

УДВОЕННЫЕ ГАПЛОИДЫ ЯЧМЕНЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Мишуткина Я. В.¹, Нескородов Я. Б.¹, Новокрещенова М. Г.², Малахо С. Г.²,
Тураев А. М.²

¹ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия (117312, Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1), e-mail: yana@biengi.ac.ru

²ФГБОУВПО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия (119991, Москва, Ленинские горы, д. 1), e-mail: alishertouraev@yahoo.com

Удвоенные гаплоиды ячменя широко используются на протяжении последних 30 лет, в селекционных программах и для изучения ряда научно-практических проблем. Изначально для получения гаплоидных растений был использован метод элиминирования хромосом при удаленной гибридизации (*Bulbosum*-метод), который и сейчас активно используется в селекционных программах ряда компаний. Позднее были разработаны эффективные способы получения удвоенных гаплоидов из культивируемых *in vitro* пыльников и микроспор. На сегодняшний день ячмень можно считать модельным представителем злаковых культур по производству и исследованию гаплоидов. Удвоенные гаплоиды ячменя были использованы для разработки молекулярных маркеров и при составлении хромосомных карт. Методы культивирования пыльников и микроспор совмещенные с современными молекулярно-диагностическими методами значительно продвинули исследования в области изучения андрогенеза и эмбриогенеза у однодольных. Использование гаплоидов ячменя для генетической трансформации позволило получать гомозиготные по трансгену растений уже в первом поколении.

Ключевые слова: ячмень, удвоенные гаплоиды, андрогенез, эмбриогенез, *in vitro*.

APPLICATION OF BARLEY DOUBLED HAPLOIDS IN GENETICS AND BREEDING

Mishutkina Y. V.¹, Neskorodov Y. B.¹, Novokreshchenova M. G.², Malakho S. G.²,
Touraev A. M.²

¹Centre "Bioengineering" RAS, Moscow, Russian Federation (117312, pr-t 60-letiya Oktyabrya, 7/1), e-mail: yana@biengi.ac.ru

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation (119991, Moscow, Leninskie Gory, GSP-1), e-mail: alishertouraev@yahoo.com

Doubled haploid barley is widely used during last 30 years in barely breeding programmes and in fundamental-applied research. First haploid barley plants were obtained using chromosome elimination during distance hybridization with *Hordeum bulbosum* (*Bulbosum* method). This technology is still in use in breeding programs of several companies. Later the method of isolating and culturing *in vitro* anthers and microspores were established as an efficient technology of doubled haploid production in barley. Nowadays barley can be evaluated as a model cereal for haploid and doubled haploid studies. Doubled haploids were used for creating molecular markers and chromosome mapping. Isolated barley microspore cultures in combination with molecular biology and genomics methods led to studies of the mechanism of microspore embryogenesis and doubled haploid formation. Application of haploid microspores as target for genetic transformation led to the generation of homozygous transgenics already in the first generation.

Keywords: barley, double haploids, androgenesis, embryogenesis, *in vitro*.

Ячмень – чрезвычайно важная сельскохозяйственная культура для России. Зерно ячменя широко используется для продовольственных, технических и кормовых целей. Большая вовлечённость этой культуры в производственный процесс формирует основные задачи её селекции, которыми являются создание высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам среды озимых и яровых сортов для различных почвенно-климатических зон. Генетическая однородность также является необходимым требованием для регистрации новых сортов во многих странах мира. Подобная однородность обычно

достигается путем инбридинга и отбора гомозиготных линий в течение нескольких поколений. Для закрепления в популяции любого хозяйственно-ценного признака необходимо более восьми направленных скрещиваний, что, при условии проведения работы на однолетних растениях, занимает не менее восьми лет. Использование методов получения удвоенных гаплоидов позволяет достичь гомозиготности в одном поколении и, следовательно, сэкономить несколько поколений времени в селекции новых сортов [24, 40].

