

**ВЛИЯНИЕ СРОКОВ ПОСЕВА РАСТЕНИЙ-ДОНОРОВ И КОНЦЕНТРАЦИИ
2,4-Д НА ЧАСТОТУ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОДУКТИВНЫХ ПЫЛЬНИКОВ ЯЧМЕНЯ
ОБЫКНОВЕННОГО (*HORDEUM VULGARE* L.) В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ
IN VITRO**

^{1,2}К.И. Попова, младший научный сотрудник, аспирант

^{1,2}Я.С. Скрыбин, младший научный сотрудник, аспирант

¹П.А. Лях, младший научный сотрудник

¹Н.В. Петраш, младший научный сотрудник

¹Сибирский НИИ растениеводства и селекции – филиал
ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный аграрный
университет, Новосибирск, Россия

E-mail: popova.k.i@mail.ru

Ключевые слова: ячмень обыкновенный, *Hordeum vulgare* L., дигаплоиды, культура пыльников, in vitro, биотехнология, андроклиния, андрогенез, удвоенные гаплоиды

Реферат. Создание дигаплоидных линий сельскохозяйственных растений является трудоемким, но важным этапом получения сортов в современной селекции растений, который позволяет существенно ускорить процесс создания новых сортов ячменя обыкновенного и других сельскохозяйственных культур. Дигаплоиды ячменя получают преимущественно с помощью культуры пыльников и культуры микроспор. Мы отдали предпочтение культуре пыльников in vitro. В настоящем исследовании установлено влияние климатических факторов при выращивании растений-доноров на выход продуктивных пыльников при разных сроках посева и определены более стабильные сорта, которые имели высокий выход продуктивных пыльников вне зависимости от срока посева (Сигнал, Лауреате и Эйфель), а также сорта, которые при первом и третьем сроке посева показали наибольшее количество образования эмбриоподобных структур (Зу Сурен, Зу Заза) и сорта, которые при втором сроке посева имели высокую частоту образования продуктивных пыльников (Ача, Эксплоер). Изучено влияние разной концентрации 2,4-Д в среде N6 на частоту эмбриогенеза и выход продуктивных пыльников. В результате данного исследования нами было установлено, что разная концентрация 2,4-Д (1 мг/л и 2 мг/л) не оказывала достоверно значимого влияния на частоту образования продуктивных пыльников у всех изученных сортов. Изучая способность сортов к эмбриогенезу, установили, что все образцы давали положительный ответ в культуре пыльников, однако сорт Зу Сурен имеет достоверно более низкий выход продуктивных пыльников относительно образцов Сигнал и Ача. В результате корреляционного анализа выявлена тесная связь длины трубки колоса растений-доноров и частоты образования продуктивных пыльников ($r = -0,69$), что связано с развитием оптимальной фазы микроспор для индукции андрогенеза в пыльниках, извлеченных из трубки колоса со средней длиной 6 см. Данная информация может значительно ускорить отбор растений-доноров, однако рекомендуется подтверждать стадию развития микроспор микроскопически для каждого нового используемого сорта.

INFLUENCE OF SOWING DATES OF DONOR PLANTS AND 2,4-D CONCENTRATION ON THE FREQUENCY OF FORMATION OF PRODUCTIVE ANTHERS OF COMMON BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) IN ANTHER CULTURE, IN VITRO

^{1,2} K.I. Popova, Junior Researcher, PhD student

^{1,2} J.S. Skryabin, Junior Researcher, PhD Student

¹ P.A. Lyakh, Junior Researcher

¹ N.V. Petrash, Junior Researcher

¹ Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Siberian Branch of ICG,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Keywords: common barley, *Hordeum vulgare* L., digaploids, anther culture, in vitro, biotechnology, androcline, androgenesis, doubled haploids

