

ПОИСК ЭФФЕКТИВНОГО МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО ПАРАМЕТРА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО СИЛЬНОВАКУОЛИЗИРОВАННОЙ СТАДИИ МИКРОСПОР У ЯЧМЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Я. А. Блинова, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии, yana.manuhina@yandex.ru, ORCID ID: 0000-0002-3670-5876;
Д. Д. Бабина, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии, babinadd@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-2544-9667;
А. С. Ханова, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии, micenyk-anastasi@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1171-0844;
М. Ю. Король, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии, podobedmyu@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-0911-2650;
Е. В. Бондаренко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии, bev_1408@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-7937-3824

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
249035, Калужская область, г. Обнинск, шоссе Киевское, д. 1, кв. 1*

Ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) – значимая сельскохозяйственная культура, для создания новых сортов которой используются методы прикладной биотехнологии. Одним из перспективных биотехнологических подходов является получение гаплоидных растений из культуры пыльников или изолированных микроспор. Результативность этих методов на основе андроклинии зависит от фазы развития микроспор в пыльниках. Для злаков оптимальной стадией развития считается одноядерная сильновакуолизованная микроспора. С учетом трудоемкости цитологического контроля этапов формирования гаплоидных половых клеток для рутинных биотехнологических процедур необходим надежный и простой способ отбора колосьев с микроспорами на оптимальной стадии развития. В связи с этим цель данного исследования заключалась в выявлении эффективного морфометрического параметра, соответствующего сильновакуолизованной одноядерной стадии микроспор в пыльниках ячменя обыкновенного отечественных сортов Леон, Фокс 1 и Ратник и эталонного для генетической трансформации сорта Golden Promise для введения этих сортов в культуру *in vitro*. У всех исследуемых генотипов отмечен полиморфизм микроспор, обусловленный асинхронностью их развития. Наибольшее количество сильновакуолизованных микроспор зафиксировано для отечественного сорта Леон. В поиске морфометрического параметра, ассоциированного с оптимальной стадией микроспор, проанализированы следующие показатели: интервальное расстояние между флаговым и вторым листом (Ф-2л), интервальное расстояние между флаговым листом и кончиком находящегося в трубке колоса (Ф-К), длина и ширина колоса, а также рассчитан морфометрический критерий (соотношение Ф-2л:Ф-К), ранее предложенный для определения оптимальной стадии развития пыльника у ряда генотипов яровой мягкой пшеницы. Установлено, что из всех исследованных параметров стадию развития микроспор как инициальных клеток андроклинии можно определить при помощи морфометрического критерия. Однако важно помнить, что, кроме внутрисортной асинхронности формирования микроспор, существует высокая межсортная вариабельность, поэтому значения морфометрического критерия следует подбирать для каждого сорта, вводимого в биотехнологический процесс.

Ключевые слова: Ячмень обыкновенный, андрогенез, сильновакуолизованная стадия микроспор, морфометрический критерий.

Для цитирования: Блинова Я. А., Бабина Д. Д., Ханова А. С., Король М. Ю., Бондаренко Е. В. Поиск эффективного морфометрического параметра, соответствующего сильновакуолизованной стадии микроспор у ячменя обыкновенного // Зерновое хозяйство России. 2023. Т. 15, № 6. С. 29–35. DOI: 10.31367/2079-8725-2023-89-6-29-35.



SEARCH FOR AN EFFECTIVE MORPHOMETRIC PARAMETER CORRESPONDING TO THE HIGHLY VACUOLATED STAGE OF MICROSPORES IN COMMON BARLEY

Ya. A. Blinova, junior researcher of the laboratory for molecular cellular fundamentals of agricultural radiobiology, yana.manuhina@yandex.ru, ORCID ID: 0000-0002-3670-5876;
D. D. Babina, researcher of the laboratory for molecular cellular fundamentals of agricultural radiobiology, babinadd@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-2544-9667;
A. S. Khanova, researcher of the laboratory for molecular cellular fundamentals of agricultural radiobiology, micenyk-anastasi@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1171-0844;
M. Yu. Korol, researcher of the laboratory for molecular cellular fundamentals of agricultural radiobiology, podobedmyu@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-0911-2650;
E. V. Bondarenko, Candidate of Biological Sciences, leading researcher of the laboratory for molecular cellular fundamentals of agricultural radiobiology, bev_1408@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-7937-3824

