

Е.В. БЕЛИНСКАЯ

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН, Харьков
E-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net

ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ



*Проведена оценка изменчивости показателей гаплопродукции в зависимости от условий выращивания растений — доноров пыльников, режима, способа предобработки колосьев и состава питательной среды. Сохранение рангов включенных в эксперимент генотипов по способности к андрогенезу *in vitro* свидетельствует о существенном вкладе генетической составляющей в общую изменчивость и об актуальности изучения механизма генетического контроля признака.*

© Е.В. БЕЛИНСКАЯ, 2010

Введение. Практическая ценность гаплоидных технологий на основе культивирования *in vitro* пыльников и изолированных микроспор, как и любых других биотехнологий растений, определяется возможностью решения с их помощью задач по созданию генотипов с комплексом признаков, представляющих интерес для селекции и генетических исследований.

Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев в зависимости от того, с какой целью создаются гомозиготные линии, возникает необходимость вовлечения в схему гаплоидной селекции либо строго ограниченного количества образцов (высокопродуктивных, источников и доноров определенных признаков), либо больших объемов генетически разнообразного материала. Но независимо от принципа подбора доноров пыльников в большей или меньшей степени проявляется универсальный феномен — генотипическая зависимость морфогенетических процессов, индуцируемых *in vitro* [1–3]. При этом многие сорта, линии и гибриды, используемые для получения гомозиготных линий удвоенных гаплоидов, оказываются весьма сложными биотехнологическими объектами, что нередко приводит к нецелесообразности применения технологий *in vitro* ввиду крайне низкого выхода растений-регенерантов или невозможности их получения.

Многочисленные литературные источники, посвященные теоретическим и методическим аспектам культивирования *in vitro* пыльников, а также изолированных микроспор ячменя и других сельскохозяйственных культур, убедительно свидетельствуют о том, что именно генотипическая зависимость гаплопродукционного процесса является наиболее серьезным препятствием для внедрения гаплоидных технологий в селекцию [4–6]. В связи с этим большое внимание уделяется изучению механизмов генетического контроля экспериментального андрогенеза *in vitro* [7–9]. Кроме того, широкое распространение получили рекомендации по предварительному тестированию исходного материала на регенерационную способность и дальнейшему использованию только отзывчивых форм [10], выделению доноров высокой регенерационной способности [3, 11, 12]. Вместе с тем рекомендуется проведение методических исследований на отзывчивых модельных генотипах [13, 14], что

в комплексе хотя и способствует повышению эффективности метода, но не решает проблему генотипической зависимости. Между тем установлено, что качественные и количественные показатели, характеризующие эффективность индукции гаплоидов в культуре пыльников и изолированных микроспор, в значительной мере подвержены варьированию в зависимости от условий выращивания растений — доноров пыльников [15], предобработки эксплантов при различных температурных режимах [16] и в растворах осмотически или физиологически активных веществ [17, 18], состава питательных сред [19–21] и температурно-светового режима культивирования пыльников [22].

Существенное влияние этих факторов наряду с большими достижениями в области усовершенствования технологий гаплоидной индукции послужили основанием для предположения, что причиной генотипических различий по способности к андрогенезу *in vitro* являются лишь неадекватные условия проведения опыта [23]. При этом постулируется как принципиальная возможность разработки универсальной технологии, позволяющей получать высокие показатели гаплопродукции независимо от происхождения исходного материала [23], так и необходимость оптимизации технологических параметров для определенных генотипов [24, 25].

Но в целом вопрос о стабильности проявления генотипических особенностей морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* в настоящее время нельзя считать окончательно решенным. По нашему мнению, особую актуальность он приобретает в связи с использованием в исследованиях генетических основ андрогенеза *in vitro* современных молекулярно-генетических методов, поскольку необходимым условием молекулярно-генетического маркирования признака является наличие объективных данных относительно его фенотипической и генотипической изменчивости. Однако не менее важны данные о стабильности и изменчивости реакции генотипа в культуре *in vitro* для определения стратегии разработки гаплоидных технологий: универсальной для всех генотипов, для класса генотипов (отзывчивые/неотзывчивые) или для конкретного генотипа.

