

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-5-24-28>
УДК 635.25:631.523:575.224.234

Е.А. Чередниченко^{1,2*},
В.Ф. Пивоваров¹,
С.Ф. Гавриш³, А.Ф. Першин²,
М.В. Будылин³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» 143072, Россия, Московская обл., Одинцовский р-он, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14

²ООО «Семеновод» 353380, Россия, Краснодарский край, г. Крымск, ул. Торговая, д. 5

³ООО «НИИССОК», 127287, Россия, Москва, ул. 2-я Хуторская, д. 11, стр. 1

*Автор для переписки:
elena06031991@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Все авторы участвовали в планировании и постановке эксперимента, а также в анализе экспериментальных данных и написании статьи.

Для цитирования: Чередниченко Е.А., Пивоваров В.Ф., Гавриш С.Ф., Першин А.Ф., Будылин М.В. Эффективность использования удвоенных гаплоидов в селекции лука репчатого (*Allium cepa* L.). *Овощи России*. 2022;(5):24-28. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-5-24-28>

Поступила в редакцию: 14.07.2022

Принята к печати: 30.08.2022

Опубликована: 26.09.2022

Е.А. Cherednichenko^{1,2*},
V.F. Pivovarov¹,
S.F. Gavrish³,
A.F. Pershin², M.V. Budylin³

¹Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Vegetable Center (FSBSI FSVC) 14, Selectionnaya str., VNISSOK, Odintsovo district, Moscow region, Russia, 143072

²Ltd "Semenovod" 5, Torgovaya st., Krymsk, Krasnodar Territory, 353380, Russia

³Ltd Research Institute of Vegetable Crop Selection 11, building 1, 2-Khutorskaya st., Moscow, 127287, Russia

*Corresponding author:
elena06031991@mail.ru

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contribution: All authors confirm they have contributed to the design and performance of the experiment, the analysis of experimental data, and the writing of this paper.

For citations: Cherednichenko E.A., Pivovarov V.F., Gavrish S.F., Pershin A.F., Budylin M.V. Efficiency of the use for doubled haploids in onion breeding (*Allium cepa* L.). *Vegetable crops of Russia*. 2022;(5):24-28. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-5-24-28>

Received: 14.07.2022

Accepted for publication: 30.08.2022

Published: 26.09.2022

Эффективность использования удвоенных гаплоидов в селекции лука репчатого (*Allium cepa* L.)



Резюме

Актуальность. В селекции лука репчатого актуальной задачей является быстрое получение выровненного материала для создания родительских форм гетерозисных гибридов. Классическими методами с помощью беккроссов это достигается за 10-12 лет. Используя технологию удвоенных гаплоидов, можно в несколько раз сократить эти сроки, а также избежать проявления инбредной депрессии при получении линий путем самоопыления. При этом наиболее эффективным в производстве гаплоидов является использование целых цветочных бутонов в качестве экспланта, в отличие от семяпочек и завязей, получение которых более длительно и трудозатратно.

Методика. Удвоенные гаплоиды лука репчатого были получены методом культуры семяпочек на базе лаборатории биотехнологии Селекционного центра «Гавриш» на основе методических рекомендаций Монахоса С.Г. и др., 2014. ДН-растения лука репчатого с развитой корневой системой и листовым аппаратом были высажены в открытый грунт и выращены по общепринятой для зоны технологии на участках селекционного центра «Гавриш», г. Крымск, Краснодарский край. Полученные товарные луковичы оценивали согласно методике RTG/46/2.

Результаты. Удалось получить удвоенные гаплоиды, которые были проверены на плоидность методом проточной цитометрии. Создано 40 дигаплоидных растений лука репчатого. В результате дальнейшего развития после пересадки в открытый грунт, хранения, яровизации и селекционного отбора получены 3 маточные луковичы для последующего размножения и включения в селекционный процесс.

Ключевые слова: лук репчатый (*Allium cepa* L.), ДН-технологии, гиногенез, проточная цитометрия, гетерозисные гибриды

Efficiency of the use for doubled haploids in onion breeding (*Allium cepa* L.)

Abstract

Relevance. In onion breeding, quickly obtain aligned material is an urgent target for create parent forms of heterosis hybrids. Using classical methods with helping of backcrosses, this is achieved in 10-12 years. Using the technology of doubled haploids, it is possible to reduce these terms several times, and also to avoid the manifestation of inbred depression when obtaining lines by self-pollination. At the same time, the most effective in the production of haploids is the use of whole flower buds as an explant, unlike ovules and ovaries, the production of which is more time-consuming and labor-intensive.