Abstract. *Creating dihaploid lines of agricultural plants is a labour-intensive but essential step in variety production in modern plant breeding. This stage allows significantly accelerate the process of creating new varieties of common barley and other crops. Barley digaploids are produced mainly by anther culture and microspore culture. The authors preferred anther culture in vitro. In the present study, the influence of climatic factors in the cultivation of donor plants on the yield of productive anthers at different sowing dates was established. The authors also identified the more stable cultivars with a high anther production regardless of sowing date (Signal, Laureate and Eifel). Varieties showed the highest number of embryo-like structures formation at the first and third sowing dates (Zu Suren, Zu Zaza); and sorts with a high rate of productive anther formation at the second sowing date (Acha, Exploer) were identified. Different concentrations of 2,4-D in N6 medium on the frequency of embryogenesis and yield of productive anthers were studied. As a result of this study, the authors found that different concentrations of 2,4-D (1 mg/l and two mg/l) had no significant effect on the formation frequency of productive anthers in all the varieties studied. When the embryogenesis capacity of the cultivars was reviewed, all the samples were found to be positive in anther culture. However, the array Zu Suren had a significantly lower effective anthers yield than the samples Signal and Acha. As a result of correlation analysis, the authors found a close relationship between the length of the ear tube of donor plants and the frequency of formation of productive anthers ($r = -0.69$). A close relationship with the development of optimal microspore phase for the induction of androgenesis in anthers extracted from the ear tube with an average length of 6 cm was determined. This information can significantly speed up the selection of donor plants, but it is recommended to confirm the stage of microspore development microscopically for each new cultivar used.*

Ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) является широко возделываемой зерновой культурой. По производству ячменя в мире лидируют Россия, Канада и США. Более 65% зерна ячменя идёт на кормовые цели, 6–8% – на пивоварение и 15% – на продовольственные нужды [1]. Перспективным направлением является использование ячменя обыкновенного в качестве фиторемедиатора для очистки почв от цинка [2].

Селекционный процесс многих культур, в том числе и ячменя, сопряжён с рядом трудностей, возникающих на фоне совокупности разнообразия природно-климатических условий и требований, предъявляемых к сорту [3]. Биотехнология как метод широко используется в селекции растений. Получение дигаплоидов ячменя в культуре пыльников позволяет значительно ускорить процесс создания новых сортов, обеспечивая исследователей стабильным исходным материалом [4]. Так как

ячмень обыкновенный имеет большой размер генома (> 5,1 гб (гигабазы)), данная технология весьма полезна при исследованиях генетического характера, делая процесс секвенирования и картирования менее трудоёмким [5].

Дигаплоиды – гаплоидные растения, представляющие собой гомозиготные организмы, имеющие двойной набор одинаковых хромосом. Эта особенность дигаплоидных форм позволяет изучить рецессивные признаки, которые обычно не проявляются у гетерозиготных растений [6, 7]. Дигаплоиды ячменя широко используются для поиска молекулярных маркеров и построения генетических карт [8–10]. Метод культивирования изолированных пыльников достаточно прост в освоении и требует минимальных затрат, а также данная технология отличается высокой ценностью, т. к. гомозиготные линии позволяют накапливать в одном генотипе необходимые для селекционера гены от разных родителей (пирамидирование генов) [11, 12]. В конечном счете использование культуры пыльников позволяет значительно ускорить селекцию ячменя обыкновенного и других сельскохозяйственных растений.

Впервые дигаплоид ячменя был получен в 1970 г. в условиях *in vivo* в результате межвидового скрещивания ячменя обыкновенного (*H. vulgare*) и ячменя луковичного (*H. bulbosum*) [13]. В культуре *in vitro* впервые дигаплоид ячменя был получен из пыльников в 1973 г. [14], затем в 1976 г. из семяпочки [15] и в 1991 г. из изолированных микроспор [16].

В настоящий момент дигаплоиды ячменя преимущественно получают с помощью методов *in vitro*: культура пыльников, культура изолированных микроспор, завязей и семяпочек; из методов *in vivo* используют элиминирование хромосом [4, 8].

Для получения дигаплоидов ячменя с помощью культуры пыльников *in vitro* необходимо осуществить три основных этапа: культивирование пыльников на индукционной среде до образования эмбриоподобных структур; выращивание проростков, полученных из эмбриоподобных структур на регенерационной

среде; адаптация и дальнейший рост зеленых проростков в условиях *ex vitro* [11, 17].

На эффективность культивирования пыльников и получения зеленых проростков могут оказывать влияние условия выращивания растений-доноров, методы предобработки пыльников, состав питательной среды на стадии индукции и регенерации, условия культивирования проростков и эмбриоподобных структур. Однако основной вклад в образование зеленых проростков и эмбриоподобных структур, а следовательно, в эффективность метода культивирования пыльников, вносит генотип растения-донора [11, 18, 19].

Основной проблемой культуры пыльников у растений, принадлежащих роду злаковых, является формирование большого количества хлорофилл-дефектных проростков (альбиносов), которые являются нежизнеспособными в условиях *ex vitro* [20–23]. Еще один минус культуры пыльников – образование растений с различной степенью пloidности: ди-, поли-, анеуплоидные и гаплоидные. Последние формы нередко оказываются стерильными, но после обработки проростков колхицином происходит удвоение числа хромосом, в результате чего возникают фертильные гомозиготы [13, 20, 24–26].

