

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ И КАЧЕСТВА ОСВЕЩЕНИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ КАЛЛУСА РИСА *Oryza sativa* L., ПОЛУЧЕННОГО В АНДРОГЕНЕЗЕ *IN VITRO*

М.В. Илюшко, кандидат биологических наук,
М.В. Ромашова, кандидат сельскохозяйственных наук

Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки,
692539, Приморский край, п. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Исследования проводили с целью изучения влияния интенсивности и качества освещения на регенерационные процессы каллуса риса *Oryza sativa* L. для оптимизации процесса андрогенеза *in vitro*. Работу выполняли на растениях сортов Каскад и Алмаз, а также гибрида F₂ Рассвет×Оху 2х. Для освещения каллусов на регенерационной среде использовали два типа светодиодных светильников: с белым светом (цветовая температура 6500K, что соответствует спектру полуденного солнечного света) и фиолетовым светом (излучает длины волн 400, 430, 660 и 730 нм). Схема опыта включала следующие варианты: белый свет 4200 лкс; белый+фиолетовый в соотношении 3/1, 3900 лкс; фиолетовый свет 3600 лкс; белый интенсивный свет 7500 лкс. Интенсивность и качество освещения одинаково влияли на индукцию морфогенного каллуса и число регенерантов на каллус. Спонтанное удвоение хромосом происходило, в том числе в световую стадию развития каллуса. Качество освещения воздействует на формирование удвоенных гаплоидов разных генотипов неоднозначно. Белый интенсивный свет способствует образованию высокоплоидных растений у всех изученных генотипов: 44,4...54,0 % удвоенных гаплоидов и 1,2...38,9 % тетраплоидов. При освещении и с использованием фиолетовых светильников у сорта Алмаз и гибрида удвоенных гаплоидов образуется более 60,0 %, у сорта Каскад – 26,1... 31,8 %. Для получения гарантированно высокого (49,4 %) числа продуктивных регенерантов целесообразно использовать белый интенсивный тип освещения.

EFFECT OF LIGHT INTENSITY AND QUALITY ON RICE *Oryza sativa* L. REGENERATION FROM CALLUS, GENERATED THROUGH *IN VITRO* ANDROGENESIS

Ilyushko M.V., Romashova M.V.

Federal Scientific Centre of Agrobiotechnology of the Far East named A.K. Chaika,
692539, Primorskiy kray, p. Timiryasevskiy, ul. Volozhenina, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

To optimize the process of *in vitro* androgenesis, the influence of light intensity and quality on regeneration processes of the rice *Oryza sativa* L. callus was studied. The work was carried out on plants of the varieties Kaskad, Almaz and the F₂ hybrid Rassvet×Oxy 2x. To lighting calli on a regeneration medium two types of LED lamps were used: with white light (color temperature 6500K, which corresponds to the spectrum of midday sunlight) and violet light (emitting wavelengths of 400, 430, 660 and 730 nm). Experimental options: white light 4200 lux; white+violet light in the 3/1ratio, 3900 lux; intense white light 7500 lux. The light intensity and quality equally affect the induction of morphogenic callus and the number of regenerants per callus. Spontaneous chromosome duplication occurs during the light stage of callus development. The quality of lighting has an ambiguous effect on the doubled haploids formation of different genotypes. Intense white light contributes to the formation of highly ploid plants in all genotypes: 44.4 ... 54.0% of doubled haploids and 1.2 ... 38.9% of tetraploids. When lighting with using violet lamps, the Almaz variety and the hybrid produce more than 60.0% of doubled haploids, while the Kaskad variety decreases to 26.1 ... 31.8%. To obtain a guaranteed high (49.4%) number of doubled haploids, it is advisable to use intense white type of lighting.