Methods. The doubled onion haploids were obtained by the method of ovule culture on the basis of the biotechnology laboratory of the Gavrish Breeding Center using the technology that based on the methodological recommendations of Monakhos S.G. et al., 2014. DH-onion plants with a developed root system and leaf apparatus were planted in the open ground and grown according to the technology generally accepted for the zone at the sites of the Gavrish breeding center, Krymsk, Krasnodar Territory. The obtained commercial bulbs were evaluated according to the RTG/46/2 method.

Results. It was obtain doubled haploids, which were tested for ploidness by flow cytometry. 40 digaploid onion plants have been created. As a result of further development after transplantation into the open ground, storage, springization and selection, 3 uterine bulbs were obtained for further reproduction and inclusion in the breeding process.

Keywords: onion (*Allium cepa* L.), DH-technologies, gynogenesis, flow cytometry, heterosis hybrids

Введение

У лука репчатого при получении линий путем самоопыления проявляется сильная инбредная депрессия. Даже при 2-3 самоопылениях подряд наблюдается существенное снижение урожайности, массы луковицы и т.д. Одним из путей решения этой проблемы является технология получения удвоенных гаплоидов, так как полученные линии при этом имеют высокую генетическую однородность за счет полной гомозиготности всех генов. Другим преимуществом применения данной технологии является существенное сокращение времени, необходимого для создания родительских линий. Из-за того, что лук является двулетней культурой, требуется не менее 10 лет для создания гомозиготной линии путем инбридинга. При применении технологии удвоенных гаплоидов этот срок сокращается до двух лет или в 5-6 раз [1, 2, 3].

У лука репчатого наиболее разработанными являются методики культивирования неоплодотворенных семязачек [4, 5, 6, 7, 8]. Универсальных протоколов для массового производства удвоенных гаплоидов нет, из-за межвидовых и внутривидовых различий [2, 9, 10] определены только основные требования к составу питательных сред [11]. Так, у лука репчатого используют цветковые бутоны за несколько дней до раскрытия, так как это самый эффективный и удобный способ. Оптимальный размер бутонов лука репчатого для высадки на питательную среду составляет 3,8-4,4 мм, так как в них уже содержатся зрелые зародышевые мешки [11, 12].

Подбору регуляторов роста и их концентрации для индукции эмбриогенеза посвящено множество работ. Так, для лука общепринятым является сочетание 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и 6-БАП (бензиламинопурина) в концентрации по 2 мг/л [13].

Для успешного продолжения селекционного процесса необходимо проводить процедуру искусственного удвоения хромосом у полученных гаплоидных растений [14], путем обработки на стадии эмбриоидов колхицином или другими антимиотическими препаратами, такими как оризалин, ампрофосметил и др. [11]. Но цитостатическое действие этих веществ сопряжено с низкой выживаемостью эксплантов и сильной токсичностью [3]. В результате большинство эмбриоидов не переживают данную процедуру, силь-

но ограничивая выход селекционных линий. Для решения этой проблемы сотрудники Селекционного центра «Гавриш» создали инновационный протокол, позволяющий повысить количество получаемых эмбриоидов и, соответственно ДН-линий, лука репчатого [14].

После получения растений, обработанных колхицином, необходимо определить их пloidность, так как они могут быть гаплоидными, диплоидными, химерными. Для этого можно использовать прямой подсчет хромосом, подсчет хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, использовать молекулярные маркеры (сравнить исходное растение с регенерантом и определить их гетерозиготность и гомозиготность), использовать метод проточной цитометрии, учитывающий количество ДНК в каждой клетке [3, 11, 15].

Для дальнейшего развития удвоенные гаплоидные растения необходимо пересадить в открытый грунт. При этом они могут испытывать стресс, поэтому необходимо защитить их от попадания прямых солнечных лучей, болезней, вредителей и сквозняков [13].

Материалы и методы исследований

Удвоенные гаплоиды лука репчатого были получены методом культуры семязачек на базе лаборатории биотехнологии Селекционного центра «Гавриш» с использованием усовершенствованной в центре технологии на основе методических рекомендаций Монахоса С.Г. и др., 2014.

Оценку пloidности проводили методом проточной цитометрии на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter) [16]. ДН-растений лука репчатого с развитой корневой системой и листовым аппаратом были высажены в открытый грунт и выращены по общепринятым для зоны технологиям на участках селекционного центра «Гавриш», г. Крымск, Краснодарский край. Полученные товарные луковицы оценивали согласно методике RTG/46/2 «Оценка на отличимость, однородность и стабильность лука репчатого» [17].

