

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАПЛОИНДУКТОРОВ В СЕЛЕКЦИИ КУКУРУЗЫ

Асадова Г.М.¹, Ульянов А.В.¹, Карлов М.В.²,
Хатефов Э.Б.^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ haed1967@rambler.ru

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Обнаружение спонтанно образовавшихся гаплоидных растений и разработка способов получения их в культуре *in vitro* определили новое направление, важное для селекции и для теоретических исследований в области репродуктивной биологии. Частота спонтанной гаплоидии в посевах культурных растений крайне низка и составляет не более 0,01-0,1%, поэтому поиск источников и доноров, способных к стимулированию гаплоидии в гибридных комбинациях, весьма актуален. Расширение поиска новых доноров признака гаплоиндукции, создание новых, более эффективных гаплоиндукторов способствует накоплению генетических источников, характеризующихся высоким ресурсным потенциалом для селекционно-генетических исследований. Причины, способствующие стимулированию гаплоидии, еще недостаточно изучены. Есть сведения, что за этот процесс ответственны гены, локализованные в *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* районах хромосомы 1 кукурузы. Использование генов, стимулирующих гаплоиндукцию кукурузы в сочетании с маркерным геном антоциановой окраски зерновки и зародыша *RI-nj*, а также антоциановой окраски растения *AI* и *BI*, позволило создать линии-гаплоиндукторы с частотой стимулирования гаплоидов до 15%. Фенотипическое проявление доминантных аллелей генов маркерной антоциановой окраски на различных частях гибридного растения, а также на зерновке и зародыше способствует качественному отбору гаплоидных зерновок на початке за счет проявления рецессивных аллелей этих генов на гаплоидном уровне. Наличие в кремнистой кукурузе генов подавителей синтеза антоцианов (*C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*) ограничивает использование гена *RI-nj* на других представителях подвидов кремнистой кукурузы. Для преодоления данной проблемы ведутся исследования по созданию гаплоиндукторов, у которых маркерным признаком служит содержание масла в зерне или отсутствие лигулы на листьях. Использование матроклинного и андроклинного типов гаплоиндукции позволяет селекционерам получать в высокой степени гомозиготные дигаплоидные линии кукурузы как с материнским, так и с отцовским геномом. Благодаря этим достижениям стало возможным сокращение материальных и временных затрат на создание инбредных линий и их стерильных аналогов в 5 и более раз, ускорилась селекционная работа по созданию новых гибридов кукурузы, значительно улучшилось качество семеноводческой продукции, ее типичность и однородность. Приведенные в статье материалы помогут селекционерам и генетикам лучше ориентироваться в инновационных направлениях и проблемах селекции гибридной кукурузы.

Ключевые слова: гаплоиндукторы кукурузы, дигаплоидные линии, гомозиготность, колхицинирование, гибридная селекция, частота гаплоидии.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-2-03>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

THE PROSPECTS FOR USING HAPLOINDUCERS IN MAIZE BREEDING

Asadova G.M.¹, Ulyanov A.V.¹, Karlov M.V.²,
Khatfov E.B.^{1*}

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ haed1967@rambler.ru

²National Research N.G. Chernyshevsky Saratov State University, 83 Astrakhanskaya Street, Saratov 410012, Russia

The discovery of spontaneous haploid plants and the development of ways to produce them in *in vitro* culture have set a new direction important for breeding and for theoretical research in reproductive biology. The frequency of spontaneous haploidy in cultivated plants is extremely low and does not exceed 0.01-0.1%, therefore, the search for sources and donors capable of stimulating haploidy in hybrid combinations is of current interest. Expansion of the search for new sources and donors of the haploinduction trait, the creation of new, more effective haploinducers contribute to the accumulation of scientific information and genetic sources, characterized by a high resource potential for selection and genetic research. The causes of haploidy are not well understood yet. According to the available information, the genes localized in the *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* regions of chromosome 1 in maize are responsible for this process. The use of genes that stimulate haploinduction in maize in combination with the marker gene *RI-nj* responsible for anthocyanin coloration of the caryopsis and embryo, as well as genes *AI* and *BI*, which are in control of the entire plant coloration, allowed the creation of haploinducer lines with a frequency of haploid stimulation up to 15%. Phenotypic expression of dominant alleles of the marker anthocyanin coloration genes in different parts of a hybrid plant, as well as in the caryopsis and embryo, contributes to the high-quality selection of haploid kernels in the cob due to the manifestation of recessive alleles of these genes at the haploid level. The presence of anthocyanin synthesis suppressor genes in siliceous maize (*C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*) restricts the use of the *RI-nj* gene in other representatives of siliceous maize. In order to overcome this problem, studies are underway to create other genotypes of haploinducers, which are not associated with the anthocyanin coloration of the caryopsis, but instead have other marker traits, such as the oil content in the kernel, the absence of ligules in the leaves, and root coloration in seedlings. The use of matroclinous and androclinous types of haploinduction allows breeders to obtain highly homozygous dihaploid maize lines, with both the maternal and paternal genomes. These achievements made it possible to cut five or more times the material and time inputs into the creation of inbred lines and their sterile analogs, accelerate the breeding of new maize hybrids, and significantly improve the quality of seed production in terms of typicality and uniformity. The materials presented in the article should help breeders and geneticists to learn more about the innovative directions and problems of hybrid maize breeding.

Key words: maize haploinducers, dihaploid lines, homozygosity, colchicination, hybrid selection, haploidy frequency.