Вышеперечисленные проблемы применения гаплоидных технологий связаны с недостаточной изученностью данного метода.

В связи с этим достаточно актуальной считается задача разработки высокопродуктивной технологии получения дигаплоидов ячменя, несущих целевые гены, которые могут быть использованы для осуществления селекционных программ. Для этого необходимо изучить различные факторы и подобрать оптимальные условия для выращивания растений-доноров и культивирования изолированных пыльников для получения большого числа эмбриоподобных структур. В частности, необходимо подобрать оптимальное соотношение гормонов и компонентов регенерационной и индукционной среды.

Цель исследования заключается в изучении особенностей влияния разных сроков посева растений-доноров ячменя обыкновен-

ного, а также различных концентраций 2,4-Д в индукционной среде на образование эмбриоподобных структур.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве материала для проведения исследования были использованы 7 сортов ярового ячменя отечественной и иностранной селекции: Сигнал (Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Институт цитологии и генетики СО РАН), Ача (Сибирский НИИ растениеводства и селекции), Лауреате (Syngenta Crop Protection Ag, Швейцария), Эйфель (Secobra Recherches, Франция), Зу Сурен (Saaten-union GMBH), Зу Заза (Saaten-Union GMBH), Эксплоер (Secobra Recherches, Франция). Включенные в работу сорта являются пивоваренными. Материал был любезно предоставлен Е.А. Салиной (Институт цитологии и генетики СО РАН). В работу были включены также гибриды ярового ячменя первого поколения (F_1), полученные от Ю.Н. Григорьева (Сибирский НИИ растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН).

В качестве факторов эксперимента учитывались совокупность условий произрастания, складывавшихся в определенный срок посева, и концентрация гормона 2,4-Д в индукционной среде.

Растения-доноры для отбора пыльников высевали в полевых условиях с учетом требований методики полевого опыта в 2020 г. [27]. Норма высева – 530 шт/м². Ширина междурядий – 15 см. Посев проведен в три срока с периодичностью 15 дней начиная с 18 мая. Площадь делянки – 50 м². Участок размещался на опытном поле СибНИИРС – филиала ИЦиГ СО РАН, расположенном в условиях центральной лесостепи Приобья на типичной для зоны почве – черноземе выщелоченном среднесуглинистом. Содержание гумуса в слое 0–30 см – 4,4%, общего азота – 0,34, валового фосфора – 0,30%, подвижного фосфора и калия (по Чирикову) – 29 и 13 мг/100 г по-

чвы соответственно, pH водной вытяжки 6,7–6,8 [28].

Метеорологические условия 2020 г. характеризовались неравномерной тепло- и влагообеспеченностью. В мае отмечали обилие тепла (15,5 °С, норма – 10,9 °С) и влаги (54 мм, норма – 37 мм). Июнь сопровождался недобором тепла (16,6 °С, норма – 16,9 °С) и дефицитом осадков – уровень в 2,3 раза ниже нормы (55 мм). Июль был теплым, количество осадков (85 мм) превышало среднемноголетние значения в 1,4 раза. В августе приход тепла и атмосферной влаги был на 2,4 °С и 15 мм соответственно выше нормы (16,2 °С и 67 мм).

Материал отбирали рано утром по достижении микроспорами одноядерной стадии. Колосья помещали в сосуды с дистиллированной водой и выдерживали в холодо-термостате при $t = 4^\circ\text{C}$ в течение 7–17 дней.

Стерилизацию материала проводили 98 %-м этанолом. Пыльники использовали из средней части колоса. В качестве индукционной среды применялась агаризованная среда CHU N6 с различной концентрацией 2,4-Д (1 и 2 мг/л), приготовленная по известной методике [29] с измененным содержанием мальтозы (30 г/л), мио-инозитола (100 мг/л) и добавлением сахарозы (60 г/л).

Культивирование гибридов проводили в среде CHU N6 с составом, описанным выше, но с одним вариантом концентрации 2,4-Д – 1 мг/л. Витамины добавляли после автоклавирования, в стерильных условиях ламинарного бокса. Пыльники культивировали в чашках Петри при температуре 26 °С в темноте.