Цель исследований заключалась в изучении особенностей проявления генотипической зависимости у ярового ячменя по способности к образованию андрогенных структур и растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro* под воздействием условий выращивания исходного материала, режимов и способов его предобработки низкой положительной температурой, состава питательной среды для культивирования пыльников. Кроме того, была проведена сравнительная оценка эффективности отдельных элементов технологии гаплоидной индукции.

Материал и методы. Как модельные генотипы в экспериментах по усовершенствованию технологии получения гаплоидов были использованы сорта ярового ячменя Экзотик, Феникс и линия андрогенного происхождения ДГ00–126, которые характеризуются контрастной способностью к андрогенезу *in vitro*. В частности, сорту Феникс присуща низкая способность к образованию андрогенных структур и растений-регенерантов как зеленых, так и альбиносов. Сорт Экзотик имеет высокий выход новообразований и растений-альбиносов, но низкую частоту регенерации зеленых растений, линия ДГ00–126 — высокое значение всех учитываемых показателей с преобладанием среди регенерантов нормально пигментированных растений. В названии линии (ДГ — «двойной гаплоид» от ДН — doubled haploid) указан год создания (2000 г.) и порядковый номер.

Растения — доноры пыльников выращивали на опытном участке при обычной агротехнике. В настоящей работе обобщены результаты экспериментальных исследований, полученные в 2001–2007 гг., которые различались по комплексу агрометеорологических факторов.

Колосья, содержащие пыльники с вакуолизированными микроспорами (средняя или поздняя фазы), отбирали, используя общепринятые методы цитологического анализа [26]. Схемой опыта предусматривалось: 1) культивирование пыльников трех генотипов на стандартной среде при стандартном способе предобработки в 2001–2007 гг.; 2) различные варианты сред при стандартном способе предобработки (контроль — стандартная среда); 3) использование различных режимов и способов

предобработки с последующим культивированием пыльников на стандартной среде (контроль – стандартный способ предобработки).

Срезанные побеги помещали в воду и выдерживали в холодильнике при температуре 4 °С в течение 5–10 сут (стандартный способ предобработки). Асептическую культуру пыльников получали, как описано ранее [27]. Пыльники культивировали на разработанной нами среде NMSмод.2 (стандартная среда) [27]. Полученные через 20–35 сут после начала культивирования каллус и эмбриониды пересаживали на среду для регенерации растений [29].

В экспериментах по оптимизации холодовой предобработки воздействию низкой положительной температуры подвергали побеги и колосья, которые помещали в растворы маннитола (0,3 и 0,7 М), солей макро- и микроэлементов, 2,4-Д и глюкозы [18, 28].

Для определения влияния факторов «условия выращивания растений (год)», «предобработка» и «состав среды» проводили сравнение многолетних данных (лимиты и средние значения) соответственно: по культивированию пыльников трех генотипов на среде NMSмод.2 при предобработке побегов в воде, по изучению 11 режимов и способов предобработки [18, 28] и оценке 27 вариантов питательной среды, которые различались минеральной основой, стимуляторами роста [30] и гелеобразующими веществами [31–33].

Для количественной характеристики влияния факторов использовали такие показатели: количество морфогенных пыльников, т.е. пыльников, на поверхности которых образовались видимые структуры (каллус, эмбриониды), количество зеленых растений-регенерантов в процентах от общего количества пыльников, высаженных на питательную среду. Экспериментальные данные обработаны при помощи общепринятых методов вариационной статистики [34].