Federal State Budgetary Institution "All-Russian Research Institute of Radiology and Agroecology of the National Research Center "Kurchatov Institute"
249035, Kaluga region, Obninsk, Kievskoe Sh., 1/1

Common barley (*Hordeum vulgare* L.) is an important agricultural crop, when the applied biotechnology methods are used for the development of new varieties. One of the promising biotechnological approaches is the production of haploid plants from anther culture or isolated microspores. The efficiency of these androclinium-based methods depends on the developmental phase of microspores in the anthers. For cereals, the optimal stage of development is a mononuclear, highly vacuolated microspore. Considering the labor intensity of cytological control of the stages of formation of haploid germ cells for routine biotechnological procedures, a reliable and simple method for selecting ears with microspores at the optimal stage of development is required. In this regard, the purpose of the current study was to identify an effective morphometric parameter corresponding to the highly vacuolated mononuclear stage of microspores in the anthers of common barley of domestic varieties 'Leon', 'Fox 1' and 'Ratnik' and the reference variety for genetic transformation 'Golden Promise', for the introduction of these varieties into *in vitro* culture. In all studied genotypes, there has been found polymorphism of microspores, due to the asynchrony of their development. The largest number of highly vacuolated microspores was established for the domestic variety 'Leon'. In the search for a morphometric parameter associated with the optimal stage of microspores, there have been analyzed such indicators as the interval distance between the flag leaf and the second one (F-2l), the interval distance between the flag leaf and the tip of the ear located in the tube (F-K), the length and width of the ear, and also calculated the morphometric criterion (ratio of F-2l:F-K), previously proposed to determine the optimal stage of anther development in a number of genotypes of spring bread wheat. There has been established that, of all the parameters studied, the stage of development of microspores as initial androclinium cells can be determined using a morphometric criterion. However, it is important to remember that, in addition to the intravarietal asynchrony of microspore formation, there is high intervarietal variability, therefore, the values of the morphometric criterion should be selected for each variety introduced into the biotechnological process.

Keywords: common barley, androgenesis, highly vacuolated stage of microspores, morphometric criterion.

Введение. Ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) является важной сельскохозяйственной культурой. Зерно ячменя широко используют для продовольственных, кормовых и технических целей. В период неустойчивого климата и быстро растущего населения планеты необходимо в создании новых высокоурожайных сортов, устойчивых к неблагоприятным условиям окружающей среды, выражена особенно ярко.

В выведении новых сортов и ускорении селекционного процесса значимую роль играют методы прикладной биотехнологии, с помощью которых можно получить растения с улучшенными показателями продуктивности, а также более устойчивые к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Среди биотехнологических методов в селекции самоопыляющихся культур широко используется способ получения гаплоидных растений, из которых путем спонтанного или индуцированного удвоения хромосом за короткое время можно получить гомозиготные линии удвоенных гаплоидов. В настоящее время в селекции ячменя наиболее часто применяют следующие методы получения гаплоидов: скрещивание с *H. bulbosum* (Watts et al., 2018), индукция андрогенеза в культуре пыльников (Han et al., 2021; Ohnoutkova et al., 2019) и изолированных микроспор (Дьячук и др., 2019).

Феномен андрогенеза (или андроклинии) связан с переключением пути развития спорогенных клеток с гаметофитного на спорофитный под воздействием различных стрессоров (Круглова и Никонов, 2018; Ohnoutkova et al., 2019). Смена программы развития с гаметофитной на спорофитную возможна только в случае нахождения микроспор на определенной, чувствительной к внешним воздействиям стадии развития. Для злаков подходящей для введения в культуру *in vitro* считается стадия одно-

дерной сильновакуолизированной микроспоры (Некрасова и Калинина, 2022, Ohnoutkova et al., 2019).

Подбор морфометрического параметра, соответствующего оптимальной для инокуляции *in vitro* стадии микроспор в пыльниках, является важной задачей, которая позволит упростить и ускорить технологию получения гаплоидных форм, гомозиготных линий удвоенных гаплоидов и генотипов с редактированным геномом для увеличения генетического разнообразия *H. vulgare*. В работе (Ohnoutkova et al., 2019) в качестве морфометрического параметра для отбора колосьев ячменя яровых и озимых сортов рекомендовано расстояние между флаговым и вторым листом, при котором в пыльнике будет преобладающее количество микроспор на оптимальной стадии. Для отечественных сортов ячменя такой параметр пока не предложен.