Удвоенные гаплоиды представляют собой гомозиготные организмы, имеющие двойной набор одинаковых хромосом. Подобная генетическая организация позволяет точно локализовать на хромосоме и описать широкий спектр не только доминантных признаков, но и рецессивных, которые обычно скрыты у гетерозиготных растений (например, очень важными для селекции ячменя являются гены мужской стерильности, которые рецессивны и могут быть выявлены только у гомозиготных растений) [5]. Генетическое расщепление при использовании дигаплоидов менее сложно, что позволяет использовать для выделения определённой комбинации генов сравнительно малочисленные популяции [36, 37, 40].

Из-за своей генетической однородности удвоенные гаплоиды широко используются при поиске молекулярных маркеров. Например, у ячменя большинство генетических карт было построено с использованием именно этой технологии [3, 5]. Гаплоидные и удвоенные гаплоидные линии ячменя (и других культур) и методики их получения также широко используются для генетических исследований, индуцированного мутагенеза, клеточной селекции, генетической трансформации и изучения андро- и эмбриогенеза. [6, 7, 27].

Первые гаплоидные растения ячменя были получены в 1970 году с использованием метода межвидовой гибридизации ячменя обыкновенного (*H. vulgare*) с ячменём луковичным (*H. bulbosum*) [20]. В культуре *in vitro* первые гаплоидные растения были получены из пыльников в 1973 году [4], затем в 1976 году из семяпочки [30] и в 1991 году из изолированных микроспор [17].

На сегодняшний день в мире зарегистрированы сотни, если не тысячи, разновидностей удвоенных гаплоидов ячменя. К сожалению, до сих пор не существует их полного перечня. Однако, на сайте COST 851 [35] приведен список некоторых яровых и озимых разновидностей ячменя. Каждый год по всему миру регистрируются новые удвоенные гаплоиды (большой частью в Европе, Канаде, США, Австралии). Традиционные возражения против получения удвоенных гаплоидов *in vitro*, связанные с возникновением соматональной изменчивости, потерей генетического разнообразия и меньшей стабильностью признаков все еще широко обсуждаются [40]. Тем не менее, появляется все больше селекционных программ, полностью основанных на использовании гаплоидии [8].

Следует учитывать, что использование гаплоидов – это только небольшая техническая ступень в общей программе селекции. Успешность использования удвоенных гаплоидов в создании новых сортов – результат объединения биотехнологической работы в лаборатории и полевых селекционных методов. Интеллектуальные затраты при планировании скрещивания и всей программы в целом, знания в области маркетинга и удача в полевых экспериментах являются в равной степени необходимыми составляющими успешности проектов по созданию новых урожайных и устойчивых к вредителям сортов как ячменя, так и других хозяйственно ценных культур [10].

Метод получения гаплоидных растений ячменя через элиминирование хромосом

Данный метод основан на феномене элиминирования половины хромосом в клетках гибридного ячменя на ранних стадиях эмбриогенеза [13, 19]. Этот процесс можно наблюдать при межвидовом скрещивании ячменя (*H. vulgare*) с ячменём луковичным (*H. bulbosum*), при котором происходит элиминирование хромосом *H. bulbosum*. Данный метод совершенствовался на протяжении нескольких лет [26, 27, 32], что сделало его достаточно эффективным. К настоящему времени метод элиминирования хромосом позволил получить большое число гаплоидных и дигаплоидных линий и применяется в селекционных программах при работе с генотипами, которые демонстрируют устойчивость к другим техникам получения гаплоидных форм [24].

Метод получения гаплоидных растений ячменя в культуре пыльников

Методы культуры изолированной микроспоры и культуры пыльника – наиболее широко используемые в настоящее время системы для получения гаплоидов у растений [7, 36, 40]. Большое количество микроспор в пыльнике и пыльников в колосе позволяют получить большое число гаплоидов из одного колоса.