Для цитирования: Асадова Г.М., Ульянов А.В., Карлов М.В., Хатефов Э.Б. Перспективы использования гаплоиндукторов в селекции кукурузы. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(2):16-29. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-03

For citation: Asadova G.M., Ulyanov A.V., Karlov M.V., Khatfov E.B. The prospects for using haploinducers in maize breeding. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2):16-29. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-2-03

ORCID:

Khatfov E.B. <https://orcid.org/0000-0001-5713-2328>

УДК 633.15:631.52.524:631.527

Поступила в редакцию: 31.08.2020

Принята к публикации: 05.11.2020

Введение

Кукуруза – третий по экономическому значению хлебный злак в мировом земледелии, в этом немаловажную роль сыграло ее постоянное селекционно - генетическое улучшение, и, в частности, создание гибридов кукурузы на основе инбредных родительских линий. Интенсивное внедрение в промышленное семеноводство гетерозисных гибридов с середины XX века способствовало массовому созданию инбредных линий по всему миру. На создание линий с долей гомозиготных селекционно значимых локусов в геноме равной 99,9% селекционер затрачивает 10 лет, а с долей гомозиготных локусов 99,99% - до 14 лет работы по самоопылению (инцухту) растений. Для получаемых гетерозисных гибридов очень важно достижение высокой доли гомозиготности у исходных родительских линий, поскольку от её значения зависит выровненность селекционно ценных признаков, синхронность наступления фенологических фаз развития растений и их созревание, что в свою очередь отражается на их технологичности в семеноводстве и промышленном производстве товарной продукции. Гибриды, созданные на осно-

ве инбредных линий, полученных с помощью инцухта, не позволяют семеноводческим компаниям и аграриям достигнуть абсолютной выровненности по селекционно ценным признакам, дружности всходов и созревания, одинаковой отзывчивости на агротехнику.

Первые гаплоидные растения, обнаруженные в 1922 г. Блэкли (Blakeslee et al., 1922) с соавторами, а также полученные Гуха и Магешвари в 1964 г. в культуре *in vitro* (Guha, Maheshwari, 1964), определили новое и важное направление для селекции и теоретических исследований в области репродуктивной биологии. Настоящий прорыв в селекции гибридов кукурузы и их родительских линий был совершен благодаря открытию Чейзом (Chase, 1949) метода гаплоиндукции. Это открытие послужило толчком к созданию первых гаплоиндукторов и созданию инбредных линий (дигаплоидных линий) с высоким уровнем гомозиготности, которые получали в результате митотического удвоения числа хромосом у гаплоида. Первые дигаплоидные (DH) линии кукурузы показали 100% гомозиготность по всем аллелям селекционно ценных генов, которая была достигнута отбором в течение двух циклов репродукции (рис. 1). При этом возросла фенотипиче-

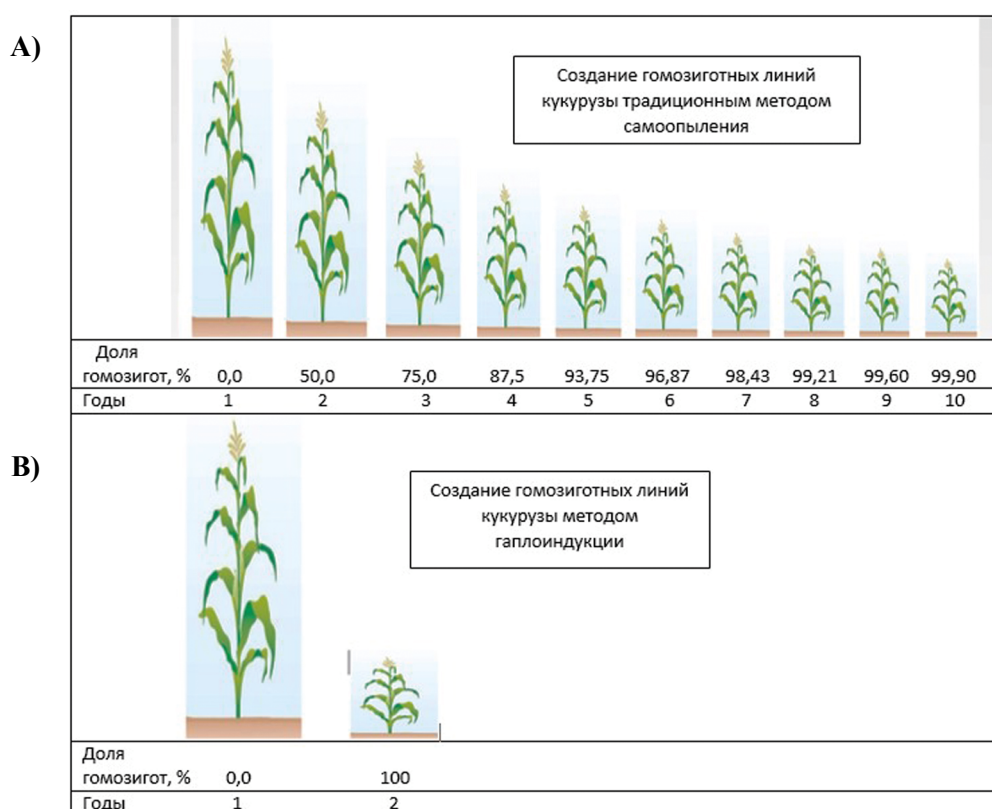


Рис. 1. Возрастание доли гомозигот в ряду поколений гибридов кукурузы в результате А) самоопыления (инцухта) и В) гаплоиндукции.

Fig. 1. Increase in homozygote fraction in several generations of maize hybrids as a result of А) self pollination (inzucht) and В) haploinduction.