Результаты исследований

Получение ДН-растений. В лаборатории биотехнологии Селекционного центра «Гавриш» были получены удвоенные гаплоиды лука репчатого методом культуры неопыленных семязачек. Для их создания были подобраны 27 наиболее ценных селекционных образ-



Рис. 1. Распределение образцов по степени отзывчивости к эмбриогенезу при культивировании бутонов на питательной среде (метод гиногенеза) по всей совокупности образцов (A), в пределах групп по происхождению (B) и в пределах групп образцов с разным типом популяции (C) за 2017-2018 годы
Fig. 1. Distribution of samples according to the degree of responsiveness to embryogenesis when cultivating buds on a nutrient medium (the method of gynogenesis) over the entire set of samples (A), within groups by origin (B) and within groups of samples with different population types (C) for 2017-2018

цов (рис. 1). Большая часть взятых в работу генотипов оказались неотзывчивыми и не формировали эмбриониды из бутонов на питательной среде, их доля составила 44%.

Остальные образцы разделились примерно поровну – на слабоотзывчивые, у которых средняя частота образования эмбрионидов на 100 бутонов (ЧОЭ) была меньше единицы, и отзывчивые с ЧОЭ более одного эмбрионида – от 1,17 до 3,33 штук на 100 бутонов. В целом отзывчивые были обнаружены среди образцов российской, итальянской и турецкой селекции и один образец из Азии. Образцы из Голландии все оказались неотзывчивыми (рис. 1Б). В пределах образцов с различным типом популяции наименьшее число отзывчивых было среди гибридов F₁ (рис.1В).

Всего в совместной работе лабораторий биотехнологии и селекции луковых культур (или в лаборатории биотехнологии) было получено 162 эмбрионида (0,6% от общего числа бутонов в 28 тыс. шт.), из которых 59 растений (36% от числа эмбрионидов) после обработки колхицином и пересадки в грунт сформировали развитую корневую систему и листовой аппарат. Анализ пloidности методом проточной цитометрии показал, что среди полученных растений только 40 растений являются удвоенными гаплоидами, остальные – гаплоиды или миксоплоиды. Выделенные ДН-растения были переданы в отдел селекции для дальнейшей оценки и получения семенного потомства.

Выращивание ДН-растений и структура полученных луковиц на разных стадиях развития. Для дальнейшего роста и развития, полученные ДН-растения лука репчатого, выращивали в открытом грунте. Во время всего периода выращивания (от севка до уборки

семян) проводили стандартные технологические мероприятия: полив, подкормку минеральными удобрениями, рыхление, прополку, обработку инсектицидами и фунгицидами.

Исходно в апреле было высажено 40 ДН-растений, из них было собрано 35 луковиц севка, остальные поразились болезнями и полностью сгнили (табл.1). После селекционной оценки луковицы были досушены в течение семи суток в вентилируемом помещении, закрытом от прямых солнечных лучей и для лучшей сохранности в зимне-весенний период помещены в холодильник при температуре +4...6°C (табл.1). За весь период хранения полное усыхание луковиц было отмечено у 15 луковиц, вследствие развития болезней: шейковая (*Botrytis alli*) гниль и бактериоз (*Pectobacterium carotovorum*) сгнили 5 луковиц.

В апреле 2020 года все сохранившиеся растения были высажены в открытый грунт. К концу июля маточную луковицу, размером более 3 см, образовали только 9 образцов. Далее маточные луковицы после окончательного созревания и последующей сушки хранили в условиях с температурой +6...8 °С для прохождения стадии яровизации, стимуляции перехода к генеративной стадии развития. После яровизации сохранилось только шесть луковиц (табл.1).