Ключевые слова: *Oryza sativa*, андрогенез *in vitro*, освещение, каллус, регенерация, удвоенные гаплоиды

Key words: *Oryza sativa*, *in vitro* androgenesis, lighting, callus, regeneration, doubled haploids

Андрогенез в условиях *in vitro* – процесс формирования спорофитных растений из незрелого гаметофита, приводящий к образованию гаплоидов. В результате спонтанного удвоения в течение одной генерации образуются полностью гомозиготные линии удвоенных гаплоидов, что позволяет ускорить селекционный процесс многих важнейших продовольственных культур на несколько лет [1, 2, 3]. Известные лаборатории на разных континентах поддерживают широкомасштабную индукцию гаплоидов, а некоторые из них даже предлагают производство регенерантных растений под заказ по доступной цене для интенсификации селекционного процесса [3]. Массовые работы допускают оптимизацию существующих подходов в андрогенезе *in vitro*. Кроме того, в пределах всех видов растений возможно наличие труднокультивируемых перспективных генотипов, для которых необходим по-

иск новых типов воздействия на гаметофит для запуска спорофитной программы развития незрелых микроспор [4, 5].

Свет оказывает решающее влияние на морфогенетические ответы в культуре *in vitro* [6]. Однако известно небольшое число работ, посвященных изучению воздействия освещенности на андрогенез *in vitro* [7]. Установлено влияние качества и интенсивности освещения на растения-доноры в культуре пыльцевиков *in vitro* зерновых [3, 8, 9]. Индукция каллусообразования различных культур проходит в темноте или при очень слабом освещении [3, 10, 11]. Для риса освещение в разных режимах дня и ночи допустимо, однако каллусообразование при этом уменьшается [11]. Отмечено негативное воздействие синего света на каллусообразование *Citrus clementine* Hort. ex Tan. [7]. После переноса каллуса на регенерационную среду рекомендовано слабое иску-

ственное освещение [10]. Для пшеницы предложено комбинированное освещение каллуса в период регенерации: 15 дней темноты, затем 7 дней слабого света, далее высокоинтенсивное освещение [8].

В мире и Российской Федерации достигнуты значительные успехи в селекции риса *Oryza sativa* L. с использованием андрогенеза *in vitro* [10, 12, 13], опубликован ряд обзорных работ, посвященных особенностям создания удвоенных гаплоидов культуры, что свидетельствует о значительном интересе к этому направлению исследований [11, 12, 14]. Однако вопрос воздействия освещения на уже индуцированный каллус, перенесенный на регенерационную среду, изучен недостаточно.

Цель исследования – определить влияние интенсивности и качества освещения на регенерационные процессы в андрогенном каллусе риса для создания удвоенных гаплоидов и последующего их использования в селекционном процессе.

Методика. Работу проводили на растениях сортов риса Каскад и Алмаз, а также гибрида F₂ Рассвет×Окси 2х. В культуру *in vitro* было введено соответственно 1016, 1002 и 348 пыльников. Растения доноры выращивали в климатической камере при температуре 21 °С, влажности 60 %, интенсивности освещения 15000 лкс, режиме освещения день – 16 ч, ночь – 8 ч. Холодovou обработку пыльников, культивирование пыльников, каллусов и регенерантов в условиях *in vitro* проводили согласно методике, изложенной ранее [15], их перенос на питательную среду для регенерации осуществляли в порядке, представленном в работе [16].

Для освещения каллусов на регенерационной среде использовали два типа светодиодных светильников: с белым светом (цветовая температура 6500 К, что соответствует спектру полуденного солнечного света) и фиолетовым светом (излучает длины волн 400 нм, 430 нм, 660 нм и 730 нм) [17]. Схема опыта предусматривала четыре варианта: белый свет, 4200 лкс; белый+фиолетовый в соотношении 3/1, 3900 лкс; фиолетовый свет, 3600 лкс; белый интенсивный свет, 7500 лкс. Интенсивность освещения регистрировали люксметром Ю116. Во избежание затенения штативы с пробирками располагали на расстоянии не менее 30 см один от другого.

Зеленые регенеранты R0 с развитой корневой системой пересаживали в горшки и продолжали выращивать в культуральной комнате. Порядок разделения зеленых регенерантов на группы указан в публикации [20].

Статистические параметры (средние значения признака (\bar{x}), коэффициент вариации (C_v), непараметрические критерии достоверности различий вариационных рядов Крускал-Уоллиса (H) и хи-квадрат (χ^2)) рассчитывали с использованием программы Statistica.

