8. P. 1017–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.022>.
62. Karlova R., Boeren S., Russinova E., Aker J., Vervoort J., de Vries S. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *Plant Cell.* 2006. Vol. 18, № 3. P. 626–638. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039412>.
63. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 730 p. [in Ukrainian] / Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.
64. Kyo M., Maida K., Nishioka Y., Matsui K. Coexpression of WUSCHEL related homeobox (WOX) 2 with WOX8 or WOX9 promotes regeneration from leaf segments and free cells in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol.* 2018. Vol. 35, № 1. P. 23–30. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0126a>.
65. Laux T., Mayer K. F., Berger J., Jurgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development.* 1996. Vol. 122, № 1. P. 87–96. <https://doi.org/10.1242/dev.122.1.87>.
66. Ledwoń A., Gaj M. D. LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Growth Regul.* 2011. Vol. 65. P. 157–167. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9585-y>.
67. 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. Vol. 41, № 12. P. 2415–2422. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02932-4>.
68. Lee K., Seo P. J. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration. *Trends Plant Sci.* 2018. Vol. 23, № 3. P. 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.009>.
69. Li J., Wang M., Li Y., Zhang Q., Lindsey K., Daniell H., Jin S., Zhang X. Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation process. *Plant Biotechnol. J.* 2019. Vol. 17. P. 435–450. <https://doi.org/10.1111/pbi.12988>.
70. Liao Y. K., Liao C. K., Ho Y. L. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morricicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2008. Vol. 93, № 3. P. 257–268. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9371-3>.
71. Liu J., Hu X., Qin P. The WOX11-LBD16 pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during de novo shoot regeneration in tissue culture. *Plant Cell Physiol.* 2018. Vol. 59. P. 734–743. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy010>.
72. Liu J., Sheng L., Xu Y., Li J., Yang Z., Huang H., Xu L. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2014. Vol. 26, № 3. P. 1081–1093. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.122887>.
73. Liu Z., Ge X. X., Qiu W. M., Long J. M., Jia H. H., Yang W., Dutt M., Wu X. M., Guo W. W. Overexpression of the Cs-FUS3 gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in Citrus. *Plant Sci.* 2018. Vol. 277. P. 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.015>.
74. Long J. A., Moan E. I., Medford J. I., Barton M. K. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature.* 1996. Vol. 379, № 6560. P. 66–69. <https://doi.org/10.1038/379066a0>.
75. Lotan T., Ohto M., Yee K. M., West M. A., Lo R., Kwong R. W., Yamagishi K., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON 1 is sufficient to induce embryo development in vegetative tissue. *Cell.* 1998. Vol. 93, № 7. P. 1195–1205. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81463-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81463-4).
76. Lund S. T., Smith A. G., Hackett W. P. Cuttings of a tobacco mutant, *rac*, undergo cell divisions but do not initiate adventitious roots in response to exogenous auxin. *Physiologia Plantarum.* 1996. Vol. 97. P. 372–380. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.970223.x>.
77. Lund S. T., Smith A. G., Hackett W. P. Differential gene expression in response to auxin treatment in the wild-type and *rac*, an adventitious rooting-incompetent mutant of tobacco. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, № 4. P. 1197–1206. <https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1197>.
78. Luo K., Zheng X., Chen Y., Xiao Y., Zhao D., McAvoy R., Pei Y., Li Y. The maize Knotted1 gene is an effective positive selectable marker gene for Agrobacterium-mediated tobacco transformation. *Plant Cell Rep.* 2006. Vol. 25, № 5. P. 403–409. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0051-z>.
79. Ma Y., Miotk A., Šutikovič Z., Ermakova O., Wenzl C., Medzihradský A., Gaillochet C., Forner J., Utan G., Brackmann K., Galván-Ampudia C. S., Vernoux T., Greb T., Lohmann J. U. WUSCHEL acts as an auxin response reostat to maintain apical stem cells in Arabidopsis. *Nat Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 5093. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13074-9>.