Таким образом, цель данного исследования заключалась в выявлении эффективного морфометрического параметра, соответствующего одноядерной сильновакуолизированной стадии микроспор в пыльниках ячменя отечественных сортов Леон, Фокс 1, Ратник и сорта Golden Promise (страна происхождения – Великобритания) для упрощения отбора колосьев при введении этих сортов в культуру *in vitro* методом андроклинии.

Материалы и методы исследований.

В качестве объекта исследования использовали ячмень обыкновенный четырех сортов: сорт Golden Promise (GP) – яровой, эталонный для генетической трансформации (включен в национальный реестр Великобритании в 1968 г. (Han et al., 2021)) и сорта селекции ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской» (г. Зерноград) – яровые Леон и Ратник и озимый сорт Фокс 1.

Семена проращивали в чашках Петри при комнатной температуре в течение трех

суток. Для формирования дренажной системы на дно горшка (5 л) помещали 2 слоя марлевой ткани и устилали 2–3-сантиметровым слоем керамзита. Поверх керамзита засыпали универсальный грунт (Terra Vita Живая земля, Неваторф), доводили массу субстрата до 2 кг. Далее грунт проливали дистиллированной водой до полного смачивания. Проросшие семена заглубляли на 1,5–2 см в грунт по 2 проростка на горшок. Донорные растения выращивали в условиях фитотронного блока в режиме освещения день/ночь 14/10 ч, около 440 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ фотосинтетически активного излучения на уровне верха растений (про-

изводитель RDM-Led, Россия) при температуре 21/17 °С и 50 %-й влажности.

Колосья отбирали на стадии удлинения влагалища флагового листа, регистрируя расстояние между лигулой флагового и подфлагового (второго) листьев (Ф-2л), расстояние между основанием флагового листа и кончиком находящегося в трубке колоса (Ф-К) (рис. 1), а также длину колоса и ширину трубки в месте расположения колоса. Последний параметр не измерялся у шестирядного сорта Фокс 1 (из-за отсутствия необходимости в сравнительном анализе с остальными сортами, колосья которых двурядные).

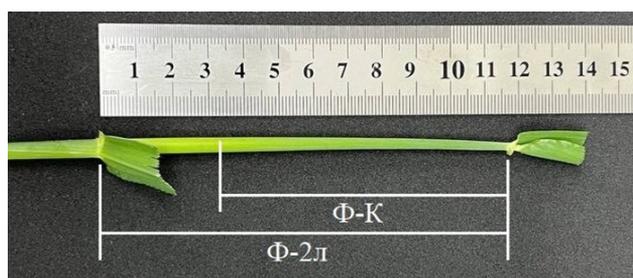


Рис. 1. Стадия удлинения влагалища флагового листа.

Интервал Ф-2л (см) – расстояние между основанием флагового и второго листьев, Ф-К (см) – расстояние между основанием флагового листа и кончиком находящегося в трубке колоса

Fig. 1. Elongation stage of a split leaf sheath.

Interval F-2l (cm) – the distance between a flag leaf base and second leaves, F-K (cm) – the distance between a flag leaf base and the tip of the ear located in the tube

Срезанные колосья хранили в дистиллированной воде в темноте при 4 °С (не более 48 ч). Для определения стадии развития микроспор колос обрабатывали 75%-м спиртом и в стерильных условиях извлекали из середины колоса 1–2 цветка. Цветки помещали на предметное стекло и готовили временный давленый препарат пыльников. Стадию развития микроспор определяли цитологическим методом, окрашивая препараты 2%-м раствором ацетокармина, при помощи светового микроскопа (SK-14, Польша) при увеличении 480 х (окуляры 12х, объектив 40х). В каждом препарате определяли фазу развития (ранняя, оптимальная, поздняя) 50 микроспор. Колосья, в которых процент оптимальных микроспор в исследуемых пыльниках превышал 50 %, считали пригодными для дальнейшей работы.

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с помощью MS Office, среды программирования RStudio 4.0.5 и Python 3.8. Для сравнения показателей исследуемых сортов применяли непараметрический дисперсионный анализ: критерий Крускала–Уоллеса с апостериорным тестом Данна (с поправкой на множественность Бонферрони или FDR (False Discovery Rate)). Одномерное распределение данных с использованием ядерной оценки плотности выполнено при помощи библиотеки seaborn и функции kdeplot для Python 3.8.