Впервые гаплоидные растения ячменя из культуры пыльников были получены в 1973 году [4]. Разработанные тогда протоколы продолжают совершенствоваться [2, 15, 16, 24, 28, 34], и сейчас суть метода заключается в следующем: из растений ячменя выращенных в контролируемых температурных и световых условиях, выделяют пыльники. Перевод микроспор (внутри пыльника) от гаметофитного к спорофитному пути развития осуществляется стрессовым воздействием либо на пыльники *in vitro*, либо на растения до выделения пыльников [24, 36]. В качестве стрессового воздействия обычно применяется низкотемпературный шок и углеводное голодание [14, 28, 31]. После стрессовой обработки пыльники переносят на искусственные жидкие питательные среды и культивируют до формирования эмбриоидов, которые, в свою очередь, переносят на твердые среды для регенерации, состав которых различается в зависимости от генотипов или целей эксперимента [7, 24].

Развитие растений в культуре изолированных пыльников *in vitro* может проходить двумя путями: прямая регенерация зародышей (эмбриогенез) и через каллусогенез [11, 24, 36]. В первом случае внутри пыльников из микроспор формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриониды (зародышеподобные структуры), дающие начало гаплоидным растениям [4, 24]. Эффективность формирования эмбрионидов является генотипзависимым процессом и может существенно различаться (от 0 до 95 %) [11, 24]. Во втором – микроспора делится, но клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения [34]. При этом растения могут иметь разную степень пloidности – ди-, поли-, анеуплоидные и гаплоидные. Последние часто стерильны, но после обработки растений колхицином происходит удвоение числа хромосом, в результате чего можно получить фертильные гомозиготы [7, 17, 19, 33].

Большим преимуществом данного метода является высокий процент формирования спонтанных дигаплоидов среди растений-регенерантов – 60–80 %, что позволяет не использовать химические препараты для удвоения хромосом, которые являются токсичными для растений и людей [24].

Данная технология получила широкое распространение и применение для различных целей, но, тем не менее, у неё есть существенный недостаток, который заключается в формировании большого процента альбиносов среди растений-регенерантов [7, 24, 34].

Метод получения гаплоидных растений в культуре изолированных микроспор

Культура микроспор *in vitro* представляет собой процесс культивирования в жидкой питательной среде генеративных клеток, освобожденных от соматических тканей пыльника. Данный метод технологически отличается от культуры пыльников [9].

Главным отличием культуры изолированных микроспор от культуры пыльников является этап выделения микроспор из пыльника. Микроспоры извлекаются из пыльников на поздней одноядерной (перед митотическим делением) или ранней двуядерной (сразу после деления) стадии развития. Основная схема эксперимента по выделению и культивированию микроспор следующая [2, 9, 16, 17, 21, 22]: Пыльники извлекаются из фрагментов колосьев, разбиваются блендером несколько секунд в растворе 0,3 М маннитола. Полученная пульпа фильтруется через 100µм фильтр и центрифугируется несколько минут (3–5 минут) при щадящих условиях (50–100 g). После окончания центрифугирования, осадок из микроспор размешивается в растворе 0,3 М маннитола. Затем цикл с центрифугированием повторяют несколько раз, что необходимо для эффективного отмывания клеток микроспор. Дальнейшее культивирование микроспор осуществляется в жидких питательных средах, состав которых

различается в зависимости от генотипов или целей эксперимента и обычно содержит мальтозу (в качестве источника углеводов) и, иногда, стимуляторы роста.

Проведённые исследования, направленные на анализ эффективности методики получения гаплоидных растений, через культуру пыльников и через культуру микроспор, показали, что культура микроспор эффективнее [2, 22]. В настоящее время метод культуры микроспор особенно широко используется в современных селекционных программах для озимого и в меньшей степени для ярового ячменя [7, 10, 24].

Культура микроспор также широко используется для прикладных исследований. Так в культуре микроспор ячменя было показано влияние стрессовых факторов (голод, холод) на перепрограммирование пути клеточного развития от гаметофитного к эмбриогенезу и изучено участие каспазы-3, ROS и NO в стресс-индуцированном апоптозе [29]. Использование микрочипов в культуре микроспор ячменя позволило исследовать экспрессионный профиль эмбриогенеза микроспор индуцированного стрессовой обработкой [36].