ская однородность родительских линий гибридов кукурузы по всем признакам и, как следствие этого, технологичность созданных на их основе гибридных комбинаций (Mayor, Bernardo, 2009). В конце XX века началось распространение метода гаплоиндукции с целью массового получения ДН линий кукурузы по всему миру, в том числе и в России (Shatskaya, 2010a,b). Первые исследования по гаплоиндукции кукурузы были начаты в СССР В.С. Тырновым, А.Н. Завалишиной, Н.Х. Еналеевой в Саратовском университете под руководством проф. С.С. Хохлова. (Khokhlov, 1976; Tyrnov, Zavalishina, 1984). Ими были созданы первые отечественные гаплоиндукторные линии кукурузы.

Гаплоидия и механизм возникновения гаплоидов

У цветковых растений гаплоидия является результатом развития зародыша из редуцированных (гаплоидных) гамет или из родственных им гаплоидных клеток путем апомиксиса, т. е. без оплодотворения. Развитие гаплоидного зародыша возможно в случае элиминации хромосом одного из родительских видов в эмбриогенезе после оплодотворения и образования зиготы при межвидовой гибридизации, например, как в случае скрещиваний культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. (2x) с ячменем луковичным *H. Bulbosum* L. (2x) (Kasha, Kao, 1970; Hayes, et al., 2003; Devaux, 2003; Mishutkina et al., 2013). Гаплоидия встречается более чем у 150 видов растений из 70 родов 33 семейств (в том числе из семейства злаков, паслёновых, орхидных, бобовых и др.). Гаплоидия обнаружена у всех основных культурных растений: пшеницы, ржи, кукурузы, риса, ячменя, сорго, картофеля, табака, хлопка, льна, свёклы, капусты, тыквы, огурцов, томатов; у кормовых трав: мятликов, костра, тимофеевки, люцерны, вики и др. (Kirillova, 1966). В результате проявления гаплоидии у диплоидных цветковых растений формируются семена (у злаков – зерновки) с гаплоидным набором хромосом в тканях зародыша, из которых при прорастании развиваются гаплоидные растения (Kimber, Riley, 1963; Magoon, Khanna, 1963).

Экспериментальное получение гаплоидов с использованием гаплоиндукторов основывается на двух типах нарушения оплодотворения цветковых растений – андрогенезе и гиногенезе.

1. Андрогенез – развитие организма только за счёт ядерного материала мужской гаметы, внесённого спермием в яйцеклетку в процессе оплодотворения. При этом ядерный материал яйцеклетки не сливается с мужским и элиминируется, оплодотворение при этом относится к псевдогамному (ложному) типу. Потомство, полученное путем андрогенеза, наследует гаплоидный или дигаплоидный (при спонтанном удвоении числа хромосом) генетический материал и признаки только отцовской формы (Astaurov, 1977; Darevsky et al., 1985; Golubovsky, 2000).

2. Гиногенез – одна из форм партеногенеза (апомиксиса) при котором проникновение спермия в яйцеклетку не завершается слиянием ядерного материала гамет, и в последующем развитии участвует только ядро яйцеклетки. Спермий может не проникнуть в яйцеклетку и, в таком случае, выступит в качестве стимулирующего агента для развития яйцеклетки. Организм, формирующийся путем гиногенеза несет гаплоидный или дигаплоидный (при спонтанном удвоении числа хромосом) материал материнского растения и наследует признаки только материнской формы (Wilson, 1936; Astaurov, 1966; Strunnikov, 1998).

Возникновение гаплоидных генотипов у кукурузы в естественных условиях происходит очень редко, вследствие нарушения процессов слияния ядра одного из спермиев с яйцеклеткой либо элиминации одного из спермиев, проникающих в зародышевый мешок в процессе оплодотворения (Tyrnov, Khokhlov, 1974; 1976). Второй спермий, успешно слившись с центральным ядром зародышевого мешка, образует триплоидное ядро, которое начинает серию интенсивных митотических делений, за которыми следует формирование вокруг зародыша триплоидной ткани эндосперма зерновки. Интенсивный рост и накопление в эндосперме крахмала стимулирует партеногенетическое развитие гаплоидной ткани из неоплодотворенной яйцеклетки и способствует формированию гаплоидного зародыша. Частота возникновения спонтанной гаплоидии у каждого вида растений специфична и чаще всего сохраняется низкой, не превышая 1%. У кукурузы частота спонтанной гаплоидии составляет в среднем 1/1000 (Chase, 1969). После осознания селекционерами перспективности применения гаплоидии в селекционных исследованиях, гаплоидная технология начала интенсивно развиваться. Первые успешные опыты по регенерации гаплоидных растений *in vitro* в культуре незрелых пыльников дурмана (*Datura innoxia* Mill.) были получены Гуха и Магешвари в 1964 году (Guha, Maheshwari, 1964). Вслед за этим открытием были получены *in vitro* гаплоиды табака (*Nicotiana tabacum* L.) (Nakata, Tanaka, 1968, Nistch, 1969) и риса (*Oryza sativa* L.) (Niizeki, Oono, 1968). Позднее группой исследователей в культуре пыльников были получены первые гаплоиды пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (Ouyang et al., 1973; Picard, Buysier, 1973). Получению гаплоидов пшеницы методом культуры изолированных микроспор было посвящено несколько исследовательских работ, показавших ее эффективность (Wei, 1982; Datta, Wenzel, 1987; Mejza et al., 1993; Tuvesson, Öhlund, 1993). Гаплоиды также получают, используя методы отдаленной гибридизации с диким ячменем (*Hordeum bulbosum* L.) и кукурузой (*Zea mays* L.) (Barclay, 1975; Laurie, Bennett, 1986; Inagaki, Tahir, 1990).