Результаты и их обсуждение. Фазы развития микроспор в инокулируемых пыльниках определяли при помощи цитологического исследова-

ния. Микроспоры в образце (в пыльниках средней трети колоса у исследованных генотипов ячменя) относили к трем группам развития: ранняя, оптимальная и поздняя (рис. 2).

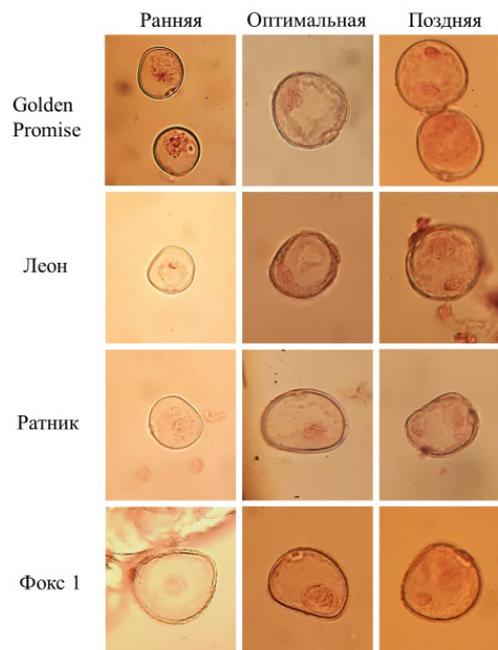


Рис. 2. Микроспоры, окрашенные 2%-м раствором ацетокармина, на разных стадиях развития для сортов Golden Promise, Леон, Ратник, Фокс 1

Fig. 2. Microspores, stained with a 2 % solution of acetocarmine, at different stages of development for the varieties 'Golden Promise', 'Leon', 'Ratnik', 'Fox 1'

На ранней стадии микроспоры характеризуются малыми размерами, отсутствием видимой крупной вакуоли, а также грануляцией цитоплазмы. Ядро, еще не вытесненное вакуолью, располагается по центру клетки или у клеточной стенки вблизи поры. К оптимальным относились сильновакуолизированные микроспоры с крупной неокрашенной вакуолью, занимающей большую часть клетки, с одним ядром, располагающимся на противоположной от поры стороне клетки. Поздними считались микроспоры, находящиеся в стадии митоза, дву- и более ядерные, сильноокрашенные, гранулированные, а также микроспоры в стадии сформировавшихся пыльцевых зерен.

У всех исследуемых генотипов отмечен полиморфизм микроспор, обусловленный асинхронностью их развития, и в большинстве случаев в пыльниках, извлеченных из колосьев всех изученных сортов, одновременно находились микроспоры, относящиеся к разным группам развития. Выявлены статистически значимые различия между генотипами в следующих фазах развития микроспор: оптимальная – между Фокс 1 и Леон (медиана±доверительный

интервал (ДИ), %: 20 ± 11 и 54 ± 7 соответственно; $p = 0,03$) и поздняя – между Golden Promise и Леон (медиана±ДИ, %: 70 ± 10 и 16 ± 10 соответственно; $p = 0,02$). Наибольшее количество сильновакуолизированных микроспор было зафиксировано для сорта Леон (медиана±ДИ: 54 ± 7 %).

В процессе поиска морфометрического параметра, потенциально соответствующего сильновакуолизированной стадии микроспор, в работе измеряли интервальное расстояние между флаговым и вторым листом (Ф-2л), интервальное расстояние между флаговым листом и кончиком находящегося в трубке колоса (Ф-К), длину колоса и ширину колоса в трубке (исключая сорт Фокс 1) (рис. 3).

У ячменя сорта Фокс 1 обнаружена статистически значимая разница по параметру Ф-2л между колосьями с преимущественно оптимальными микроспорами и колосьями с поздними микроспорами в пыльниках (рис. 3, а). Интервальное расстояние между флаговым и вторым листом статистически значимо больше у колосьев с поздними микроспорами.