Эмбриоподобные структуры, достигшие в диаметре 1–2 мм, сначала переносили на регенерационную среду Гамборга (B5) с добавлением сахарозы (30 г/л), кинетина (0,5 мг/л), НУК (0,5 мг/л) и агара (5 г/л), затем на регенерационную среду 190-2, содержащую НУК (0,5 мг/л) и кинетин (0,5 мг/л) с последующим увеличением последнего до 1,5 мг/л при отсутствии регенерации. Культивирование проводилось в климокамере при температуре 22 °С и влажности 70 % при непрерывном освещении [11].

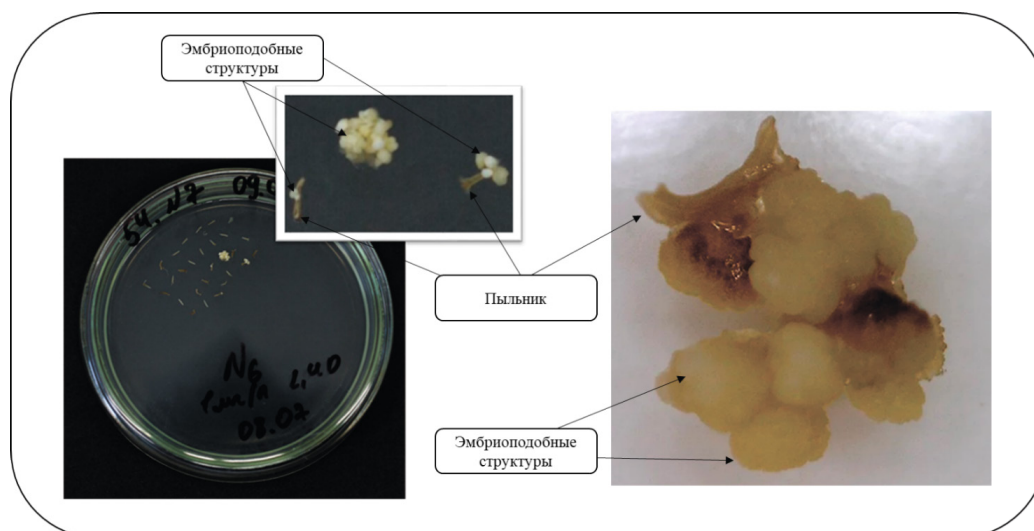


Рис. 1. Эмбриоподобные структуры, образовавшиеся в результате культивирования пыльников ячменя обыкновенного in vitro

Figure 1. Embryo-like structures resulting from the cultivation anthers of *Hordeum vulgare* in vitro

За частоту образования продуктивных пыльников принимается отношение сформировавшихся структур к 100 культивированным пыльникам; частота образования проростков – отношение образовавшихся проростков к числу продуктивных пыльников.

Полученные данные обрабатывали статистически с применением пакета программ Statistica, проводили корреляционный анализ и T-test [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На индукционной среде единичные эмбриоподобные структуры начали формироваться к 27-му дню, массовое же их появление отмечалось на 30-й день с начала культивирования пыльников (рис. 1).

В результате эксперимента установлено, что все сорта проявили способность к образованию эмбриоподобных структур в двух вариантах концентрации 2,4-Д в среде. Было выявлено, что изученные дозы 2,4-Д не оказали существенного влияния ни на число продуктивных пыльников, ни на число проростков (таблица).

Сравнительный анализ сортов по способности к андрогенезу показал достоверные различия сорта Зу Сурен с сортами Ача и Сигнал

по частоте образования продуктивных пыльников. Зу Сурен отличался меньшим их количеством. Существенных различий между остальными сортами не установлено.

В целом по опыту была получена достаточно высокая частота эмбриогенеза (от 3,5 % у сорта Зу Сурен до 11,8 у сорта Сигнал).

Была отмечена разница в частоте образования эмбриоструктур при сравнении различных сроков посева донорных растений. Метеорологические условия, формировавшиеся в период развития растений, в существенной степени влияют на выход эмбриоподобных структур. Ранее о наличии такой тенденции указывалось в работах Л.А. Першиной [11].

Сравнение частоты образования продуктивных пыльников при различных сроках посева показало, что образование эмбриоподобных структур идёт неравномерно. Так, сорта Сигнал, Лауреате и Эйфель имели схожий результат вне зависимости от срока посева. Частота образования продуктивных пыльников составила 11,4 % при первом сроке посева, 12,2 – при втором и 10,2 % при третьем. Ача и Эксплоер показали лучшие результаты при втором сроке посева. Зу Сурен, Зу Заза показали лучшую частоту образования продуктивных пыльников при первом и третьем сроках посева (рис. 2).