Некоторые генотипы кукурузы, накапливая определенные мутации, характеризуются из поколения в поколение повышенной частотой партеногенеза и способны индуцировать гаплоидию на материнских початках

при гибридизации с другими генотипами. Селекционеры на основе таких мутантных линий создают гаплоиндукторы для получения матроклиных гаплоидных зерновок (Сое, 1959; Khokhlov, 1976). На гибридных початках кукурузы селекционеру трудно отличить зерновки с диплоидным зародышем от гаплоидных, поэтому для упрощения идентификации гаплоидных зерновок на початке впервые в США С. Чейзом в 1949 г. (Chase, 1949) был предложен метод генетического маркирования. Суть метода генетических маркеров заключается в том, что в гибридном потомстве от таких скрещиваний мы можем наблюдать фенотипическое проявление доминантных аллелей генов, тогда как у матроклиных гаплоидов проявляются рецессивные (Gutorova et al., 2016). Отцовская форма (гаплоиндуктор) должна нести доминантные аллели с эффектами, хорошо визуализируемыми на зерновках или проростках, а материнская (донор) рецессивные аллели. Такое маркирование упрощает работу селекционера и позволяет эффективно выбраковывать все зерновки и пророст-

ки с доминантными проявлениями признаков (гибридные) и отбирать только гаплоидные, у которых их нет. На основе предложенного С. Чейзом метода маркирования, существенно упростивших эту технологию, был создан целый ряд гаплоиндукторов (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969).

Гаплоиндукторы кукурузы представляют собой специализированные, высокофертильные линии, которые в результате гибридизации с диплоидным растением способствуют формированию гаплоидной зерновки, а также формируют на его початке гибридные диплоидные зерновки. Благодаря определенной частоте гаплоиндукции, являющейся следствием нарушения функциональности одного из спермиев у гаплоиндуктора, часть зерновок на початке материнского растения имеет гаплоидное число хромосом в зародыше. При этом формируется полноценный триплоидный гибридный эндосперм, который развивается одинаково как в зерновках с гаплоидным, так и с диплоидным зародышем (Сое, Sarkar, 1964).

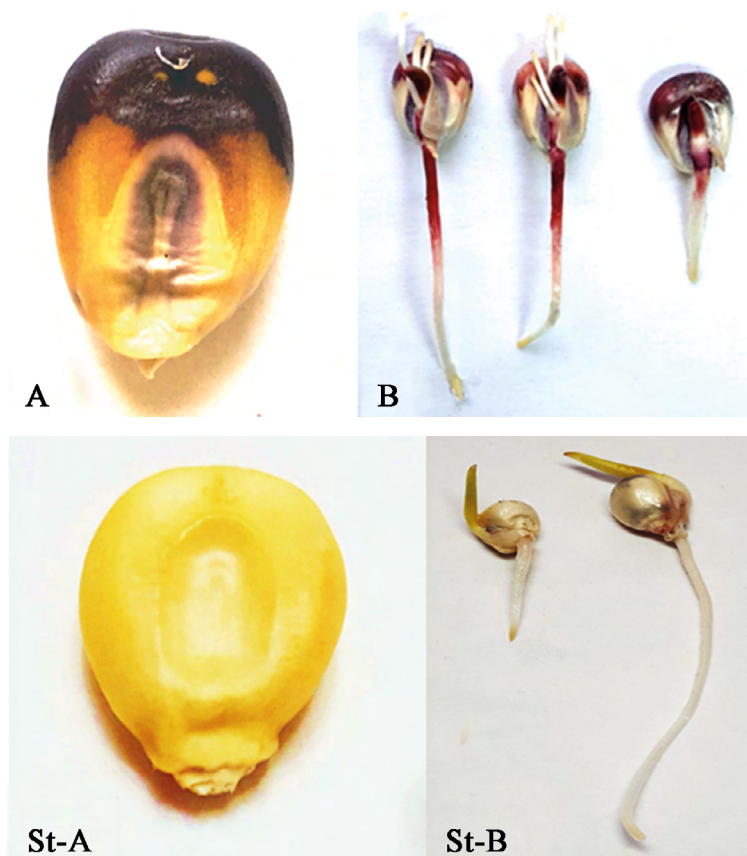


Рис. 2. Фенотипическое проявление эффекта гена *R-nj* в зерновке (А) и генов *B1* и *P11* в проростках (В) гаплоиндуктора кукурузы в сравнении с контрольной зерновкой (St-A) и проростками (St-B) без окраски.

Fig. 2. *R-nj* gene phenotypic manifestation in the caryopsis (A) and of the *B1* and *P11* genes in seedlings (B) of maize haploinducer in comparison with the control caryopsis (St-A) and seedlings (St-B) without color.

Частота формирования гаплоидных зерновок на гибридных початках зависит от гаплоиндуцирующей способности применяемого гаплоиндуктора, генотипа материнского растения и условий окружающей среды. Определение гаплоидности той или иной зерновки на початке осуществляют визуально по проявлению специфических маркерных генов, доминантные эффекты которых проявляются в виде антоциановой окраски частей зерновки, зародыша, проростков и некоторых частей растения (рис. 2).