Результаты исследований и их обсуждение. Как видно из представленных в таблице многолетних данных, характер варьирования количественных показателей андрогенеза *in vitro* под воздействием агрометеорологических условий года, режима и способа предобработки, а также состава питательной среды в пол-

ной мере отражал генотипические особенности включенных в эксперимент сортов и линии. При этом размах варьирования зависел от величины показателя. В частности, по количеству морфогенных пыльников наименьшее варьирование, соответствующее самому низкому уровню проявления признака, было отмечено у сорта Феникс. У этого генотипа получено и наименьшее среднее значение по всем изученным факторам.

У сорта Экзотик и линии ДГ00–126 при наиболее благоприятных условиях выращивания донорных растений и в лучших вариантах опытов по усовершенствованию предобработки и состава питательной среды получены сравнительно высокие показатели количества морфогенных пыльников (на уровне 45–60 %). Следует отметить, что у сорта Экзотик наблюдали более существенное снижение показателя в вариантах опытов, в которых было выявлено отрицательное влияние определенных факторов на процесс индукции новообразований.

Аналогичные закономерности варьирования фиксировали и для признака «частота регенерации зеленых растений».

Сопоставление лимитов и средних значений (последний столбец таблицы) свидетельствует в основном о стабильности рангов генотипов по количеству эмбриогенных пыльников и растений-регенерантов, что подтверждает генотипическую зависимость и генетическую обусловленность андрогенеза *in vitro*.

Заслуживает внимания вопрос о наиболее результативном методическом приеме, благодаря которому удалось получить максимальные показатели гаплопродукции у каждого генотипа и в среднем для всех генотипов. В частности, анализ данных таблицы свидетельствует о том, что у сорта Феникс максимальный выход морфогенных пыльников (16,07 и 16,84 %) был получен за счет оптимизации состава питательной среды и предобработки.

Лучшим вариантом питательной среды для этого генотипа оказалась модифицированная среда FHG [23], содержащая уменьшенную в 10 раз концентрацию макроэлементов среды MS [35] и в качестве регулятора роста фенилуксусную кислоту (100 мг/л). У двух других генотипов, обладающих высокой способностью

Изменчивость показателей эффективности гаплопродукционного процесса у ярового ячменя в зависимости от условий года, предобработки и состава искусственной питательной среды для культивирования пыльников *in vitro* (2001–2007 гг.)

Генотип	Источник варьирования						Среднее по генотипу
	Условия выращивания, фактор «год»		Режим и способ холодовой предобработки		Питательная среда		
	min	max	min	max	min	max	
Количество морфогенных пыльников, %							
Феникс	3,08 ± 0,67	10,61 ± 1,15	0,28 ± 0,28	16,07 ± 1,64	2,22 ± 0,83	16,84 ± 1,90	6,56 ± 0,19
Экзотик	33,80 ± 1,88	48,78 ± 1,78	4,15 ± 1,17	45,81 ± 2,63	13,98 ± 1,82	53,96 ± 3,51	34,42 ± 0,38
ДГ00-126	30,03 ± 2,63	60,26 ± 2,51	38,92 ± 2,40	56,88 ± 2,37	22,77 ± 1,87	50,99 ± 3,29	31,34 ± 0,43 **
Среднее ¹	26,37 ± 0,43		18,18 ± 0,36		23,35 ± 0,28 **		—
Среднее ²	36,58 ± 1,11		37,98 ± 1,34		38,90 ± 1,51		—
Частота регенерации зеленых растений, %							
Феникс	0,00 ± 0,00	1,95 ± 0,58	0,00 ± 0,00	10,92 ± 1,40	0,00 ± 0,00	5,60 ± 1,22	1,60 ± 0,09
Экзотик	1,02 ± 0,35	7,47 ± 1,29	0,00 ± 0,00	22,06 ± 2,25	0,00 ± 0,00	32,93 ± 2,98	4,82 ± 0,17 **
ДГ00-126	22,10 ± 2,12	33,63 ± 1,88	33,26 ± 2,26	63,68 ± 2,37	5,52 ± 1,26	52,49 ± 2,88	22,60 ± 0,39
Среднее ¹	7,46 ± 0,26		7,96 ± 0,26		8,66 ± 0,18 *		—
Среднее ²	15,28 ± 0,90 **		31,26 ± 1,30		28,66 ± 1,50		—