Наибольшие потери после хранения произошли в результате усыхания луковиц, которому подверглись шесть образцов из семи. При этом высокие потери (40%) наблюдаются у образца «Галилео». Также в процессе хранения сгнили пять луковиц, относящиеся к генотипам: Spring joy, Polaks, Цефей, Elenka. Маточную луковицу сформировали только 9 образцов из 20 сохранившихся, общий выход маточных луковиц

Таблица 1. Структура ДН-растений лука репчатого различного происхождения по качеству луковиц на разных стадиях развития, г. Крымск, 2019-2021 годы
Table 1. Structure of onion DH-plants of various origins by bulb quality at different stages of development, Krymsk, 2019-2021

Название исходной популяции ДН-растений	Число луковиц севка, шт.						Число маточных луковиц, шт.					
	выращено, 2019 год			после хранения 2019-2020 годы			выращено, 2020 год			после яровизации 2020-2021 годы		
	всего высажено	больных	заложено на хранение	усохшие	больные	высажено	не сформировали луковицу нужного размера	больные	заложено на яровизацию	усохшие	больные	здоровые
Spring joy	4	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Цефей	3	0	3	0	1	2	1	1	0	0	0	0
Polaks	6	1	5	1	2	2	1	0	1	1	0	0
Галилео	5	0	5	2	1	2	1	1	0	0	0	0
Elenka	11	1	10	2	0	8	4	0	4	0	0	4
Super nova	6	0	6	2	0	4	0	1	3	0	1	2
Derek	5	1	4	2	0	2	1	0	1	0	1	0
Всего	40	5	35	10	5	20	8	3	9	1	2	6

Таблица 2. Сравнительная оценка маточных луковиц исходных образцов и полученных из них DH-линий, г. Крымск, 2020 год
Table 2. Comparative evaluation of the uterine bulbs of the initial samples and the DH-lines obtained from them, Krymsk, 2020

Название исходного образца DH-растений	Окраска сухих чешуй	Форма луковицы	Толщина сухих чешуй	Сцепление сухих чешуй	Масса луковицы, г
F ₁ Elenka	коричневая	округлая	средняя	сильное	136
DH-растение 1	коричневая	округлая	толстая	сильное	130
DH-растение 2	коричневая/желтая	округлая	толстая	сильное	92
DH-растение 3	коричневая	округлая	средняя	сильное	104
DH-растение 4	коричневая	поперечно эллиптическая	средняя	сильное	70
F ₁ Super nova	коричневая	округлая	толстая	сильное	115
DH-растение 5	коричневая/желтая	округлая	средняя	среднее	54
DH-растение 6	коричневая	округлая	средняя	сильное	62

составил 45%. Наибольший выход маточных луковиц отмечен у образца «Super nova» –75%, который также, как и «Elenka» успешно прошел стадию яровизации.

Характеристика полученных маточных луковиц DH-растений по селекционно ценным признакам. В 2021 году получено 6 маточных луковиц DH-растений в пределах двух исходных популяций. Так как каждая полученная луковица очень ценна для дальнейшего исследования, то в целях сохранения селекционного материала сравнительная оценка между исходными образцами и полученными из них DH-линиями была проведена только по ряду морфологических признаков, из биометрических признаков учитывалась только масса луковицы (табл. 2).

По всем параметрам исходному образцу (F₁ Elenka) больше всего соответствует DH-растение 1, меньшей

массой луковицы обладает DH-растение 3. Отличие по окраске сухих чешуй, их толщине и массе луковицы наблюдается у DH-растения 2. Из всех полученных образцов DH-растение 4 имеет самую низкую массу луковицы, а также выделяется по форме. У всех DH-растений, полученных из образца F₁ Super nova, масса луковицы в два раза меньше исходного образца, по остальным параметрам DH-растение 6 соответствует своему родоначальнику, DH-растение 5 отличается по окраске, а также имеет более низкие показатели по толщине сухих чешуй.

На рисунке 2А родоначальниками луковиц DH-растений под номерами 1-4 является «Elenka», под номерами 5 и 6 – «Super nova». Для дальнейшей работы были отобраны только те, которые имели округлую форму луковицы однородно темного цвета (рис.2 Б).