80. Magnani E., Jiménez-Gómez J. M., Soubigou-Taconnat L., Lepiniec L., Fiume E. Profiling the onset of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Bmc Genom.* 2017. Vol. 18. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4391-1>.
81. Mayran A., Drouin J. Pioneer transcription factors shape the epigenetic landscape. *J Biol Chem.* 2018. Vol. 293, № 36. P. 13795–13804. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.001232>.
82. Méndez-Hernández H. A., Ledezma-Rodríguez M., Avilez-Montalvo R. N., Juárez-Gómez Y. L., Skeete A., Avilez-Montalvo J., De-La-Peña C., Loyola-Vargas V. M. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Front Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>.
83. Meng W. J., Cheng Z. J., Sang Y. L., Zhang M. M., Rong X. F., Wang Z. W., Tang Y. Y., Zhang X. S. Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. *Plant Cell.* 2017. Vol. 29, № 6. P. 1357–1372. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00640>.
84. Morcillo F., Gallard A., Pillot M., Jouannic S., Aberlenc-Bertossi F., Collin M., Verdeil J. L., Tregear J. W. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta.* 2007. Vol. 226, № 6. P. 1353–1362. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0574-3>.
85. Mordhorst A. P., Voerman K. J., Hartog M. V., Meijer E. A., van Went J., Koornneef M., de Vries S. C. Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics.* 1998. Vol. 149, № 2. P. 549–563. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.549>.
86. Mursyanti E., Purwantoro A., Moeljopawiro S., Semiarti E. Induction of Somatic Embryogenesis through Overexpression of ATRKD4 Genes in *Phalaenopsis* "Sogo Vivien". *Indones J Biotechnol.* 2015. Vol. 20, № 1. P. 42–53. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.15276>
87. Nishimura A., Tamaoki M., Sakamoto T., Matsuoka M. Over-Expression of Tobacco knotted 1-Type ClassI Homeobox Genes Alters Various Leaf Morphology. *Plant Cell Physiol.* 2000. Vol. 41, № 5. P. 583–590. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.5.583>.
88. Nowak K., Gaj M. D. Transcription factors in the regulation of somatic embryogenesis. In book: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland. 2016. P. 53–79. ISBN 9783319337050. doi:10.1007/978-3-319-33705-0_5.
89. Ogas J., Cheng J.-C., Sung Z. R., Somerville C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle Mutant. *Science.* 1997. Vol. 277, № 5322. P. 91–94. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.91>.
90. Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of BD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007. Vol. 19, № 1. P. 118–130. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>.
91. Orłowska A., Kępczyńska E. Identification of Polycomb Repressive Complex1, Trithorax group genes and their simultaneous expression with WUSCHEL, WUSCHEL-related Homeobox5 and SHOOT MERISTEMLESS during the induction phase of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2018. Vol. 134. P. 345–356. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1425-6>.
92. Palovaara J., Hallberg H., Stasolla C., Hakman I. Comparative expression pattern analysis of WUSCHEL-related homeobox 2 (WOX2) and WOX8/9 in developing seeds and somatic embryos of the gymnosperm *Picea abies*. *New Phytol.* 2010. Vol. 188. P. 122–135. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03336.x>.
93. Pan J., Zhao F., Zhang G., Pan Y., Sun L., Bao N., Qin P., Chen L., Yu J., Zhang Y., Xu L. Control of de novo root regeneration efficiency by developmental status of *Arabidopsis* leaf explants. *J Genet Genomics.* 2019. Vol. 46, № 3. P. 133–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.03.001>
94. Pasternak T., Dudits D. Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis in planta and in vitro. *Front Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 778. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00778>.
95. Pelletier J. M., Kwong R. W., Park S., Le B. H., Baden R., Cagliaria A., Hashimoto M., Munoz M. D., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J. EC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. Vol. 114, № 32. E6710–E6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707957114>.