Совсем недавно было показано, что технологию удвоенных гаплоидов ячменя можно использовать для получения безмаркерных трансгенных растений [18] и для маркирования хозяйственно-ценных признаков [23].

Другие Методы Производства Гаплоидов Ячменя

Гаплоиды ячменя также были получены с помощью культуры семяпочки [30] и с помощью гена инициации гаплоидности (*hap*) [12]. Однако трудности, сопряженные с этими подходами, не позволили широко их использовать. Метод культуры семяпочки совершенствовался, но процент жизнеспособного потомства оказался низок (0.2–1.4 %), а сама процедура трудоемка, что не позволило найти ему широкое применение для прикладных целей [41]. Ген *hap* отвечает за блокирование оплодотворения яйцеклетки, однако полярное ядро оплодотворяется и эндосперм развивается нормально. Яйцеклетка же развивается в гаплоидный эмбрион [5]. Таким образом, гаплоидное и диплоидное семя не различаются внешне. Необходимы дальнейшие исследования системы гена *hap*, чтобы она могла конкурировать с методами культуры пыльников или изолированных микроспор [5].

Генетический контроль гаплоидизации

Идентификация генов, вовлеченных в формирование гаплоидов, была целью исследователей со времени открытия гаплоидов, но только сейчас прогресс в молекулярных исследованиях сделал возможным идентифицировать сотни генов, отвечающих за индукцию гаплоидии [1, 5, 7, 42, 43]. Иницирующий гаплоидию ген *hap* ячменя – это аллель, который содержит доминантную мутацию, стимулирующую партеногенез. Доминантный характер

этой мутации создает определенные проблемы селекционерам, так как аллель *hap* должен быть удален из семян, поступающих на рынок.

Метод элиминации хромосом основан на существовании определенного геномного баланса после отдаленной гибридизации *H. vulgare* с *H. bulbosum*. Но и Kasha (1975) показали, что генетические факторы, контролирующие этот баланс локализованы на обоих плечах хромосомы 2 и коротком плече хромосомы 3 ячменя [13]. Pickering (1985) обнаружил ген, отвечающий за несовместимость между ячменем и *H. bulbosum* на хромосоме 5 [25]. Явление элиминации хромосом также известно для пшеницы и овса при скрещивании с кукурузой и просом [39]. Генотипы используемых при скрещивании растений также влияют на эффективность элиминации [26, 32].

Скрещивание генотипов, различающихся по различным признакам, и создание молекулярных маркеров для картирования позволяет определить гены, ответственные за количественные признаки – QTL (Quantitative Trait Loci). Zivy (1992) и Devaux (1994) с соавторами идентифицировали четыре локуса, связанные с развитием эмбриона и регенерацией растения [6, 43]. Chen (2007) с соавторами также обнаружили 3 подобные локуса [3].

Для молекулярного картирования, маркер-опосредованной селекции и изучения генетического разнообразия используются различные типы маркеров: AFLP, RAPD, SSR, EST, SNP и др. Varshney с соавторами (2007) разработали хромосомные карты ячменя с 775 маркерами SSR со средним расстоянием между маркерами в 1.38 сМ [38]. Для идентификации и выделения генов используются базы данных EST (expressed sequence tags). Подобная база для ячменя была разработана в 2005 году [37, 39]. С помощью таких библиотек стало возможным создавать микрочипы для скрининга транскриптома и, таким образом, проследивать влияние различных условий на экспрессию генов в ходе эмбриогенеза [42].

Наряду с идентификации генов, вовлеченных в процесс андрогенеза, этот процесс изучается и с цитологической точки зрения. Диплоидизации клеточного ядра при переходе к эмбриогенезу посвящен ряд работ [14, 15].