Результаты и обсуждение. Каллусообразование у сорта Каскад составило 12,8 %, Алмаз – 6,2 %, гибрида Рассвет×Окси 2х – 15,8 %, соответственно.

Отмечена тенденция к увеличению числа каллусов с зелеными регенерантами при комбинированном типе освещения. В варианте белый + фиолетовый образовалось максимальное в опыте их число при использовании всех изучаемых генотипов. Однако различия между вариантами не достоверны (табл. 1). У культур, образующих каллус в андрогенезе *in vitro*, к числу которых относится рис [10], отсутствует значительная гаметокарональная изменчивость удвоенных гаплоидов одного пыльника. Вследствие митотического деления каллуса происходит истинное клонирование ограниченного числа генотипов (часто только одного), обра-

Табл. 1. Число каллусов с зелеными регенерантами в андрогенезе *in vitro* риса *Oryza sativa* L. при разных типах освещения

Показатель	Тип освещения			
	белый	белый + фиолетовый	фиолетовый	белый интенсивный
Сорт Каскад				
Всего, шт.	30	34	30	36
Число каллусов с зелеными регенерантами, шт.	17	20	16	17
Доля каллусов с зелеными регенерантами, %	57	59	53	47
χ^2	0,03...0,94; при p>0,33			
Сорт Алмаз				
Всего, шт.	16	14	16	16
Число каллусов с зелеными регенерантами, шт.	4	6	4	5
Доля каллусов с зелеными регенерантами, %	25	43	25	31
χ^2	0,00...1,07; при p>0,30			
Гибрид Рассвет×Окси 2х				
Всего, шт.	14	14	13	14
Число каллусов с зелеными регенерантами, шт.	8	11	8	8
Доля каллусов с зелеными регенерантами, %	57	79	62	57
χ^2	0,00...1,47; при p>0,23			

зовавшихся на пыльнике [18]. В андрогенезе *in vitro* важно получить как можно большее количество каллусов с морфогенетическими ответами, так как это расширяет разнообразие регенерантов, необходимое для селекции.

В эксперименте сформировалось 2868 зеленых регенерантов. Тип освещения не влиял на среднее число регенерантов на каллус (табл. 2). Исключение составил сорт Алмаз, у которого величина этого показателя при белом и фиолетовом типах освещения составила соответственно 17,5 и 13,3 шт., что достоверно (p=0,04) выше, чем при комбинированном (4,5 шт.) и белом интенсивном освещении (3,6 шт.).

Для селекционера, в конечном итоге, важно не столько общее число регенерантов, сколько выход спонтанно удвоенных гаплоидов. Их доля у разных исследователей варьирует от 25 до 95 % [1, 19]. Тип освещения влиял на величину этого показателя разнонаправленно (см. рисунок). Наиболее ярко это проявилось при фиолетовом освещении, когда у сорта Алмаз и гибрида отмечали наибольшее количество удвоенных гаплоидов (67,9 % и 63,8 % соответственно), а у сорта Каскад оно было самым низким (26,1%). При белом и комбинированном освещении значительное варьирование доли удвоенных гаплоидов среди регенерантов риса сохранялось – 34,3...52,8 % и 31,8...62,7 % соответственно. Более стабильное и высокое количество удвоенных гаплоидов формировалось при белом интенсивном освещении – 44,3...54,0 %. Попарное сравнение с использованием χ^2 подтвердило значимое

Табл. 2. Число регенерантов на каллусах в андрогенезе *in vitro* риса *Oryza sativa* L. при разных типах освещения

Показатель	Тип освещения			
	белый	белый + фиолетовый	фиолетовый	белый интенсивный
Сорт Каскад				
Среднее число регенерантов на каллус, шт.	17,9	14,7	19,4	10,7
Максимальное число регенерантов на каллус, шт.	128	65	73	71
Н для всех каллусов	2,49; при $p=0,48$			
Н только для каллусов с зелеными регенератами	3,56; при $p=0,31$			
Сорт Алмаз				
Среднее число регенерантов на каллус, шт.	3,8	1,3	3,9	1,6
Максимальное число регенерантов на каллус, шт.	31	5	28	12
Н для всех каллусов	0,25; при $p=0,97$			
Н только для каллусов с зелеными регенератами	8,62; при $p=0,04$			
Гибрид Рассвет×Окси 2х				
Среднее число регенерантов на каллус, шт.	9,2	13,0	15,8	13,2
Максимальное число регенерантов на каллус, шт.	37	54	75	86
Н для всех каллусов	1,73; при $p=0,19$			
Н только для каллусов с зелеными регенератами	2,1; при $p=0,55$			