Влияние различных концентраций 2,4-Д на эффективность андрогенеза ячменя обыкновенного
Effect of different concentrations of 2,4-D on the efficiency of androgenesis of *Hordeum vulgare*

Генотип	Содержание в среде 2,4-Д (мг/л)	Число культивированных пыльников	Продуктивные пыльники		Всего проростков	
			Число	Частота, %	Число	Частота, %
Сигнал	1	354	41	11,6	2	4,9
	2	256	31	12,1	6	19,35
	Всего	610	72	11,8	8	11,1
Ача	1	94	7	7,44	1	14,3
	2	195	11	5,6	1	9,1
	Всего	289	18	6,2	2	11,1
Лауреате	1	382	35	9,2	0	0
	2	524	39	7,4	1	2,6
	Всего	906	74	8,2	1	1,35
Эйфель	1	279	19	6,8	0	0
	2	75	12	16	1	8,3
	Всего	354	31	8,7	1	3,2
Зу Сурен	1	67	2	3	1	50
	2	163	6	3,7	0	0
	Всего	230	8	3,5*	1	12,5
Зу Заза	1	153	17	11,1	7	41,2
	2	255	18	7,1	0	0
	Всего	408	35	8,6	11	31,4
Эксплоер	1	207	17	8,2	3	17,6
	2	271	30	11,1	10	33,3
	Всего	478	47	9,8	13	27,6
F710		143	12	8,39	7	58,33
F714		162	21	12,96	0	0
F728		56	5	8,93	0	0

Примечание. Разница по сравнению с показателями сорта Сигнал и Ача достоверна при $P < 0,05$.

Note. The difference as compared to the values of varieties Signal and Acha is significant at $p < 0,05$

Полученный результат говорит о том, что условия выращивания растений-доноров оказывают большое влияние на выход продуктивных пыльников, при этом некоторые генотипы (Сигнал, Лауреате и Эйфель) являются более стабильными в изменяющихся условиях развития растений. Низкий выход продуктивных пыльников у сортов Зу Сурен и Зу Заза при втором сроке посева можно связать с неблагоприятными гидротермическими условиями июня, на который пришлось большая часть фаз развития растений.

При сравнении гибридной популяции была установлена обратная корреляция расстояния от верхнего междоузлия до влагалища флагового листа (трубки колоса) с частотой образования продуктивных пыльников

($r = -0,69$), что обусловлено тем, что колосья, находящиеся в трубке определенной длины (от 4 до 8 см), проходят необходимый для индукции эмбриогенеза этап – однадерную стадию развития микроспор в пыльниках (рис. 3).

Установленная закономерность может быть использована для ускорения отбора растений-доноров, однако данная тенденция может сильно отличаться от установленной в различных условиях выращивания и сильно зависит от генотипа. Для большей точности рекомендуется подтверждать стадию развития микроспор микроскопически.