Примечание. * Различия между средними значениями частоты регенерации зеленых растений для факторов «год» и «питательная среда» достоверны при $P \leq 0,05$. ** Различия между средними значениями показателей генотипов по трем факторам и трех генотипов по каждому фактору достоверны при $P \leq 0,01$. ¹ — среднее по фактору; ² — среднее по лучшим вариантам опыта. Полужирным шрифтом отмечены максимальные показатели для каждого генотипа.

к андрогенезу *in vitro*, использование этой среды не привело к увеличению выхода андрогенных структур и растений-регенерантов.

При предобработке колосьев в 0,3 М растворе маннитола при 4 °С в течение 10 сут у сорта Феникс была получена не только высокая частота морфогенных пыльников, но и максимальная частота регенерации зеленых растений — $10,92 \pm 1,40$ %. У сорта Экзотик и линии ДГ00–126 при оптимальных параметрах всех трех факторов получены существенно не различающиеся значения частоты морфогенных пыльников.

Для линии ДГ00–126 наиболее эффективным методическим приемом повышения частоты регенерации зеленых растений оказалась предобработка в 0,3 М растворе маннитола при температуре 4 °С и продолжительности 10 сут. В этом случае количество растений возросло с 31,29 до 63,68 %. У сорта Экзотик самое высокое значение частоты регенерации зеленых

растений — 32,93 %, в четыре раза превышающее этот показатель в контроле, было получено на среде NMS_{д2}, которая содержала вместо агар-агара химически модифицированный крахмал Д₂ [32]. Следует отметить, что ни один из использованных методических приемов в рамках конкретного эксперимента (изменение минеральной основы среды, режима и способа предобработки, гелеобразующего компонента, качественного и количественного состава фитогормонов) не привел к нивелированию генотипических различий.

Сравнение средних значений количества морфогенных пыльников и частоты регенерации зеленых растений у трех генотипов по каждому фактору (предпоследние строки таблицы для каждого показателя) показывает, что предобработка привела к снижению количества морфогенных пыльников. Статистически достоверное, но незначительное превышение частоты регенерации зеленых растений было

достигнуто за счет оптимизации состава питательной среды. Однако, анализируя эти результаты, следует учитывать, что для определения влияния фактора был привлечен массив данных всех вариантов опытов, в том числе и тех, где результат был отрицательным.

Средние по лучшим вариантам опыта для каждого фактора (последние строки таблицы для каждого показателя) свидетельствуют о том, что при благоприятных условиях выращивания исходного материала и в наиболее удачных вариантах предобработки и среды по количеству эмбриогенных пыльников получены сравнимые результаты. В то же время применение предобработки колосьев в 0,3 М маннитоле и культивирование пыльников на содержащих крахмал средах, а именно эти варианты оказались лучшими, привело к почти двукратному увеличению частоты регенерации зеленых растений по сравнению со стандартной средой и способом предобработки (фактор «год»).

Но в целом ввиду отсутствия достоверных различий средние показатели не позволили ответить на вопрос, какому методическому приему — оптимизации среды или предобработке — отдать предпочтение при разработке или усовершенствовании гаплоидной технологии. Очевидно, в методическом плане при проведении оценки результативности исследований по усовершенствованию определенного элемента технологии правильнее учитывать данные опытного и контрольных вариантов эксперимента одного года, принимая во внимание агрометеорологические условия и качество исходного материала, а потом проводить испытание лучших вариантов в годы, различающиеся по погодным условиям. При этом в зависимости от поставленных задач имеют право на реализацию различные стратегии оптимизации технологии получения гаплоидов как универсальные, так и предназначенные для работы с определенными генотипами. Это подтверждается возрастанием средних гаплопродукционных показателей и появлением максимумов у отдельных генотипов в ответ на конкретный методический прием.