превышение числа удвоенных гаплоидов при фиолетовом освещении над белым у сорта Алмаз и гибрида ($p<0,04$). У сорта Каскад при белом и белом интенсивном свете отмечали достоверно большее образование удвоенных гаплоидов, чем при обоих типах освещения с фиолетовыми светодиодами ($p<0,00001$).

В исследованиях влияния освещения этих же светодиодных ламп на микроклонирование *in vitro* безвирусного картофеля [17] было показано неоднозначное действие качества света (белого и комбинированного) на интенсивность размножения 14 сортов, на основании чего был сделан вывод о необходимости индивидуального подбора освещения для каждого генотипа. При этом вегетативное размножение картофеля позволяет проводить повторные исследования с одним и тем же сортом. В ходе селекции риса ученые чаще имеют дело с уникальным генотипом гибрида, регенеранты которого необходимо перевести в гомозиготное состояние, и возможность репликации опыта отсутствует. В лучшем случае, остается несколько семян одной гибридной комбинации, которые так же не идентичны. Поэтому для гарантированно высокого, пусть и не максимального, но стабильного результата предпочтительней использовать белый интенсивный свет, при котором половину зеленых регенерантов составляют удвоенные гаплоиды.

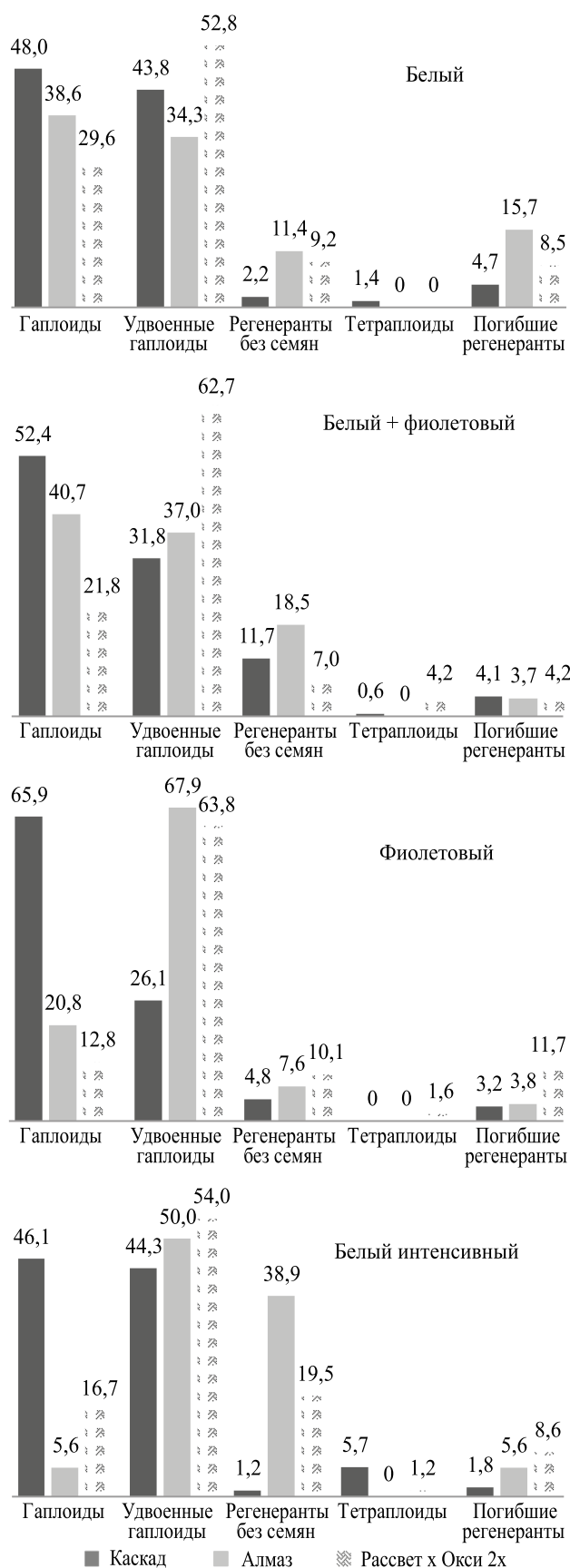
Наши данные подтверждают мнение других исследователей [1, 19] о зависимости способности к спонтанному удвоению числа хромосом от генотипа. В опыте при фиолетовом освещении доля удвоенных га-