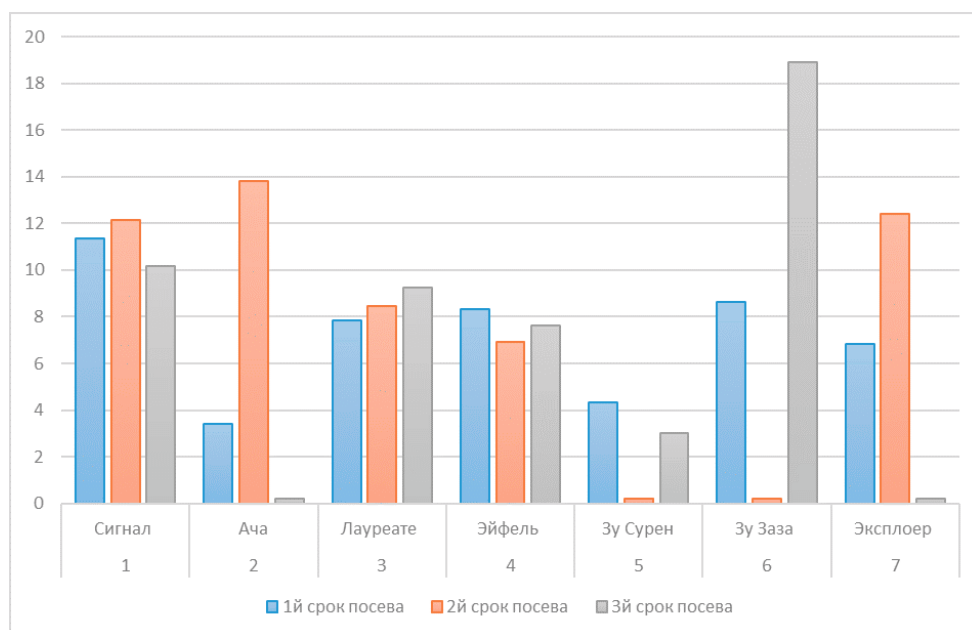


Рис. 2. Влияние сроков посева на частоту образования продуктивных пыльников ячменя обыкновенного
Figure 2. Effect of sowing dates on the rate of formation of productive anthers of *Hordeum vulgare*

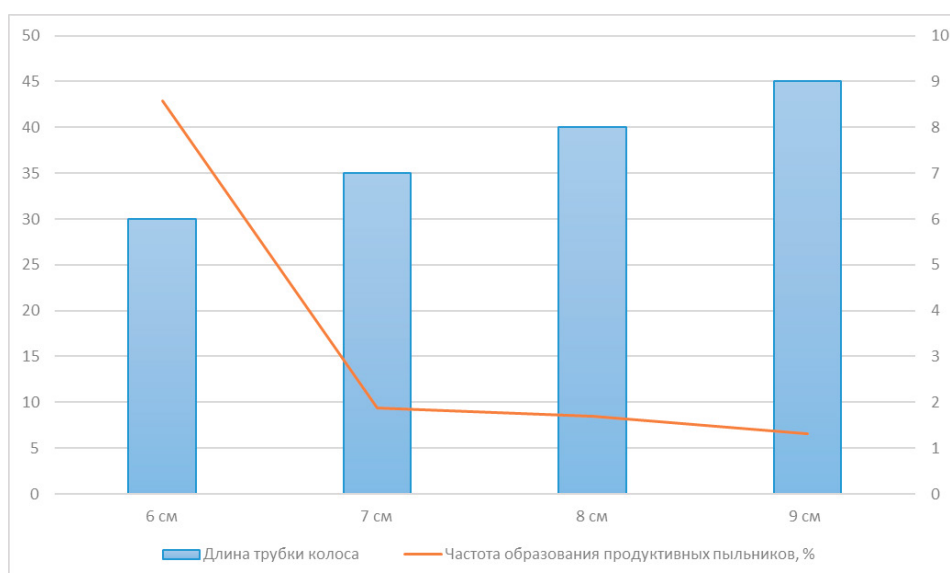


Рис. 3. Взаимосвязь длины трубки колоса и частоты образования продуктивных пыльников у гибридов F710, F714, F728 ячменя обыкновенного
Figure 3. Relationship between ear tube length and rate of producing productive anthers in *Hordeum vulgare* hybrids F710, F714, F728.

ВЫВОДЫ

1. На выход эмбриоподобных структур оказывают влияние факторы окружающей среды, воздействующие на растения-доноры при выращивании.

2. Не установлено достоверных различий между концентрациями 2,4-Д 1 и 2 мг/л по числу продуктивных пыльников и проростков.

3. Все изученные сорта проявляли способность к эмбриогенезу, однако с различной интенсивностью, что говорит о доле влияния генотипа на андрогенез.

4. Сорт Зу Сурен имел достоверно меньше продуктивных пыльников по сравнению с сортами Ача и Сигнал.

5. Обнаружена корреляция между длиной трубки колоса и продуктивностью андрогенеза у гибридов F_1 ячменя, что указывает на то, что данный показатель может