Наиболее распространенными генами, используемыми в современных гаплоиндукторах кукурузы, являются гены локализованные в районах *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* хромосомы 1 (Hu et al., 2016), в сочетании с маркерным геном

антоциановой окраски зерновки и зародыша *R1-nj*, а также антоциановой окраски растения *A1* и *B1*. Источником доминантного маркера окраски у гаплоиндукторов служит генетический комплекс *R1 - Navajo (R1-nj)*, который экспрессируется в алейроне (самом внешнем слое эндосперма кукурузы), а также в зародыше (щитке), в отличие от иных генотипов, у которых обычно не проявляется какая-либо антоциановая окраска в зародыше или эндосперме. Таким образом, ген *R1-nj* в качестве доминантного маркера окраски помогает отличать гаплоидные зерновки (окрашенные зерновки и неокрашенные щиток с зародышем) от диплоидных (окрашенные как зерновки, так и щиток с зародышем) (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969) (рис. 3).



Рис. 3. Примеры гаплоидных, без окраски щитка и зародыша (отмечено стрелками), зерновок среди диплоидных, с окрашенными щитком и зародышем, гибридных зерновок на початках материнского растения.

Fig. 3. Samples of haploid caryopses, with colorless scutellum and embryo (marked with arrows), among diploid hybrid ones, with colored scutellum and embryo, in the cobs of the mother plant.

Следует отметить, что экспрессия маркерного гена окраски *R1-nj* может значительно варьировать в зависимости от генетического фона материнской линии, используемой для гибридизации, генотипа самого гаплоиндуктора, а также факторов окружающей среды (рис. 4) (Chase, 1952; Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011).

Отдельные зерновки, формирующиеся на початке в процессе гибридизации и не имеющие какой-либо маркерной окраски, относят к случайному загрязнению

селекционного материала. Несмотря на эффективность маркирования гаплоидных зерновок рецессивной аллелью гена *R1-nj* вследствие отсутствия доминантной аллели гаплоиндуктора, метод имеет свои недостатки. В случае, если у донора присутствуют доминантные аллели генов *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*, ингибирующие синтез антоцианов, то проявление маркирующих свойств гена *R-nj* на зерновках, зародыше или корешках может быть полностью подавлено (рис. 5) (Сое, 1994).



Рис. 4. Проявление гена *R-nj* в зерновках, сформированных на початках разных гаплоиндукторов кукурузы. В верхнем ряду представлены зерновки с максимальной, в нижнем ряду зерновки с минимальной экспрессией маркерных генов антоциановой окраски.

Fig. 4. *R-nj* gene expression in caryopses formed in the cobs of different maize haploinducers. Upper row: kernels with the maximum expression; lower row: kernels with the minimal expression of anthocyanin marker genes.

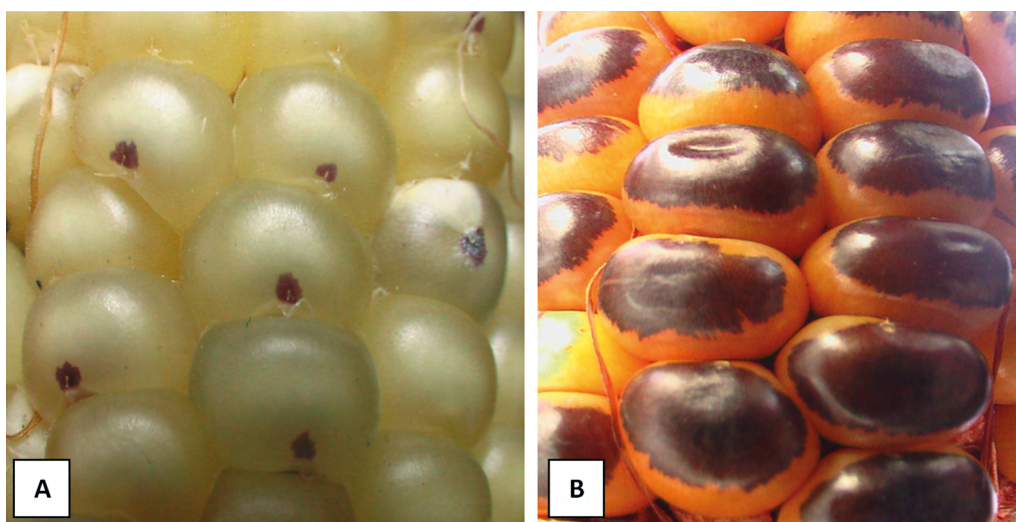


Рис. 5. Ингибирование генами *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* фенотипического проявления гена *R-nj* (гена антоциановой окраски в эндосперме зерновки) у кремнистой кукурузы (А) в сравнении со стандартом (В).

Fig. 5. Inhibition of the *R-nj* gene phenotypic manifestation (anthocyanin marker for kernel endosperm) by the *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* genes in siliceous maize (A) in comparison with the standard (B).

Исследования, проведенные в Международном центре улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT) в Мексике, позволили предположить, что экспрессия гена антоциановой окраски *R1-nj* ингибируется в пределах 8% скрещиваний между гаплоиндукторами в комбинациях с различными генотипами кукурузы (Röber et al., 2005; Prasanna et al., 2012). В.А. Ротаренко с соавторами (Rotarencu et al., 2010) предложили ввести в геном гаплоиндукторов гены *B1 (Booster1)* и *P11 (Purple1)* с эффектами синтеза антоцианов, которые приводят к независимой от солнечного света пурпурной пигментации в растительной ткани (колеоптиле и корне в тех случаях, когда отбор гаплоидов невозможен на стадии сухих семян (Rotarencu et al., 2010)). В этом случае пигментация колеоптиле или корня на проростках указывает на диплоидный (гибридный) генотип, а проростки без пигментации относят к гаплоидам (Geiger, Gordillo, 2009; Rotarencu et al., 2010). Для автоматизации процесса идентификации гаплоидных зерновок из общей выборки гибридных семян В.А. Ротаренко и др. (Rotarencu et al., 2007) предложили определять гаплоидные зерновки по содержанию масла в зерне с помощью ядерно-магнитного резонанса (ЯМР).