плоидов сорта Каскад (21,6 %) была ниже ($p=0,00001$), чем сорта Алмаз и гибридного растения, на 46,3 и 42,2 % соответственно. При комбинированном освещении на сорте Каскаде сформировалось 31,8 % удвоенных гаплоидов, что меньше, чем у гибрида, на 30,9 % ($p=0,00001$).

Кроме спонтанного удвоения хромосом в андрогенных каллусах происходят хромосомные изменения иного порядка – образуются триплоидные, тетраплоидные, пентаплоидные, анеуплоидные клетки [20], что приводит к образованию тетраплоидов и растений без семян [1, 18, 21]. Тип освещения влиял на образование подобных регенерантов так же разнонаправленно. На сорте Каскад при белом освещении отмечали тетраплоидные формы, а при фиолетовом они отсутствовали, $p=0,0043$ (см. рисунок). Белый интенсивный свет способствовал кратному увеличению хромосом с образованием тетраплоидных растений (5,7 %), при трех других типах освещения их формировалось достоверно меньше (0,0...1,4 %, $p<0,0006$). Бессемянных растений при белом интенсивном освещении (1,2 %) было меньше ($p<0,04$), чем при фиолетовом (4,8 %) и белом+фиолетовом (11,7 %) свете. Среди регенерантов, полученных от гибридного растения, при белом освещении тетраплоидов не выявлено. На белом интенсивном освещении бессемянных растений (19,5 %) было достоверно больше, чем в трех других вариантах опыта, на 9,4...12,5 % ($p<0,01$). Это свидетельствует о генотипической зависимости полиплоидных и анеуплоидных изменений в андрогенезе *in vitro*.

На сорте Алмаз тетраплоидные растения не зарегистрированы. Доля бессемянных растений была на много больше, чем в вариантах с другими генотипами, и достигала 7,6...38,9 % (см. рисунок). При белом интенсивном освещении она достоверно возростала, по сравнению с белым и фиолетовым освещением ($p<0,008$).

При сравнении сортов Каскад и Алмаз без учета освещения очевидна разница в их андрогенетических ответах *in vitro*: калусообразование у Каскада выше в 2 раза, а регенерация в 6 раз. Влияние генотипа на эти процессы доказано [10, 11]. Размах варьирования признаков у регенерантов одного генотипа, полученных в культуре *in vitro*, изучен недостаточно. Известно, что уровень генетической дивергенции у соматических регенерантов *Pisum sativum* L. зависит от исходного генотипа [22]. У риса в андрогенезе *in vitro* выявлен внутрикаллусный генетический полиморфизм и изменчивость морфологических признаков, варьирующих в разной степени на разных пыльниках одного гибрида [18]. Генетическая нестабильность сорта Алмаз в культуре *in vitro* проявилась в образовании большой доли бессемянных растений, среди которых были в основном высокоплоидные генотипы [21]. Видимо, возникли хромосомные нарушения, препятствующие нормальному мейотическому делению при образовании мега- и микроспор, что привело к их полной стерильности. Высокоплоидные формы риса (тетраплоиды) в обычных условиях характеризуются низкой фертильностью пыльцы [23], в андрогенезе *in vitro* образуются в небольшом количестве [16, 21, 24], но не во всех случаях [1]. Таким образом, размах изменчивости регенерантов риса сорта Алмаз, выше, чем у сорта Каскад, по косвенной цитометрической оценке. Низкая интенсивность калусообразования и морфогенеза может быть связана не только с наличием генов, детерминирующих андрогенетические ответы [25], но и с цитологическими особенностями растения-донора, а также хромосомными преобразованиями, несовместимыми с



Регенеранты в андрогенезе *in vitro* пуса *Oryza sativa* L. при разных типах освещения, %.