быть использован в качестве ориентира для установления стадии микроспор при отборе образцов с растений-доноров.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИЦиГ СО РАН (проект № АААА-А19-119101790002-1).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Современные проблемы в селекции ячменя по качеству зерна* / М.М. Копусь, Е.Г. Филиппов, Н.Г. Игнатьева, Н.А. Матвиевская // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2004. – № 3(3). – С. 43–46.
2. *Неведров Н.П., Проценко Е.П., Кузнецов А.Е.* Использование ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* (L.) в целях фиторемедиации // Теоретические и практические аспекты естественных и математических наук. – 2012. – № 1. – С. 115–119.
3. *Аниськов Н.И.* Селекция ячменя в Западной Сибири // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 1. – С. 24–26.
4. *In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges* / A. Watts [et al.] // Plant Molecular Biology Reporter. – 2018. – N 36. – P. 685–694.
5. *Bennett M.D., Smith J.B.* Nuclear DNA amounts in angiosperms // Nature. – 1976. – N 491. – P. 711–716.
6. *In vitro androgenesis of wheat: from fundamental to practical application* / B. Barnabas [et al.] // Euphytica. – 2001. – Vol. 119. – P. 211–216.
7. *Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А.* Влияние Lr19-транслокации на андрогенез in vitro и наследование устойчивости к листовой ржавчине в популяциях DH3-линий и F2 гибридов мягкой пшеницы // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 9. – С. 1224–1228.
8. *Удвоенные гаплоиды ячменя и их использование в генетико-селекционных исследованиях* / Я.В. Мишуткина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.
9. *Devaux P., Kilian A., Kleinhofs A.* Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived, doubled haploid populations // Mol. Gen. Genet. – 1995. – Vol. 49. – P. 600–608.
10. *Genetic markers for doubled haploid response in barley* / X. Chen [et al.] // Euphytica. – 2007. – Vol. 158. – P. 287–294.
11. *Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций* / Л.А. Першина [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 40–49.
12. *Toward a theory of marker-assisted pyramiding* / B. Servin [et al.] // Genetics. – 2004. – Vol. 168. – P. 513–523.
13. *Kasha K.J., Kao K.N.* High frequency haploid production in barley (*H. vulgare* L.) // Nature. – 1970. – Vol. 225. – P. 874–876.
14. *Clapham D.* Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro // Pflanzenzücht. – 1973. – Vol. 69. – P. 142–155.
15. *San Noeum L.H.* Haploïdes *Hordeum vulgare* L par culture in vitro d'ovaires non fecondés // Ann Amélior Plant. – 1976. – Vol. 26. – P. 751–783.
16. *Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods* / K.N. Kao [et al.] // Plant Cell Reports. – 1991. – Vol. 9. – P. 595–601.
17. *Henry Y., Buyser J.* Effect of the 1B/1R translocation on anther-culture ability in wheat // Plant Cell Rep. – 1985. – Vol. 4. – P. 307–310.
18. *Anther culture response of F1 durum × bread wheat hybrids after colchicines* / M. Tersì [et al.] // Plant Breed. – 2006. – Vol. 125. – P. 457–460.

19. *Aneuploidy* among androgenic progeny of hexaploid triticales (\times Triticisecale Wittmack) / S. Oleszczuk [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30. – P. 575–586.
20. Devaux P., Kasha K.J. Overview of barley Doubled Haploid Production // *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* – 2009. – Vol. 3. – P. 47–63.
21. *Doubled* haploid in crop plants: a manual / M. Maluszynski [et al.] // Kluwer Academic Publishers. – 2003. – Vol. 1. – P. 1–4.
22. Szarejko I., Kasha K.J. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley // *Cereal Res Commun.* – 1991. – Vol. 19. – P. 219–237.
23. *Progress* in doubled haploid technology in higher plants / M. Wedzony [et al.] // *Advances in haploid production in higher plants.* – 2009. – Chapter 1. – P.1–33.
24. *Culture* conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods / K.N. Kao [et al.] // *Plant Cell Reports.* – 1991. – Vol. 9. – P. 595–601.
25. Kasha K.J. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants // *Haploids in crop improvement II* // Springer, Heidelberg. – 2005. – Vol. 20. – P. 123–152.
26. Kasha K.J. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments // *Can. J. Genet. Cytology.* – 1975. – Vol. 17. – P. 573–583.
27. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агрохимиздат, 1985. – 351 с.
28. Ресурсоэнергосберегающие технологии возделывания яровой пшеницы в Новосибирской области: метод. пособие / РАСХН. Сиб. отд-ние. СибНИИЗХим. – Новосибирск, 2000. – 48 с.
29. Ohnoutkova L., Vlcko T., Mentewab A. Barley anther culture // *Methods and Protocols* / W.A. Harwood., Ed. – Springer Science & Business Media: New York. USA, 2019. – P. 37–52.
30. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 294 с.