По нашим наблюдениям при высокой температуре (30 °C и выше) и отсутствии осадков в фазы «выход в трубку» и «колошение», когда

отбирается материал для пыльниковой культуры, следует отдать предпочтение предобработке побегов в воде, ограничив ее длительность 5–6 сут.

Предобработка колосьев в 0,3 М растворе маннитола эффективнее при благоприятных погодных условиях выращивания донорных растений в поле или стандартных режимах климатических камер. И хотя засуха является лимитирующим фактором получения качественного растительного материала для пыльниковой культуры ячменя в условиях Лесостепи и Степи Украины, прямой связи между засухоустойчивостью и способностью к андрогенезу *in vitro* у использованных в этой работе генотипов и других сортов и линий не обнаружено [36].

Вместе с тем у более гомеостатичных форм отмечен меньший размах изменчивости под воздействием элементов технологии гаплоидной индукции, что, возможно, является отражением их неспецифической устойчивости к изменяющимся условиям внешней среды.

Выводы. Проведен анализ многолетних данных по усовершенствованию элементов технологии индукции гаплоидов ярового ячменя в культуре пыльников *in vitro*. Несмотря на большой размах изменчивости показателей гаплопродукции в зависимости от условий выращивания растений — доноров пыльников, режима и способа предобработки колосьев и состава питательной среды и высокую результативность определенных методических приемов, наблюдали сохранение рангов использованных в работе генотипов. Это свидетельствует о важности генетической составляющей в общей изменчивости и актуальности углубленного изучения механизма генетического контроля экспериментального андрогенеза *in vitro*.

E.V. Belinskaya

GENOTYPIC PECULIARITIES
OF MORPHOGENESIS IN BARLEY
IN VITRO ANTHER CULTURE

Evaluation of haploid production indicator variability caused by growth conditions of donor plants, regime and mode of spike pretreatment and nutrient medium composition has been carried out. Maintained ranks of the genotypes involved into experiment show the importance of

genetic component in the whole variability and actuality of profound investigation on the mechanism of genetic control of culture ability.

О.В. Білинська

ПРОЯВ ГЕНОТИПІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ
МОРФОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ
ЯРОГО ЯЧМЕНЮ