96. Pérez-Pascual D., Jiménez-Guillen D., Villanueva-Alonzo H., Souza-Perera R., Godoy-Hernández G., Zúñiga-Aguilar J. J. Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homolog-induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiol Plant.* 2018. Vol. 163, № 4. P. 530–551. <https://doi.org/10.1111/pp1.12709>.
97. Perry S. E., Zheng Q., Zheng Y. Transcriptome analysis indicates that GmAGAMOUS-Like 15 may enhance somatic embryogenesis by promoting a dedifferentiated state. *Plant Signal Behav.* 2016. Vol. 11, № 7. e1197463. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1197463>.
98. Rashid S. Z., Yamaji N., Kyo M. Shoot formation from root tip region: A developmental alteration by WUS in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 2007. Vol. 26, № 9. P. 1449–1455. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0342-7>.
99. Rupp H. M., Frank M., Werner T., Schmölling T. Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* 1999. Vol. 18, № 5. P. 557–563. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00472.x>.
100. Rupps A., Raschke J., Rümmler M., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABY BOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related HOMEBOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta.* 2016. Vol. 243, № 2. P. 473–488. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2409-y>.
101. Salaün C., Lepiniec L., Dubreucq B. Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. *Plants.* 2021. Vol. 10, № 7. P. 1467. <https://doi.org/10.3390/plants10071467>.
102. Santiago J., Henzler C., Hothorn M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science.* 2013. Vol. 341, № 6148. P. 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1242468>.
103. Santos Mendoza M., Dubreucq B., Miquel M., Caboche M., Lepiniec L. LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Lett.* 2005. Vol. 579, № 21. P. 4666–4670. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.037>.
104. Schmidt E. D., Guzzo F., Toonen M. A., de Vries S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.* 1997. Vol. 124, № 10. P. 2049–2062. <https://doi.org/10.1242/dev.124.10.2049>.
105. Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell.* 2000. Vol. 100, № 6. P. 635–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80700-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80700-X).
106. Sengupta S., Nag Chaudhuri R. ABI3 plays a role in de-novo root regeneration from *Arabidopsis thaliana* callus cells. *Plant Signal Behav.* 2020. Vol. 15, № 9. P. 1794147. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1794147>.
107. Shani E., Salehin M., Zhang Y., Sanchez S. E., Doherty C., Wang R., Mangado C. C., Song L., Tal I., Pisanty O., Eckler J. R., Kay S. A., Pruneda-Paz J., Estelle M. Plant Stress Tolerance Requires Auxin-Sensitive Aux/IAA Transcriptional Repressors. *Curr Biol.* 2017. Vol. 27, № 3. P. 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.016>.

108. Shaul O., Montagu M. V., Inzé D. Cell cycle control in *Arabidopsis*. *Annal Bot.* 1996. Vol. 78. P. 283–288.
109. Sheng L., Hu X., Du Y., Zhang G., Huang H., Scheres B., Xu L. Non-canonical WOX11-mediated root branching contributes to plasticity in *Arabidopsis* root system architecture. *Development.* 2017. Vol. 144, № 17. P. 3126–3133. <https://doi.org/10.1242/dev.152132>.
110. Shin S. Y., Choi Y., Kim S.-G., Park S.-J., Moon K.-B., Kim H.-S., Jeon J. H., Cho H. S., Lee H.-J. Submergence promotes auxin-induced callus formation through ethylene-mediated post-transcriptional control of auxin receptors. *Mol. Plant.* 2022. Vol. 15, № 12. P. 1947–1961. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.11.001>.
111. Snipes S. A., Rodriguez K., DeVries A. E., Miyawaki K. N., Perales M., Xie M., Reddy G. V. Cytokinin stabilizes WUSCHEL by acting on the protein domains required for nuclear enrichment and transcription. *PLOS Genet.* 2018. Vol. 14, № 4. e1007351. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007351>.
112. Srinivasan C., Liu Z., Heidmann I., Supena E. D., Fukuoaka H., Joosen R., Lambalk J., Angenent G., Scorza R., Custers J. B., Boutilier K. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta.* 2007. Vol. 225, № 2. P. 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0358-1>.