Li с соавторами (Li et al., 2009) удалось разработать гаплоиндуктор CAUHOI, полученный из гибрида между линией Stock-6 и высокомасличной популяцией, который характеризовался частотой гаплоиндукции до 2% и высоким содержанием масла в зародыше (7,8%). Этот гаплоиндуктор послужил основой для разработки технологии по автоматизированной идентификации, при помощи ЯМР и инфракрасной спектроскопии, гаплоидных зерновок с ингибированием фенотипического проявления генов *R1-nj*.

Технология получения дигаплоидных линий кукурузы, основанная на гаплоидной индукции *in vivo*, признана во всем мире как один из наиболее эффективных методов ускорения селекции. За последние 20 лет технология была усовершенствована несколькими коммерческими программами по улучшению кукурузы в Европе (Schmidt, 2003), Северной Америке (Seitz, 2005), Китае (Chen et al., 2009). Рост популярности технологии дигаплоидных линий в селекционных программах по улучшению кукурузы объясняется рядом преимуществ, которые они дают селекционеру (п. 1-7 цит. по: Prasanna et al., 2012):

1. Достижение 100% гомозиготности по анализируемым генам за короткий промежуток времени (2-3 года);
2. Значительная экономия материальных и временных затрат на создание линии, 100% гомозиготной по анализируемым генам;
3. Высокая эффективность и точность отбора селективируемых признаков, а особенно при использовании молекулярных маркеров и выращивании растений в условиях зимних питомников или фитотронов (Röber et al., 2005; Geiger, Gordillo, 2009);
4. Ускорение селекционного процесса создания линий за счет быстрого накопления благоприятных аллелей генов по полигенным признакам, влияющим на продук-

тивность и стрессоустойчивость, которые сложно и трудно объединить в адаптированной зародышевой плазме при традиционных методах размножения;

5. Идеальное соответствие требованиям DUS (distinctness, uniformity, stability testing methodologies) (методы тестирования на выровненность, однородность и стабильность) в системе UPOV (Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Végétales) благодаря полной гомозиготности и однородности родительских линий (Geiger, Gordillo, 2009);

6. Снижение трудозатрат на материально-техническое обслуживание линии в семеноводстве (Röber et al., 2005; Heckenberger et al., 2005);

7. Возможности для поиска новых связей маркер – признак, для маркер-опосредованной интрогрессии генов (Forster, Thomas, 2005), использования функциональной геномики, молекулярной цитогенетики и генной инженерии (Wijnker et al., 2007).

8. Использование в качестве способа переноса агробактериальной Т-ДНК в геном во время оплодотворения (Mamontova et al., 2010).

Характеристика широко распространенных в мировой практике гаплоиндукторов кукурузы

Процесс создания гаплоиндукторов с высокой гаплоиндуцирующей способностью идет непрерывно в течение многих лет. Одним из первых эффективных гаплоиндукторов, заслуживших популярность среди селекционеров, была линия Stock-6. Позже, на ее основе либо с ее участием были созданы другие, более совершенные гаплоиндукторы:

- (1) KMS (Korichnevsky Marker Saratovsky) и ZMS (Zarodyshevsky Marker Saratovsky), оба получены из Stock 6 (Tyrnov, Zavalishina, 1984; Chebotar, Chalyk, 1996);
- (2) WS14, созданный на основе гибридов между линией W23ig и Stock 6 (Lashermes, Beckert, 1988);
- (3) KEMS (Krasnador Embryo Marker Synthetic), полученный на основе гибрида между линиями ЗМС и РЕМ (Shatskaya et al., 1994);
- (4) МНІ (Moldovian Haploid Inducer, полученный из гибрида KMS × ZMS (Eder, Chalyk, 2002);
- (5) RWS (KEMS + WS14), получен из потомства гибрида KEMS × WS14 (Röber et al., 2005);
- (6) UH400, выделен из KEMS в университете Хоэнхайма (Chang, Coe, 2009);
- (7) PK6 (Barret et al., 2008);
- (8) HZII, выделен из Stock 6 (Zhang et al., 2008);
- (9) CAUHOI, созданный в Китайском аграрном университете на основе гибрида между Stock 6 и популяцией Пекинская высокомасличная (Li et al., 2009);
- (10) РНІ (Procera Haploid Inducer), полученный из гибрида между МНІ и Stock 6 (Rotarencu et al., 2010).

Гаплоиндукторы UH400, RWS и RWS × UH400 были успешно использованы для индукции гаплоидов и полу-

чения дигаплоидных линий из зародышевой плазмы экзотических рас кукурузы CIMMYT, хотя авторы отмечают их плохую адаптированность к условиям тропической низменности (Prigge et al., 2011) и высокую подверженность болезням тропической кукурузы (Prasanna et al.,

2012). Первые гаплоиндукторные линии характеризовались низкой частотой гаплоиндукции, не выше 2-3%, тогда как современные линии показывают частоту до 15-17% (Таблица).