Проведено оцінку мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин – донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу живильного середовища. Збереження рангів залучених до експерименту генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro* свідчить про істотність генетичної складової у загальній мінливості та актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Foroughi-Wehr B., Friedt W.* Rapid production of recombinant barley yellow virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture // *Theor. Appl. Genet.* – 1984. – **67**. – P. 377–382.
2. *Thomas W.T.B., Forster B.P., Gertsson B.* Doubled haploids in breeding // *Doubled haploid production in crop plants.* – Dordrecht : Kluw. acad. publ., 2003. – P. 337–349.
3. *Білинська О.В.* Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю // *Наук. вісн. Нац. аграр. ун-ту.* – 2006. – № 100. – С. 13–19.
4. *Luckett D.J.* Doubled haploid production by anther culture for Australian barley breeding // *Austral. J. Agr. Res.* – 1992. – **1**. – P. 67–78.
5. *Castillo A.M., Vallés M.P., Cistué L.* Improvement of barley androgenesis in breeding // *Biotechnological approaches for utilization of gametic cells.* – Luxemburg : Office for Official Publications of the European Communities, 2001. – P. 15–21.
6. *Barnabas B.* Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Doubled haploid production in crop plants.* – Dordrecht : Kluw. acad. publ., 2003. – P. 65–70.
7. *Powell W.* Diallel analysis of barley anther culture response // *Genome.* – 1989. – **30**. – P. 101–109.
8. *Manninen O.M.* Association between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – **100**. – P. 57–62.
9. *Sarrafi A.* Genetic control for embryo and haploid production and potential use of doubled haploid lines for QTLs in Cereals // *Haploids in Higher Plants III: Abstracts of International Conference.* – Vienna, 2006. – P. 28.
10. *Шестопал О.Л., Ігнатова С.О.* Цитологічний моніторинг ефективності морфогенезу в культур пиляків м'якої пшениці для оцінки її здатності до андрогенезу // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 527–531.
11. *Foroughi-Wehr B., Friedt W., Wenzel G.* On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. // *Theor. Appl. Genet.* – 1982. – **62**. – P. 233–239.
12. *Barnabas B.* Anther culture of maize (*Zea mays* L.) Doubled haploid production in crop plants. – Dordrecht : Kluw. acad. publ., 2003. – P. 103–108.
13. *Olsen F.L.* Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. The effect of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources // *Carlsberg Res. Com.* – 1987. – **52**. – P. 393–404.
14. *Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B.* Production haploid in frequencies sufficient for barley breeding programs // *Plant Cell Rept.* – 1989. – **8**, № 2. – P. 110–118.
15. *Foroughi-Wehr B., Mix G.* In vitro response of *Hordeum vulgare* anther culture from plants grown under different environments // *Environm. and Exp. Bot.* – 1979. – **19**, № 14. – P. 303–309.
16. *Huang B., Sunderland N.* Temperature-stress pretreatment in barley anther culture // *Ann. Bot.* – 1982. – **49**. – P. 77–88.
17. *Roberts-Oehlschlager S.L., Dunwell J.M.* Barley anther culture: pretreatment of mannitol stimulates production of microspore-derived embryos // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1990. – **20**, № 3. – P. 235–240.
18. *Білинська О.В.* Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* Т. 3. – К.: Логос, 2006. – С. 437–441.
19. *Sorvari S., Schider O.* Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media // *Plant Breed.* – 1987. – **99**. – P. 161–171.
20. *Hunter C.P.* Plant regeneration method // *Eur. patent application.* – 1987. – № 0245892. – P. 8.
21. *Manninen O.* Optimizing anther culture for barley breeding // *Agricult. and Food Sci. Finland.* – 1998. – **6**. – P. 389–398.
22. *Білинська О.В.* Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro* : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.
23. *Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R.* An improved in vitro technique for microspore culture of barley // *Euphytica.* – 2000. – **120**, № 3. – P. 319–385.

24. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы : Атлас / Отв. ред И.И. Шамров. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
25. Иванов Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур : Автореф. дис.... д-ра биол. наук. — Краснодар, 2006. — 45 с.
26. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
27. Білінська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво. — 2002. — Вип. 86. — С. 164–172.
28. Белинская Е.В. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культур. растений. — 2005. — 37, № 5. — С. 436–442.
29. Белинская Е.В., Наумова Л.Н., Манзюк В.Т. Генотипические особенности индукции гаплоидов в культуре пыльников ячменя // Цитология и генетика. — 1993. — 25, № 5. — С. 84–88.
30. Білінська О.В. Штучні живильні середовища для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 1. — С. 91–98.
31. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культур. растений. — 2007. — 39, № 2. — С. 136–143.
32. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Морфогенетический эффект модифицированных крахмалов в культуре пыльников *in vitro* ячменя // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : Междунар. науч. конф. (Минск, 14–16 мая 2008 г.) — Минск, 2008. — С. 212–216.
33. Пат. 34859 Україна, МПК А 01 G7/00, С 12 N5/00. Спосіб одержання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* / О.В. Білінська, С.М. Тимчук, П.Г. Дульнев, О.Ю. ДЕРЕБІЗОВА. Заявник Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. — № 200803639; заявл. 21.03.08; опубл. 26.08.08; Бюл. № 16. — 4 с.
34. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. — 367 с.
35. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — 15. — P. 473–497.
36. Белинская Е.В. Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1/2. — С. 11–20.

Поступила 18.02.09