Образование растений-альбиносов в ходе регенерации растений из культуры тканей является частой проблемой при эмбриогенезе, поэтому внимание исследователей привлекает ультраструктура хлоропластов культуры микроспор. Caredda с соавторами (2004) обнаружили, что пропластиды в линиях, образующих альбиносов, редко делятся и имеют малое число тилакоидов [1]. Основной причиной альбинизма они считают деградацию ДНК в пластидах в ходе индукции эмбриогенеза.

Заключение

Гаплоиды (дигаплоиды) ячменя – ценный материал для селекции и изучения ряда научно-практических проблем, в том числе – связанных с изучением комбинативной изменчивости и поиском подходов для ее эффективного использования и закрепления в гомозиготных линиях. Вначале при создании гаплоидов получили развитие методы элиминирования хромосом и культуры пыльников. Относительно недавно получил развитие и метод культуры изолированных микроспор. В настоящее время, ячмень считается одним из модельных культурных растений среди злаковых. С его помощью были изучены гены, контролирующие индукцию микроспорового эмбриогенеза и гены, вовлеченные в развитие эмбриона. Как диплоидное растение ячмень часто используется для биохимических и цитологических исследований андрогенеза. Дигаплоидные популяции также используются для картирования хромосом и создания молекулярных маркеров. С усовершенствованием молекулярных, биохимических и цитологических методов исследования сдвинулись в область секвенирования ДНК и анализа транскриптомов, позволяя выявить сотни генов, отвечающих за индукцию эмбриогенеза в микроспорах. Трансформация ячменя также развивается во многом благодаря использованию гаплоидных систем в связи с их доступностью и возможностью немедленного получения гомозиготных по трансгену растений. Главным прикладным направлением использования удвоенных гаплоидов ячменя является ускоренная селекция новых сортов и гибридов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, ГК № 14.512.11.0063.

Список литературы

1. Caredda S. et al. Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley cultivars // *Plant Cell Tiss Org Cult* 2004. Vol. 76. P. 35–43.
2. Castillo A. M., Vallés M. P., Cistué L. Comparison of anther and isolated microspore culture in barley // *Euphytica* 2000. Vol. 113 P. 1–8.
3. Chen X., et al. Genetic markers for doubled haploid response in barley // *Euphytica* 2007. Vol. 158 P. 287–294.
4. Clapham D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro// *Z Pflanzenzücht.* 1973. Vol. 69. P. 142–155.
5. 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.

6. Devaux P., Zivy M. Protein markers for anther culturability in barley // *Theor. Appl. Genet.* 1994. Vol. 88 P. 701–706.
7. Devaux P., Kasha K. J., Overview of Barley Doubled Haploid Production // *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* 2009. P. 47–63.
8. Dubcovsky J. Marker-Assisted Selection in Public Breeding Programs: The Wheat Experience // *Crop Sci.* 2004. Vol. 44. P. 1895–1897.
9. Ferrie A.M.R. & Caswell, K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2011. Vol. 104. №. 3. P. 301–309.
10. Forster B. P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in plant breeding // *Plant Breed Rev.* 2005. Vol. 25. P. 57–88.
11. Germana M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2011. Vol. 104. P. 283–300.
12. Hagberg A., Hagberg G. High frequency of spontaneous doubled haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas* 1980. Vol. 93. P. 341–343.
13. Ho K., Kasha K. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley // *Genetics.* 1975. Vol. 81. № 2. P. 263–275.
14. Hoekstra S. *et al.* Androgenesis in *H. vulgare* L: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment // *Plant Sci.* 1997. Vol. 126. P. 211–218.
15. Jacquard C. *et al.* Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism // *Plant Cell Rep.* 2006. Vol. 25. P. 375–381.
16. Jähne-Gärtner A, Lörz H. Protocols for anther and microspore culture of barley // *Methods Mol Biol.* 1999. Vol. 111. P. 269–79.
17. 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. P. 595–601.
18. Kapusi E. *et al.* The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants// *Plant. Mol. Biol.* 2013. Vol. 81. № 1-2. P. 149-60.
19. Kasha K. J. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Palmer D, *et al.* (eds) *Haploids in crop improvement II* // Springer, Heidelberg. 2005. Vol. 123–152.
20. Kasha K. J., Kao K. N. High frequency haploid production in barley (*H. vulgare* L.) // *Nature.* 1970. Vol. 225 P. 874–876.
21. Kasha K. J. *et al.* An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley // *Euphytica.* 2001. Vol. 120. P. 379–385.
22. Li H., Devaux P. Isolated microspore culture over performs anther culture for green plant regeneration in barley (*H. vulgare* L.) // *Acta Physiol Plant.* 2005. Vol. 27. P. 611–619.