113. Stone S. L., Kwong L. W., Yee K. M., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, № 20. P. 11806–11811. <https://doi.org/10.1073/pnas.201413498>.
114. Sugiyama M. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. *International Review of Cytology.* 2000. Vol. 196. P. 67–84. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(00\)96002-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(00)96002-9).
115. Tao Z., Hu H., Luo X., Jia B., Du J., He Y. Embryonic resetting of the parental vernalized state by two B3 domain transcription factors in *Arabidopsis*. *Nat Plants.* 2019. Vol. 5, № 4. P. 424–435. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0402-3>.
116. Teale W. D., Paponov I. A., Palme K. Auxin in action: Signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 11. P. 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>.
117. Thakare D., Tang W., Hill K., Perry S. E. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol.* 2008. Vol. 146, № 4. P. 1663–1672. <https://doi.org/10.1104/pp.108.115832>.
118. Tian R., Paul P., Joshi S., Perry S. Genetic activity during early plant embryogenesis. *Biochemical Journal.* 2020. Vol. 477. P. 3743–3767. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190161>.
119. Tsuwamoto R., Yokoi S., Takahata Y. *Arabidopsis* EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Mol Biol.* 2010. Vol. 73, № 4. P. 481–492. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9634-3>.
120. Twajj B. M., Jazar Z. H., Hasan M. N. Trends in the Use of Tissue Culture, Applications and Future Aspects. *Int. J Plant Biol.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 8385. <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>.
121. Uddenberg D., Abrahamsson M., von Arnold S. Overexpression of PaHAP3A stimulates differentiation of ectopic embryos from maturing somatic embryos of Norway spruce. *Tree Genet Genomes.* 2016. Vol. 12. P. 18. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0974-2>.
122. Waki T., Kiki T., Watanabe R., Hashimoto T., Nakajima K. The *Arabidopsis* RWP-RK Protein RKD4 Triggers Gene Expression and Pattern Formation in Early Embryogenesis. *Curr Biol.* 2011. Vol. 21, № 15. P. 1277–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.001>.
123. Wan Q., Zhai N., Xie D., Liu W., Xu L. WOX11: The founder of plant organ regeneration. *Cell Regen.* 2023. Vol. 12, № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13619-022-00140-9>.
124. Wang B., Chu J., Yu T., Xu Q., Sun X., Yuan J., Xiong G., Wang G., Wang Y., Li J. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. Vol. 112, № 15. P. 4821–4826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503998112>.
125. Wang F.-X., Shang G.-D., Wu L.-Y., Xu Z.-G., Zhao X.-Y., Wang J.-W. Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis. *Dev Cell.* 2020. Vol. 54. P. 742–757. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.003>.
126. Wang X., Niu Q.-W., Teng C., Li C., Mu J., Chua N.-H., Zuo J. Overexpression of PGA37/MYB118 and MYB115 promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 2009. Vol. 19, № 2. P. 224–235. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.276>.
127. White D., Woodfield D., Caradus J. Mortal: A Mutant of White Clover Defective in Nodal Root Development. *Plant Physiol.* 1998. Vol. 116, № 3. P. 913–921. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.913>.
128. Wickramasuriya A. M., Dunwell J. M. Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*. *Bmc Genom.* 2015. Vol. 16, № 1. P. 301. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1504-6>.
129. Winkelmann T. Somatic versus zygotic embryogenesis: Learning from seeds. *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1359. P. 25–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2.
130. Wójcik A. M., Gaj M. D. miR393 contributes to the embryogenic transition induced *in vitro* in *Arabidopsis* via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta.* 2016. Vol. 244, № 1. P. 231–243. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2505-7>.
131. Wójcik A. M., Nodine M. D., Gaj M. D. miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2017. Vol. 8. P. 2024. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02024>.
132. Wójcik A. M., Wójcikowska B., Gaj M. D. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21. P. 1333. <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>.