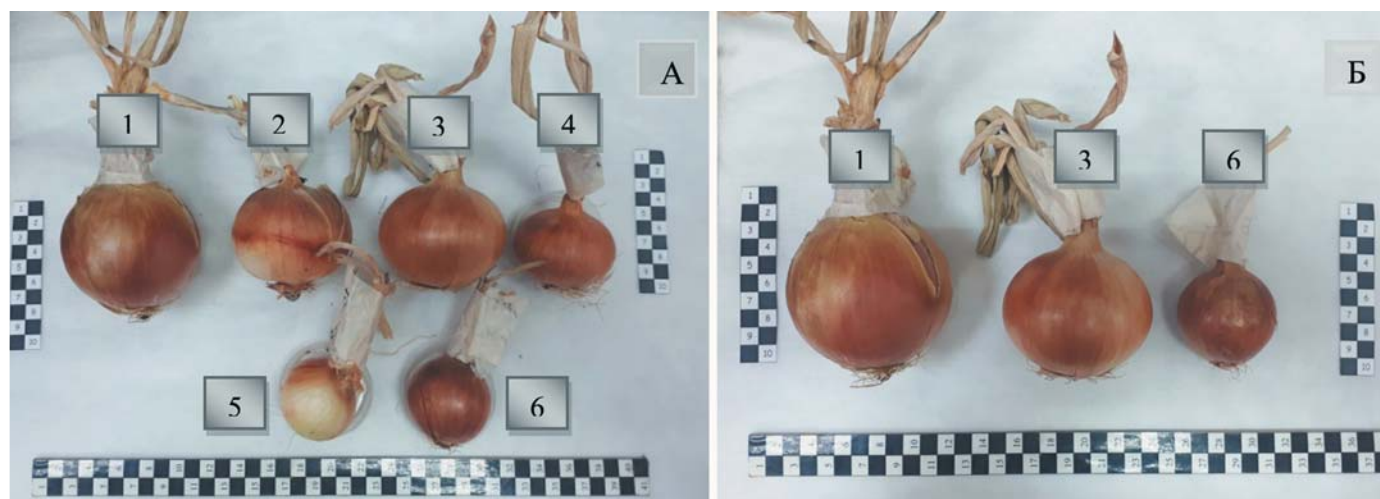


Рис. 2. Маточные луковицы DH-растений лука репчатого, прошедшие яровизацию (А) и маточные луковицы, отобранные для дальнейшего использования (Б), г. Крымск, 2020 год
Fig. 2. Uterine bulbs of DH-onion plants that have undergone vernalization (A) and uterine bulbs that selected for further use (B), Krymsk, 2020

Заклучение

Таким образом, из 27 исходных образцов лука репчатого отзывчивыми на питательные среды оказались 56% растений (из которых только 26% растений с частотой образования эмбриоидов > 1%).

Всего из 28 тыс. бутонов получено 162 эмбриоида (0,6% от общего числа бутонов) из которых сформировалось, выращено 59 растений с развитой корневой системой и листовым аппаратом. Из них удвоенными гаплоидами являются 40 растений (68%).

Для дальнейшего размножения и включения в селекционный процесс после хранения, яровизации и

отбора получены 3 маточные луковицы (7,5% от общего числа DH-растений), которые относятся к 2 генотипам: «Elenka» и «Super nova».

Такой небольшой выход конечной продукции обусловлен самой природой удвоенных гаплоидов: при общем количестве генов у лука более 27000 создание гомозиготной линии, полностью лишенной летальных и полуметальных аллелей, происходит с частотой не более чем 1/5000 (отношение числа полученных линий к числу посаженных бутонов). Однако скорость создания гомозиготных отцовских форм гибридов при таком подходе повышается в 5-6 раз.

Об авторах:

Елена Александровна Чередниченко – аспирант, научный сотрудник лаборатории луковых культур ООО «Семеновод», автор для переписки, elena06031991@mail.ru

Виктор Федорович Пивоваров – доктор с.-х. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ ФНЦО, pivovarov@vniissok.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9522-8072>

Сергей Федорович Гавриш – доктор с.-х. наук, профессор, научный руководитель НИИСОК, sf@gavrish.ru

Александр Федорович Першин – кандидат биол. наук, заведующий лабораторией биотехнологии, afpershin@mail.ru

Михаил Вячеславович Будылин – кандидат биол. наук, зам. директора НИИСОК по биотехнологии, budylinmw@gmail.com

About the authors:

Elena A. Cherednichenko – Postgraduate Student, Researcher of the Laboratory of Onion Crops of Semenovod LLC, Corresponding author, elena06031991@mail.ru

Victor F. Pivovarov – Doc. Sci. (Agriculture), Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor, pivovarov@vniissok.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9522-8072>