23. Luckert D. *et al.* Novel septoria speckled leaf blotch resistance loci in a barley doubled-haploid population // *Phytopathology*. 2012. Vol. 102. № 7. P. 683–91.
24. Maluszynski M. *et al.* Doubled haploid production in crop plants: a manual // Kluwer Academic Publishers. 2003.
25. Pickering R. A. Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *H. vulgare* L. x *H. bulbosum* L // *Euphytica*. 1985. Vol. 34. P. 869–874.
26. Pickering R. A., Rennie W. F. The evaluation of superior *H. bulbosum* L. genotypes for use in a doubled haploid barley breeding programme // *Euphytica*. 1990. Vol. 45. P. 251–255.
27. Pickering R. A., Devaux P. Haploid production: approaches and use in plant breeding. In: Shewry PR (ed) *Barley: genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International, Wallingford, 1992. P. 511–539.
28. Roberts-Oehlschlager S. L., Dunwell J. M. Barley anther culture: pre-treatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos // *Plant Cell Tiss Org Cult*. 1990. Vol. 20. P. 235–240.
29. Rodríguez-Serrano M. *et al.* NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley // *J Exp Bot*. 2012. V. 63. № 5. P. 2007.
30. 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.
31. Shariatpanahi M. E. *et al.* Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis // *Physiol Plant*. 2006. Vol. 127. P. 519–534.
32. Simpson E., Snape J. W., Finch R.A. Variation between *H. bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids of barley, *H. vulgare* // *Z Pflanzenzüchtg*. 1980. Vol. 85. P. 205–211.
33. Subrahmanyam N. C., Kasha K. J. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments // *Can J Genet Cytol*. 1975. Vol. 17. P. 573–583.
34. Szarejko I., Kasha K. J. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley // *Cereal Res Commun*. 1991. Vol. 19. P. 219–237.
35. www.scri.sari.ac.uk/assoc/cost851/default.htm.
36. Touraev A., Forster B. P., Jain S *Advances in haploid production in higher plants* // Springer. 2009. ISBN 978-1-4020-8854-4.
37. Varshney R. K., Graner A, Sorrells M. E. Genomics-assisted breeding for crop improvement // *Trends Plant Sci*. 2005. Vol. 10. P. 621–630.
38. Varshney R. K. *et al.* A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet*. 2007. Vol. 114. P. 1091–1103.

39. Varshney R. K. *et al.* Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice // *Plant Sci.* 2005. Vol. 168. P. 195–202.
40. Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding // *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* 2009. P. 179–187.
41. Yean-San LH Gynogenèse *in vitro*. Variabilité des haploïdes doublés issus d'androgenèse *in vitro* et de croisement interspécifique chez *H. vulgare* L. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Paris-sud, France. 1987.
42. Zhang H. *et al.* Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags // *Plant J.* 2004. Vol. 40. P. 276–290.
43. Zivy M. *et al.* Segregation distortion and linkage studies in microspore derived doubled haploid lines of *H. vulgare* L. // *Theor Appl Genet.* 1992. Vol. 83. P. 919–924.

Рецензенты:

Равин Н. В., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории систем молекулярного клонирования, заместитель директора Центра «Биоинженерия» РАН, г. Москва.

Игнатов А. Н., д.б.н., руководитель группы молекулярной фитопатологии Центра «Биоинженерия» РАН, г. Москва.