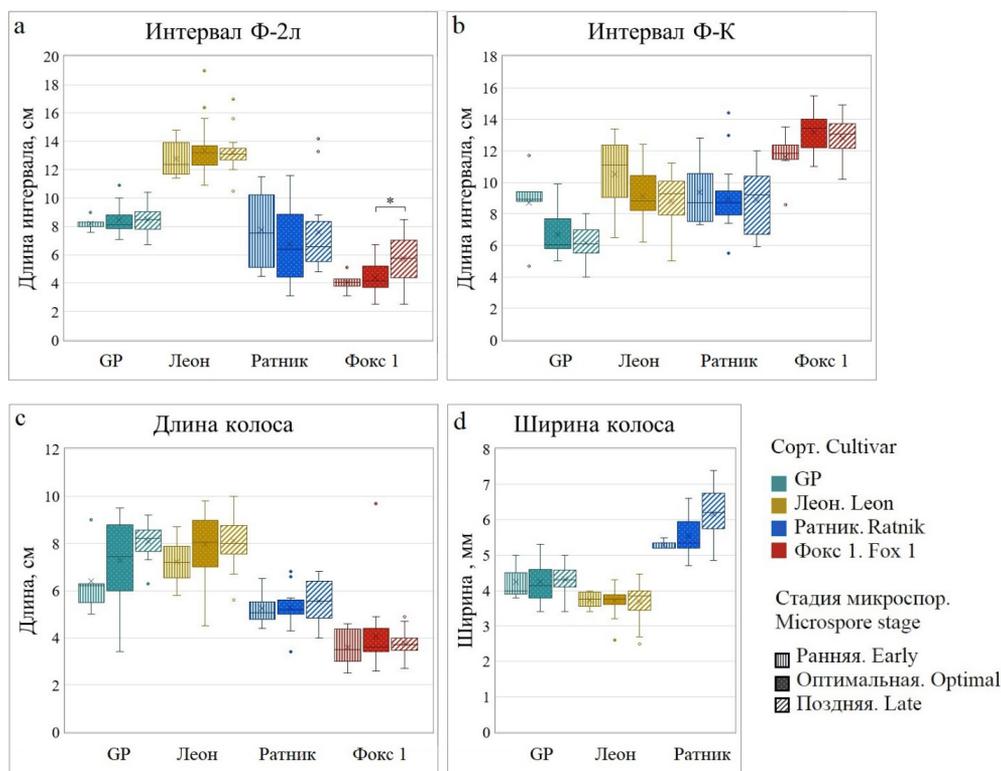


Рис. 3. Соотношение стадии микроспор и морфометрических параметров ячменя сортов Golden Promise (GP), Леон, Ратник и Фокс 1: а – интервал Ф-2л (см), б – интервал Ф-К (см), с – длина колоса (см), d – ширина колоса (мм). * – различия статистически значимы в рамках одного сорта (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна и поправкой Бонферрони)

Fig. 3. Correlation of the microspore stage and morphometric parameters of barley varieties 'Golden Promise' (GP), 'Leon', 'Ratnik' and 'Fox 1': а – F-2l interval (cm), б – F-K interval (cm), с – ear length (cm), d – ear width (mm). * – differences are statistically significant within one variety (Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test and Bonferroni correction)

Для тестируемых генотипов и условий выращивания расстояние Ф-2л было наибольшим для сорта Леон (медиана±ДИ: $13,2\pm 0,5$ см)

и наименьшим для сорта Фокс 1 (медиана ± ДИ: $4,2\pm 0,6$ см). В работе по изучению онтогенетических событий в андрогенезе у бразильских

генотипов ячменя это расстояние составляло около 5 см (Silva et al., 2000). Ohnoutkova et al. (2019) предлагают срезать колосья, когда флаговый лист отрастает от второго листа на 7–9 см.

Еще одним параметром визуальной оценки колосьев, предлагаемым российскими исследователями (Круглова и Никонов, 2018), является морфометрический критерий (МК), который определяется как соотношение Ф-2л:Ф-К. Данный параметр был разработан для определения стадии развития пыльника, упрощения технологии получения гаплоидных форм и для повышения эффективности индукции

андрогагенеза *in vitro* у ряда генотипов яровой мягкой пшеницы. В результате анализа полученных значений МК (рис. 4) для последующих биотехнологических исследований предлагаются колосья со следующими величинами МК: до 1,3 для Golden Promise; до 1,4 для сорта Леон; 0,7 для сорта Ратник и до 0,3 для сорта Фокс 1. МК, соответствующий фазе одноядерной сильновакуолизированной микроспоры, статистически значимо выше у растений сортов Golden Promise и Леон по сравнению с сортами Ратник и Фокс 1, у сорта Ратник выше, чем у сорта Фокс 1 (рис. 4).