Sergey F. Gavrish – Doc. Sci. (Agriculture), professor, sf@gavrish.ru

Alexander F. Pershin – Cand. Sci. (Biology),

Mikhail V. Budylin – Cand. Sci. (Biology), Deputy Director, budylinmw@gmail.com

• Литература

1. Монахос С.Г. Интеграция современных биотехнологических и классических методов в селекции овощных культур. Москва, 2016. 35 с.
2. Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П., Пивоваров В.Ф. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы в селекции овощных культур (к 95-летию ВНИИССОК). *Сельскохозяйственная биология*. 2015;50(5):561-570.
3. Khan P.S.S.V., Vijayalakshmi G., Raja M.M., Naik M.L., Germanà M.A., Terry R.G. Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;142(1):1-22.
4. Bohanec B., Rabinowich H.D., Currah L. *Allium* Crop Science: Recent Advances. L: CABI. 2002;(7):145-157.
5. Bohanec B., Jakse M., Ihanb A., Javornik B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*. 1995;(104):215-224.
6. Campion B., Azzimonti M.T., Vicini E. et al. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science*. 1992;(86):97-104.
7. Jakse M., Havey M.J., Bohanec B. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Rep.* 2003;(21):905-910.
8. Sulistyaningsih E., Aoyagi Y., Tashiro Y. Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. aggregatum group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;(86):249-255.
9. Пивоваров В.Ф., Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П. Биотехнологические приемы в селекции овощных культур. *Овощи России*. 2011;(3):10-17. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2011-3-10-17>
10. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2011;104(3):301-309.
11. Монахос С.Г., Богданова В.Д., Ветчинкина Е.М. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов лука репчатого (*Allium cepa* L.) и селекция F₁ гибридов на основе современных методов биотехнологии. Методические указания. Москва, 2014. 44 с.
12. Dhatt A.S., Thakur P. Production of doubled haploids in onion: A review. *Journal of Horticultural Sciences*. 2014;9(2):107-112.
13. Коршунова А.Д., Будылин М.В., Першин А.Ф. Основные этапы получения дигаплоидных линий овощных культур. *Гавриш*. 2017;(6):20-25.
14. Будылин М.В. Инновации внутри инноваций. *Вестник овощевода*. 2020;(5-6):2-5.
15. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*. 2010;(8):377-424.
16. Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Flow cytometry with plants: an overview. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. 2007. P.41-65.
17. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Лук репчатый (*Allium cepa* L.) и лук шалот (*Allium ascalonicum* L.). *Офици. бюл. гос. комис. РФ по испытанию и охране селекционных достижений*. 2000;(7):528-547.

• References

1. Monakhos S.G. Integration of modern biotechnological and classical methods in the selection of vegetable crops. Moscow, 2016. 35 p. (In Russ.)
2. Shmykova N.A., Suprunova T.P., Pivovarov V.F. Biotechnological and molecular genetic methods in the selection of vegetable crops (to the 95th anniversary of VNISSOK). *Agricultural biology*. 2015;50(5):561-570. (In Russ.)
3. Khan P.S.S.V., Vijayalakshmi G., Raja M.M., Naik M.L., Germanà M.A., Terry R.G. Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;142(1):1-22.
4. Bohanec B., Rabinowich H.D., Currah L. *Allium* Crop Science: Recent Advances. L: CABI. 2002;(7):145-157.
5. Bohanec B., Jakse M., Ihanb A., Javornik B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*. 1995;(104):215-224.
6. Campion B., Azzimonti M.T., Vicini E. et al. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science*. 1992;(86):97-104.
7. Jakse M., Havey M.J., Bohanec B. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Rep.* 2003;(21):905-910.
8. Sulistyaningsih E., Aoyagi Y., Tashiro Y. Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. aggregatum group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;(86):249-255.
9. Pivovarov V.F., Shmykova N.A., Suprunova T.P. Biotechnological approaches to vegetable crop breeding. *Vegetable crops of Russia*. 2011;(3):10-17. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2011-3-10-17>
10. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2011;104(3):301-309.
11. Monakhos S.G., Bogdanova V.D., Vetchinkina E.M. Creation of pure lines - doubled onion haploids (*Allium cepa* L.) and selection of F₁ hybrids based on modern biotechnology methods. Methodical instructions. Moscow, 2014. 44 p. (In Russ.)
12. Dhatt A.S., Thakur P. Production of doubled haploids in onion: A review. *Journal of Horticultural Sciences*. 2014;9(2):107-112.
13. Korshunova A.D., Budylin M.V., Pershin A.F. The main stages of obtaining diploid lines of vegetable crops. *Gavrish*. 2017;(6):20-25. (In Russ.)
14. Budylin M.V. Innovations within innovations. *Bulletin of the vegetable grower*. 2020;(5-6):2-5. (In Russ.)
15. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*. 2010;(8):377-424.
16. Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Flow cytometry with plants: an overview. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. 2007. P.41-65.
17. Methodology of testing for distinctness, uniformity and stability. Onion (*Allium cepa* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.). *Official byul. gos. komis. RF on testing and protection of breeding achievements*. 2000;(7):528-547. (In Russ.)