нормальным митотическим делением каллусных клеток в культуре *in vitro*.

Спонтанное гаплоидное геномное удвоение (spontaneous haploid genome duplication – SHGD), приводящее к образованию удвоенных гаплоидов, триплоидов и тетраплоидов в андрогенезе *in vitro*, по мнению одних авторов происходит на очень ранних стадиях эбриогенеза [1], другие считают, что SHGD возможно на различных стадиях культивирования *in vitro*, включая каллусогенез, дифференциацию каллуса и эмбриогенез [12]. Механизмы SHGD остаются дискуссионными [1, 26]. После переноса каллуса из темноты на свет происходит его значительное разрастание с последующим морфогенезом. Выявленные различия в доле удвоенных гаплоидов и тетраплоидов при разных типах освещения у двух сортов и гибрида свидетельствует в пользу довольно позднего процесса SHGD на стадии дифференциации каллуса.

Решающую роль при выборе технологии создания культивируемых растений играет экономическая эффективность. Светодиодные светильники имеют очевидные преимущества перед традиционными люминесцентными лампами, в том числе ценовые [6, 17]. Среди разнообразия светодиодов, фитолампы с ограниченными длинами волн (фиолетовый свет) в два раза дороже ламп белого света. Отсутствие очевидных преимуществ в вариантах опыта по изученным сортам и гибриду позволяет рекомендовать применение освещения любого типа. В этом случае для масштабного применения в андрогенезе *in vitro* экономически оправдано использование светильников белого света.

Таким образом, изученные варианты интенсивности и качества освещения одинаково влияют на величины таких показателей, как число морфогенных каллусов и регенерантов на каллус. Спонтанное удвоение хромосом происходит, в том числе, в световую стадию развития каллуса. Качество освещения воздействует на формирование удвоенных гаплоидов разных генотипов неоднозначно. Белый интенсивный свет способствует формированию высокоплоидных растений. Для получения гарантированно высокого, хотя и не максимального, числа продуктивных регенерантов целесообразно использовать белый интенсивный тип освещения. В этом случае спонтанное удвоение происходит у половины (49,4 %) всех регенерантов. При наличии нескольких семян одной труднокультивируемой гибридной комбинации риса целесообразно каллус части из них в андрогенезе *in vitro* освещать фиолетовым светом. В широкомасштабных исследованиях экономически оправдано использование белого интенсивного освещения.

Литература.

1. Ahmadi B., Ebrahimzadeh H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants // *Plant Cell Reports*. 2020. Vol. 39. P. 299–316.
2. Niazian M., Shariatpanahi M.E. *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements // *Euphytica*. 2020. Vol. 216. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-020-02609-7> (дата обращения: 19.10.2020). doi: 10.1007/s10681-020-02609-7.
3. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding / S.L. Dwivedi, A.B. Britt, L. Tripathi, et al. // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. No. 6. P. 812–829. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
4. Goncharova Y.K., Vereshchagina S.A., Gontcharov S.V. *Nutrient media for double haploid production in anther*