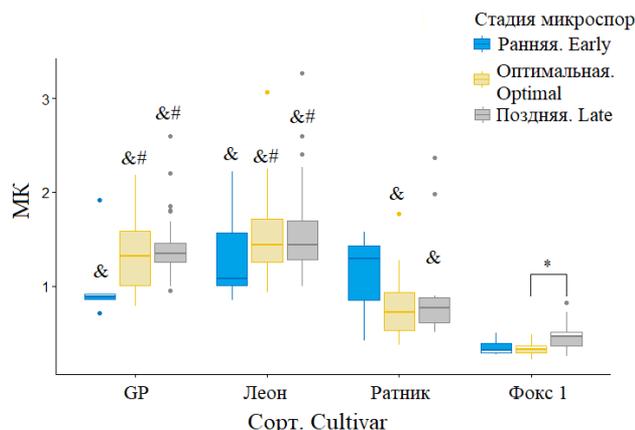


Рис. 4. Соотношение стадии микроспор и морфометрического критерия (МК) для ячменя сортов Golden Promise (GP), Леон, Ратник и Фокс 1. & – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с микроспорами той же стадии сорта Фокс 1; # – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с микроспорами той же стадии сорта Ратник; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с микроспорами того же сорта (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна и поправкой FDR)

Fig. 4. Correlation between the microspore stage and the morphometric criterion (MC) for barley varieties 'Golden Promise' (GP), 'Leon', 'Ratnik' and 'Fox 1'. & – statistically significant differences ($p < 0.05$) with microspores of the same stage of the variety 'Fox 1'; # – statistically significant differences ($p < 0.05$) with microspores of the same stage of the variety 'Ratnik'; * – statistically significant differences ($p < 0.05$) with microspores of the same variety (Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test and FDR correction)

Разброс значений морфометрического критерия одной и той же фазы развития микроспор в пыльниках можно объяснить как различными сорт-специфичными, так и индивидуальными темпами развития растений, а также влиянием условий выращивания. В целом, так же, как и в случае с пшеницей, МК можно использовать для отбора колосьев ячменя обыкновенного, в пыльниках которых находятся микроспоры преимущественно на оптимальной стадии развития, без вскрытия колоса и цитологического контроля. В данном исследовании выявлена статистически значимая положительная корреляция между МК и количеством ранних и оптимальных микроспор для сортов Фокс 1 и Golden Promise ($\rho = 0,5$, $p = 0,0002$ и $\rho = 0,43$, $p = 0,0018$ соответственно).

В ходе наблюдений за растениями отмечено, что изменчивость морфометрических параметров зависит также от номера колоса (продуктивного стебля). Известно, что одним из критических этапов развития *H. vulgare* является этап кущения, начало которого обычно совпадает с появлением третьего листа. При дальнейшем росте часть побегов разви-

вается нормально (особенно первые побеги), а другая часть из-за недостатка питательных веществ отмирает или остается бесплодной.

Ячмень расходует биоресурсы на формирование первых колосьев, что с высокой долей вероятности может определять вариацию морфометрических параметров в последующих продуктивных стеблях (рис. 5). Одним из непараметрических методов для визуализации распределения в наборе данных, аналогичный гистограмме, является ядерная оценка плотности, которая в случае морфометрического критерия указывает на высокую вариабельность показателя у второго (для сортов: Golden Promise, Леон и Фокс 1) или третьего (для сорта Ратник) колосьев, уменьшаясь у последующих продуктивных стеблей (рис. 5, a). Для длины колоса наблюдалась более высокая степень вариабельности у второго и последующих колосьев за исключением этого параметра у сорта Леон (рис. 5, b). При этом для сорта Леон наблюдалось уменьшение значения МК с увеличением номера колоса, что может быть связано с быстрым достижением оптимальной стадии микроспор при меньшем размере колоса.