133. Wójcikowska B., Gaj M. D. Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 2017. Vol. 36, № 6. P. 843–858. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2114-3>.
134. Wójcikowska B., Wójcik A. M., Gaj M. D. Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 7. P. 2307. <https://doi.org/10.3390/ijms21072307>.
135. Wu L.-Y., Shang G.-D., Wang F.-X., Gao J., Wan M.-C., Xu Z.-G., Wang J.-W. Dynamic chromatin state profiling reveals regulatory roles of auxin and cytokinin in shoot regeneration. *Dev Cell.* 2022. Vol. 57, № 4. P. 526–542. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.019>.
136. Yang Z., Li C., Wang Y., Zhang C., Wu Z., Zhang X., Liu C., Li F. GhAGL15s, preferentially expressed during somatic embryogenesis, promote embryogenic callus formation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol Genet Genomics.* 2014. Vol. 289, № 5. P. 873–883. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0856-y>.
137. Yu J., Liu W., Liu J., Qin P., Xu L. Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture. *Front Plant Sci.* 2017. Vol. 8. P. 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01385>.
138. Zhang S., Williams-Carrier R., Jackson D., Lemaux P. G. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during *in vitro* axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta.* 1998. Vol. 204, № 4. P. 542–549. <https://doi.org/10.1007/s004250050289>.

139. Zhang Z., Tucker E., Hermann M., Laux T. A molecular framework for the embryonic initiation of shoot meristem stem cells. *Dev Cell*. 2017. Vol. 40, № 3. P. 264–277. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.002>.
140. Zheng Q., Zheng Y., Ji H., Burnie W., Perry S. E. Gene regulation by the AGL15 transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. *Plant Physiol*. 2016. Vol. 172, № 4. P. 2374–2387. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00564>
141. Zheng W., Zhang X., Yang Z., Wu J., Li F., Duan L., Liu C., Lu L., Zhang C., Li F. AtWUSCHEL promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. *PLoS ONE*. 2014, Vol. 9, № 1. e87502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087502>
142. Zheng Y., Ren N., Wang H., Stromberg A. J., Perry S. E. Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-like15. *Plant Cell*. 2009. Vol. 21, № 9. P. 2563–2577. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068890>.
143. Zhu S.-P., Wang J., Ye J.-L., Zhu A.-D., Guo W.-W., Deng X.-X. Isolation and characterization of LEAFY COTYLEDON 1-LIKE gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2014. Vol. 119, № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0509-1>.
144. Zuo J., Niu Q. W., Frugis G., Chua N. H. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J*. 2002. Vol. 30, № 3. P. 349–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01289.x>.

GENETIC CONTROL OF PLANT MORPHOGENESIS IN *IN VITRO* CULTURE

O. V. Dubrovna, S. I. Mykhalska, A. H. Komisarenko

Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, St. Ukraine 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

Plant morphogenesis is the result of complex interactions of genetic, epigenetic and hormonal factors that determine the development of cells and tissues in *in vitro* culture. In recent decades, basic research has greatly advanced the understanding of the genetic mechanisms that control key processes of morphogenesis, such as callusogenesis, somatic embryogenesis, and *de novo* organogenesis. It was found that certain structural and regulatory genes play a crucial role in reprogramming cells to a totipotent state, where they are able to form various morphological structures. Hormones, such as auxins and cytokinins, contribute to the induction of these processes by changing the expression of genes responsible for division, differentiation and other aspects of morphogenesis. The literature review presents modern ideas on genetic control of morphogenesis in plant culture *in vitro*. A wide range of key genes that determine callus formation is given; participate in somatic embryogenesis and enhancement of the somatic embryogenic response; involved in the ectopic formation of somatic embryos or meristems; control *de novo* organogenesis and participate in hormone signal transduction. The interaction of various transcription factors, which participate in the induction of morphogenesis and are involved in the signaling pathway of hormones, is shown.

Keywords: morphogenesis, genetic control, callusogenesis, somatic embryogenesis, *de novo* organogenesis.