- culture of rice hybrids // *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 2019. Vol. 20 (23-24). P. 1215–1223.
5. Esteves P., Belzile F.J. TDZ in cereal gametic embryogenesis // N. Ahmad, M. Faisal (eds.). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2018. P. 159–174.
 6. The Effect of multispectral light emitting diodes (LEDs) on the activation of morphogenic processes in cell culture of rice *Oryza sativa* L. // Y.N. Kulchin, V.N. Zmeeva, E.P. Subbotin, et al. / *Defect and Diffusion Forum*. 2018. Vol. 386. P. 236–243.
 7. The effect of light quality on anther culture of *Citrus clementine* Hort. ex Tan. / M.A. Germana, B. Chiancone, C. Iacona, et al. // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2005. Vol. 27. N 4B. P. 717–721.
 8. Ekiz H., Konzak C.F. Effect of light regimes on anther culture response in bread wheat // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1997. Vol. 50. P. 7–12.
 9. Клицов С.В., Попова О.В., Трусова Ю.В. Интеграция световой обработки в технологию получения дигаплоидов озимой пшеницы // *Земледелие и растениеводство*. 2015. Т. 29. № 12. С. 27–29.
 10. Mishra R., Rao G.J.N. In-vitro androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. // *Rice Science*. 2016. Vol. 23(2). P.57–68.
 11. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) / S.K. Tripathy, D. Swain, P.M. Mohapatra, et al. // *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2019. Vol. 7(02). P. 87–92.
 12. Sarao N.K., Gosal S.S. In vitro androgenesis for accelerated breeding in rice // S.S. Gosal, S.H. Wani (eds.). *Biotechnologies of Crop Improvement*. Vol. 1. Cellular Approaches. Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018. P. 407–435.
 13. Гончарова Ю.К. Генетические основы повышения продуктивности риса. Краснордар: ФГБНУ ВНИИ риса, Просвещение-Юг, 2015. 314 с.
 14. Hooghvorst I., Ribas P., Nogues S. Chromosome doubling of androgenic haploid plantlets of rice (*Oryza sativa*) using antimetabolic compounds // *Plant Breeding*. 2020. Vol. 139. No. 4. P. 754–761. doi: 10.1111/pbr.12824
 15. Илюшко М.В., Ромашова М.В. Регенерационная способность каллусных трансплантантов риса в культуре пыльников *in vitro* // *Аграрный вестник Приморья*. 2018. № 1(9). С. 3–7.
 16. Илюшко М.В., Ромашова М.В. Формирование тетраплоидов риса в андрогенезе *in vitro* // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2020. № 3. С. 14–17.
 17. Барсукова Е.Н., Чибизова А.С. Влияние спектра светодиодного освещения на процесс микроклонального размножения безвирусных растений картофеля различных сортов // *Аграрный вестник Приморья*. 2019. № 1(13). С. 18–22.
 18. Внутрикалусная изменчивость удвоенных гаплоидов риса, полученных в андрогенезе *in vitro* / М.В. Илюшко, М.В. Ромашова, J.-M. Zhang и др. // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. № 3. С. 533–543.
 19. Получение дигаплоидных линий для селекции глютинозного риса / И.А. Сартаева, Б.Н. Усенбеков, А.Б. Рысбекова и др. // *Биотехнология*. 2018. Т. 34. № 2. С. 26–36.
 20. Chen C.C., Chen C.-M. Changes in chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures // *Canadian Journal of Genetic and Cytology*. 1980. Vol. 22. P. 607–614.
 21. Илюшко М.В., Скапцов М.В., Ромашова М.В. Содержание ядерной ДНК в регенерантах риса, полученных в культуре пыльников *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53. №3. С. 531–538.
 22. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD- и ISSR-маркеров / О.И. Кузнецова, О.А. Аш, Г.А. Харитонов и др. // *Генетика*. 2005. Т. 41. №1. С. 71–77.
 23. A comparative cytogenetic study of the rice (*Oryza sativa* L.) autotetraploid restorers and hybrids / L. Luan, X. Wang, W.B. Long, et al. // *Генетика*. 2009. Т. 4. № 9. С. 1225–1233.
 24. Development and characterization of elite doubled haploid lines from two Indica rice hybrids / R. Mishra, G.J.N. Rao, R.N. Rao, et al. // *Rice Science*. 2015. Vol. 22(6). P. 290–299.
 25. Гончарова Ю.К. Наследование признака «отзывчивость на культуру пыльников» у риса // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2008. № 2. С. 40–42.
 26. Cellular dynamics during early barley pollen embryogenesis revealed by time-lapse imaging / D.E.S. Daghma, G. Hensel, T. Rutten, et al. // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00675/full> (дата обращения: 16.05.2020). doi: 10.3389/fpls.2014.00675.

Поступила в редакцию 24.12.2020

После доработки 18.02.2021

Принята к публикации 30.04.2021