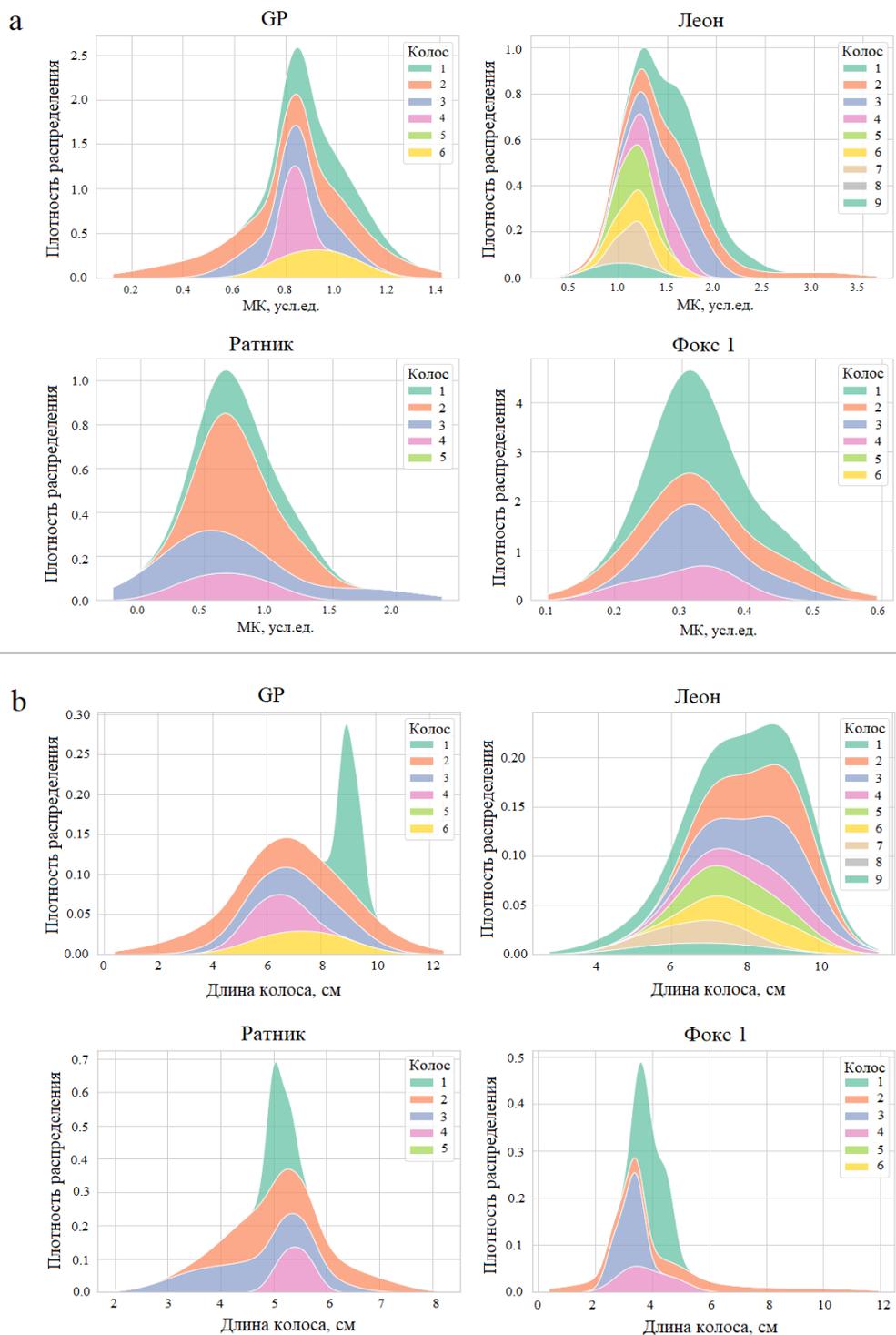


Рис. 5. Одномерное распределение данных морфометрических параметров с использованием ядерной оценки плотности (для колосьев с более 40 % микроспор на оптимальной стадии): а – морфометрический критерий (МК, усл. ед.); б – длина колоса (см)

Fig. 5. One-dimensional distribution of these morphometric parameters using a nuclear density estimation (for ears with more than 40% microspores at the optimal stage): а – Morphometric criterion (MC, conven. units); б – ear length (cm)

Выводы. При введении в биотехнологический процесс, в частности, в культуру пыльников или изолированных микроспор *in vitro*, различных сортов ячменя обыкновенного для отбора колосьев можно использовать морфометрический критерий, соответствующий отношению расстояния от основания

флагового листа до основания второго сверху листа к расстоянию от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса. С помощью данного параметра можно выявить колосья, содержащие большинство одноядерных сильновакуолизированных микроспор как инициальных клеток андроклинии

в пыльниках, не применяя (но не исключая) цитологические методы анализа. Однако следует помнить, что существует высокая межсортовая вариабельность. Кроме того, изученные в ходе данной работы параметры сильно взаимосвязаны с воздействием внешних (температура, влажность воздуха, полив и т. д.) и внутренних (главный колос или колос кущения, какой по счету колос кущения) факторов и могут отклоняться от заданных нормативов.