REFERENCES

1. Kopus' M.M., Filippov E.G., Ignat'eva N.G., Matvievskaia N.A., *Izvestiya orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2004, No. 3(3), pp. 43–46. (In Russ.)
2. Nevedrov N.P., Protsenko E.P., Kuznetsov A.E., *Teoreticheskie i prakticheskie aspekty estestvennykh i matematicheskikh nauk*, 2012, No. 1, pp. 115–119. (In Russ.)
3. Anis'kov N.I., *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2009, No. 1, pp. 24–26. (In Russ.)
4. Watts A. et al., In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges, *Plant Molecular Biology Reporter*, 2018, No. 36, pp. 685–694.
5. Bennett M.D., Smith J.B., Nuclear DNA amounts in angiosperms, *Nature*, 1976, No. 491, pp. 711–716.
6. Barnabas B. et al., In vitro androgenesis of wheat: from fundamental to practical application, *Euphytica*, 2001, Vol. 119, pp. 211–216.
7. Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N., Krupnov V.A., *Genetika*, 2004, Vol. 40, No. 9, pp. 1224–1228. (In Russ.)
8. Mishutkina Ya.V., Neskorodov Ya.B., Novokreshchenova M.G., Malakho S.G., Turaev A.M., *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, No. 5. (In Russ.)
9. Devaux P., Kilian A., Kleinhofs A., Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived, doubled haploid populations, *Mol. Gen. Genet.*, 1995, Vol. 49, pp. 600–608.
10. Chen X. et al., Genetic markers for doubled haploid response in barley, *Euphytica* 2007, Vol. 158, pp. 287–294.
11. Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P., *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2013, Vol. 17, No. 1, pp. 40–49. (In Russ.)

12. Servin B. et al., Toward a theory of marker-assisted pyramiding, *Genetics*, 2004, Vol. 168, pp. 513–523.
13. Kasha K. J., Kao K.N., High frequency haploid production in barley (*H. vulgare* L.), *Nature*, 1970, Vol. 225, P. 874–876.
14. Clapham D., Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro, *Pflanzenzücht*, 1973, Vol. 69, pp. 142–155.
15. San Noeum L.H., Haploïdes *Hordeum vulgare* L par culture in vitro d'ovaires non fecondés, *Ann Amélior Plant*, 1976, Vol. 26, pp. 751–783.
16. Kao K.N. et al., Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods, *Plant Cell Reports*, 1991, Vol. 9, pp. 595–601.
17. Henry Y., Buyser J., Effect of the 1B/1R translocation on anther-culture ability in wheat, *Plant Cell Rep.*, 1985, Vol. 4, pp. 307–310.
18. Tersì M., et al., Anther culture response of F1 durum \times bread wheat hybrids after colchicines, *Plant Breed*, 2006, Vol. 125, pp. 457–460.
19. Oleszczuk S., et al., Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (\times *Triticisecale* Wittmack), *Plant Cell Rep.*, 2011, Vol. 30, pp. 575–586.
20. Devaux P., Kasha K. J., Overview of barley Doubled Haploid Production, *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 2009, Vol. 3, pp. 47–63.
21. Maluszynski M., et al., Doubled haploid in crop plants: a manual, *Kluwe Academic Publishers*, 2003, Vol. 1, pp. 1-4.
22. Szarejko I., Kasha K.J., Induction of anther culture derived doubled haploids in barley, *Cereal Res Commun*, 1991, Vol. 19, pp. 219–237.
23. Wedzony M., et al., Progress in doubled haploid technology in higher plants, *Advances in haploid production in higher plants*, 2009, Chapter 1, pp. 1–33.
24. Kao K.N., et al., Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods, *Plant Cell Reports*, 1991, Vol. 9, pp. 595–601.
25. Kasha K.J., Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants, *Haploids in crop improvement II*, Springer, Heidelberg, 2005, Vol. 20, pp. 123–152.
26. Kasha K.J., Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments, *Can J Genet Cytology*, 1975, Vol. 17, pp. 573–583.
27. Dospekhov B.A., *Metodika polevogo opyta* (Field experiment technique), Moscow: Agrokhimizdat, 1985, 351 p.
28. *Resursoenergoberegayushchie tekhnologii vozdeleyvaniya yarovoi pshenitsy v Novosibirskoi oblasti* (Resource-saving technologies of spring wheat cultivation in the Novosibirsk region), Novosibirsk: Sib. otd-nie SibNII ZKhim, 2000, 48 p.
29. Ohnoutkova L., Vlcko T., Mentewab A., Barley anther culture, *Methods and Protocols*, W.A. Harwood, Ed., Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2019, pp. 37–52.
30. Lakin G.F., *Biometriya* (Biometrics), Moscow: Vyssh. shk., 1980, 294 p.