Благодарности. Авторы благодарят ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской» и канд. с.-х. наук А. А. Донцову за предоставленные семена ячменя.

Финансирование. Результаты получены при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1068 от 28.09.2021).

Библиографические ссылки

1. Дьячук Т. И., Хомякова О. В., Акинина В. Н., Кибкало И. А., Поминов А. В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23, № 1. С. 86–94. DOI: 10.18699/VJ19.466
2. Круглова Н. Н., Никонов В. И. Морфометрический критерий оптимальной стадии развития пыльника при биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы // Вестник БГАУ. 2018. Т. 48, № 4. С. 34–39. DOI: 10.31563/1684-7628-2018-48-4-34-39
3. Некрасова О. А., Калинина Н. В. Факторы, влияющие на процессы андрогенеза при культивировании пыльников пшеницы (обзор) // Зерновое хозяйство России. 2022. Т. 14, № 3. С. 25–30. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-81-3-25-30
4. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X., Zeng J., He X., Li Ch. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture // Plant Communications. 2021. Vol. 2, Iss. 2. Article number: 100082. DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100082
5. Ohnoutkova L., Vlcko T., Ayalew M. Barley Anther Culture. In: Harwood, W. (eds) Barley// Barley Methods in Molecular Biology. 2019. Vol. 1900. P. 37–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-8944-7_4
6. Silva A.L. S. da, Moraes-Fernandes M.I., Ferreira A.G. Ontogenetic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes // Rev. Bras. Biol. (Brazilian Journal of Biology) 2000. Vol. 60, Iss. 2. P. 315–319. DOI: 10.1590/S0034-71082000000200016
7. Watts A., Kumar V., Raipuria R.K., Bhattacharya R.C. In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges // Plant Molecular Biology Reporter. 2018. Vol. 36. P. 685–694. DOI: 10.1007/s11105-018-1132-9

References

1. D'yachuk T. I., Khomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Mikrosporoviy embriogenez *in vitro* – rol' stressov [Microspore embryogenesis in vitro, the role of stresses] // Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii. 2019. T. 23, № 1. S. 86–94. DOI: 10.18699/VJ19.466
2. Kruglova N.N., Nikonov V.I. Morfometricheskii kriterii optimal'noi stadii razvitiya pyl'nika pri biotekhnologicheskikh issledovaniyakh yarovoi myagkoi pshenitsy [Morphometric criterion for the optimal stage of anther development in biotechnological study of spring bread wheat] // Vestnik BGAU. 2018. T. 48, № 4. S. 34–39. DOI: 10.31563/1684-7628-2018-48-4-34-39
3. Nekrasova O.A., Kalinina N.V. Faktory, vliyayushchie na protsessy androgeneza pri kul'tivirovaniy pyl'nikov pshenitsy (obzor) [Factors influencing upon the processes of androgenesis during the cultivation of wheat anthers (review)] // Zernovoe khozyaistvo Rossii. 2022. T. 14, № 3. S. 25–30. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-81-3-25-30
4. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X., Zeng J., He X., Li Ch. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture // Plant Communications. 2021. Vol. 2, Iss. 2. Article number: 100082. DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100082
5. Ohnoutkova L., Vlcko T., Ayalew M. Barley Anther Culture. In: Harwood, W. (eds) Barley// Barley Methods in Molecular Biology. 2019. Vol. 1900. P. 37–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-8944-7_4
6. Silva A.L. S. da, Moraes-Fernandes M.I., Ferreira A.G. Ontogenetic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes // Rev. Bras. Biol. (Brazilian Journal of Biology) 2000. Vol. 60, Iss. 2. P. 315–319. DOI: 10.1590/S0034-71082000000200016
7. Watts A., Kumar V., Raipuria R.K., Bhattacharya R.C. In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges // Plant Molecular Biology Reporter. 2018. Vol. 36. P. 685–694. DOI: 10.1007/s11105-018-1132-9

Поступила: 23.08.23; доработана после рецензирования: 18.09.23; принята к публикации: 26.09.23.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Бондаренко Е. В. – концептуализация и ресурсное обеспечение исследования; Блинова Я. А., Бабина Д. Д., Ханова А. С., Король М. Ю. – подготовка и выполнение экспериментальных работ и сбор данных; Блинова Я. А., Король М. Ю., Бондаренко Е. В. – анализ данных и их интерпретация; Блинова Я. А., Бондаренко Е. В. – подготовка рукописи.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.