Таблица. Значения частоты гаплоиндукции, характеризующие основные гаплоиндукторы, имеющиеся в мировых селекцентрах кукурузы (по Hu et al., 2016 со ссылками)

Table. Haploid induction rate values characteristic of the main haploinducers available in maize breeding centers in the world (according to Hu et al., 2016 and references therein)

Гаплоиндуктор/ Name	Оригинатор/ Source	Родословная/Pedigree	Частота гаплоиндукции, %/ Haploid induction rate, %	Источник/ Reference
Stock6.M741B	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741C	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741F	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.M741H	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe, 1959; Eder, Chalyk, 2002
Stock6.M741I	MGCSC	Неизвестно		Coe, 1959
Stock6.HOH	UHOH	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.INRA	INRA	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
Stock6.ROM	USAMV	Неизвестно	2.3	Coe, 1959
ACIR	IARI	(Stock6×ACR)×Stock6	3	Sarkar et al., 1994
CAU079	CAU	CAUHOI×UH400	6	Xu et al., 2013
CAU5	CAU	CAUHOI×UH400	8	Xu et al., 2013
CAUHOI	CAU	BHO×Stock6	3	Prigge et al. 2011
HZII.1	HZAU	Synthetic including Stock6	6-8	Qiu, 2013*
HZII.2	HZAU	Synthetic including Stock6	4-6	Qiu, 2013*
HZII0	HZAU	Synthetic including CAUHOI	6-8	Qiu, 2013*
HZII2	HZAU	Synthetic including CAUHOI	5-6	Qiu, 2013*
IN003	UHOH	(UH400×CAUHOI)×UH400	9	Schipprack, 2013*
IN004	UHOH	UH400×UKW	9	Schipprack, 2013*
IN012a	UHOH	UH400×RWS	10	Schipprack, 2013*
IN012b	UHOH	UH400×RWS	11	Schipprack, 2013*
IN0604a	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	10	Schipprack, 2013*
IN0604c	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	3	Schipprack, 2013*
IN0605a	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	6	Schipprack, 2013*
IN0605b	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	8	Schipprack, 2013*
IN0703	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×RWS	11	Schipprack, 2013*
IN0803	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×(UH400×HOS)	5	Schipprack, 2013*
IN0805a	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	4	Schipprack, 2013*
IN0805b	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	Schipprack, 2013*
IN0805c	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	Schipprack, 2013*

Гаплоиндуктор/ Name	Оригинатор/ Source	Родословная/Pedigree	Частота гаплоиндукции, %/ Haploid induction rate, %	Источник/ Reference
LfL5010	LfL	MHI×RWS	17	Eder, 2013*
LfL5016	LfL	MHI×RWS	10	Eder, 2013*
LfL5017	LfL	MHI×RWS	17	Eder, 2013*
MHI	IG	KMS×ZMS	7-9	Chalyk, 1999
PHI.1	USAMV	MHI×Stock6	11-12	Rotarencu et al., 2010
PHI.2	USAMV	MHI×Stock6	12-15	Rotarencu et al., 2010
PHI.3	USAMV	MHI×Stock6	14-15	Rotarencu et al., 2010
PHI.4	USAMV	MHI×Stock6	10-16	Rotarencu et al., 2010
PK6	INRA	Synthetic of Stock6, WS14, FIGH1 and MS1334	6	Barret et al. 2008
RWK	UHOH	KEMS×WS14	9-10	Geiger, Gordillo, 2009
RWS	UHOH	KEMS×WS14	8	Röber et al., 2005
TAIL5	CIMMYT	(CML451×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	5	Prigge et al., 2011
TAIL7	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	11	Prigge et al., 2011
TAIL8	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))× (RWS×RWK)	11	Prigge et al., 2011
TAIL9	CIMMYT	(CML494×(RWS×UH400))× (RWS×UH400)	10	Prigge et al., 2011
UH400	UHOH	KEMS	8	Prigge et al., 2011
UH401	UHOH	KEMS	8	Schipprack, 2013*
UH403	UHOH	UH400×CAUHOI	9	Schipprack, 2013*
UKW	UHOH	KEMS×WS14	11	Schipprack, 2013*
WS14	INRA	Stock6×W23ig	3-5	Lashermes, Beckert, 1988
ZMK1F3	KLARI	Zarodishev marker krasnodar (ZMK1) synthetic	5-8	Shatskaya, 2010b
ZMK1U	KLARI	ZMK1 synthetic	3-10	Zabirova et al., 1996
KMS	SSU	Brown Marker × Stock6	2-4	Zavalishina, 2014*
ZMS8	SSU	ZM × KMS	8-10	Zavalishina, Tyrnov, 1992

Примечания: * личные сообщения авторов (Hu et al., 2016)

Оригинатор:

CAU = Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин, Китай

CIMMYT = Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы, Мексика

HZAU = Сельскохозяйственный университет Хуачжун, Ухань, Китай

IARI = Индийский институт сельскохозяйственных исследований, Индия

IG = Институт генетики, Кишинев, Молдова

INRA = Национальный институт сельскохозяйственных исследований, Франция

KLARI = Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Россия

LfL = Баварский государственный институт сельского хозяйства, Фрайзинг, Германия

MGCSC = Фондовый центр сотрудничества в области генетики кукурузы, Иллинойс, США

SSU = Саратовский государственный университет, Россия

UHOH = Университет Хоэнхайма, Штутгарт, Германия

USAMV = Университет агрономических наук и ветеринарной медицины, Бухарест, Румыния

Аббревиатуры:

BHO = Beijing High Oil Synthetic HOS = Hohenheim High Oil Synthetic

KEMS = Krasnodar Embryo Marker Synthetic

MHI = Moldovian Haploid Inducer

KMS = Korichnevsky Marker Saratovsky и ZMS = Zarodyshevsky Marker Saratovsky

Использование гаплоиндукторов кукурузы в Российской Федерации

Разработкой и внедрением метода индукции гаплоидии кукурузы в России особенно успешно занимались в Новосибирске Б.Ф. Юдин и М.Н. Хватова, в Саратове – В.С. Тырнов, Н.Х. Еналеева и А.Н. Завалишина, в Краснодаре – М.В. Чумак, Э.Р. Забирова и О.А. Шацкая. Основными линиями отечественных гаплоиндукторов, применяемых в настоящее время в производстве дигаплоидных линий кукурузы в России, являются: ЗМС (Зародышевый Маркер Саратовский) и ЗМК (Зародышевый Маркер Краснодарский). Сотрудниками Саратовского государственного университета созданы линии, обладающие высокой гаплоиндуцирующей способностью (КМС, ЗМС-8 и др.) и линии, склонные к наследуемому партеногенезу (АТ-1, АТ-3) (Тырнов, Завалишина., 1984; Еналеева, Тырнов, 1997; Тырнов, 1983). В Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко (ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко») созданы гаплоиндукторы ЗМК (Зародышевый Маркер Краснодарский) и их модификации (ЗМК-1У,

ЗМК-3, ЗМК-5), на основе маркерных генов окраски зерновки *R1-nj*, которые характеризуются высокой частотой гаплоиндукции (10-15%) (Shatskaya, 2001; 2004; 2010a,b). Практическое использование метода гаплоиндукции в производстве гибридов кукурузы было начато в отделе селекции и первичного семеноводства кукурузы ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко», где впервые в России была разработана и внедрена в производство технология массового создания дигаплоидных линий кукурузы на основе собственных гаплоиндукторных линий, созданных группой селекционеров под руководством М.В. Чумака (Zabirova et al., 1996). Благодаря совершенствованию технологических операций метода гаплоидии в отделе кукурузы института ежегодно получают от 400 до 1000 дигаплоидных линий. Массовое производство матроклиных гаплоидных зерновок проводят при помощи опыления початков материнских растений пыльцой гаплоиндуктора с последующим выделением на спелых початках гаплоидных зерновок по отсутствию доминантных маркерных признаков (рис. 3, 6, 7).

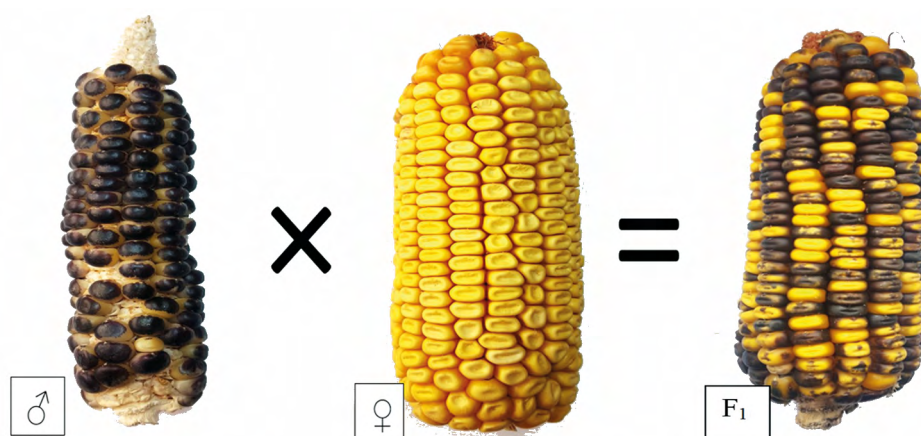


Рис. 6. Схема скрещивания между гаплоиндуктором (♂) и донором (♀) гаплоидных зерновок кукурузы.

Fig. 6. Crossing scheme between a haploid inducer (♂) and a donor (♀) of haploid maize kernels.

В ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» разработана технология ускоренного создания стерильных аналогов линий кукурузы с помощью ЦМС-*ig* гаплоиндукторов, несущих мутацию *ig*, обуславливающую нарушение слияния одного из спермиев с яйцеклеткой в зародышевом мешке, в сочетании с маркерными генами окраски зерновки *R1-nj* и стерильной цитоплазмой М- и С- типов ЦМС. Мутация *ig* хорошо охарактеризована (Lin, 1978; Enaleeva et al., 1995). В основу метода заложен принцип андрогинии, при котором ядро спермия замещает ядро яйцеклетки (Chumak, 1977; Shatskaya, Shcherbak,

1999). Благодаря этому методу в отделе кукурузы в течение двух лет создают стерильные аналоги линий кукурузы, что гораздо эффективнее традиционного метода насыщающих скрещиваний, занимающего 8 и более лет селекционной работы. Применение метода гаплоиндукции в селекционных программах отдела кукурузы ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» позволило создать за двадцать пять лет селекционной работы восемьдесят стерильных аналогов тридцати линий кукурузы на основе М- и С-типов ЦМС. В Государственный реестр селекционных достижений внесены 13 гибридов кукурузы

с участием дигаплоидных линий, относящихся к различным группам спелости: Краснодарский 282МВ, Краснодарский 377АМВ, Краснодарский 291АМВ, Краснодарский 385МВ, Краснодарский 292АМВ, Краснодарский 599МВ, Краснодарский 370МВ, Краснодарский 382МВ, Краснодарский 383МВ, Интеркрас 375, Интеркрас 390, Интеркрас 405, Краснодарнепровский 300МВ. (Shatskaya, 2010a,b). В генетической коллекции ВИР имеются доно-

ры генов *ig* (C-622), высокой частоты гаплоиндукции «High haploidy inducer line» (C-453), *R-nj* (C-221, C-222, C-799), высокой маслячности «High oil» (C-474), *B1* (*Booster1* C-905, C-911, C-916, C-917) и *PII* (*Purple1* C-905, C-924, C-925) и многих других, контролирующих окраску пыльников, стебля, стержня, перикарпа и колеоптиля зерновки.

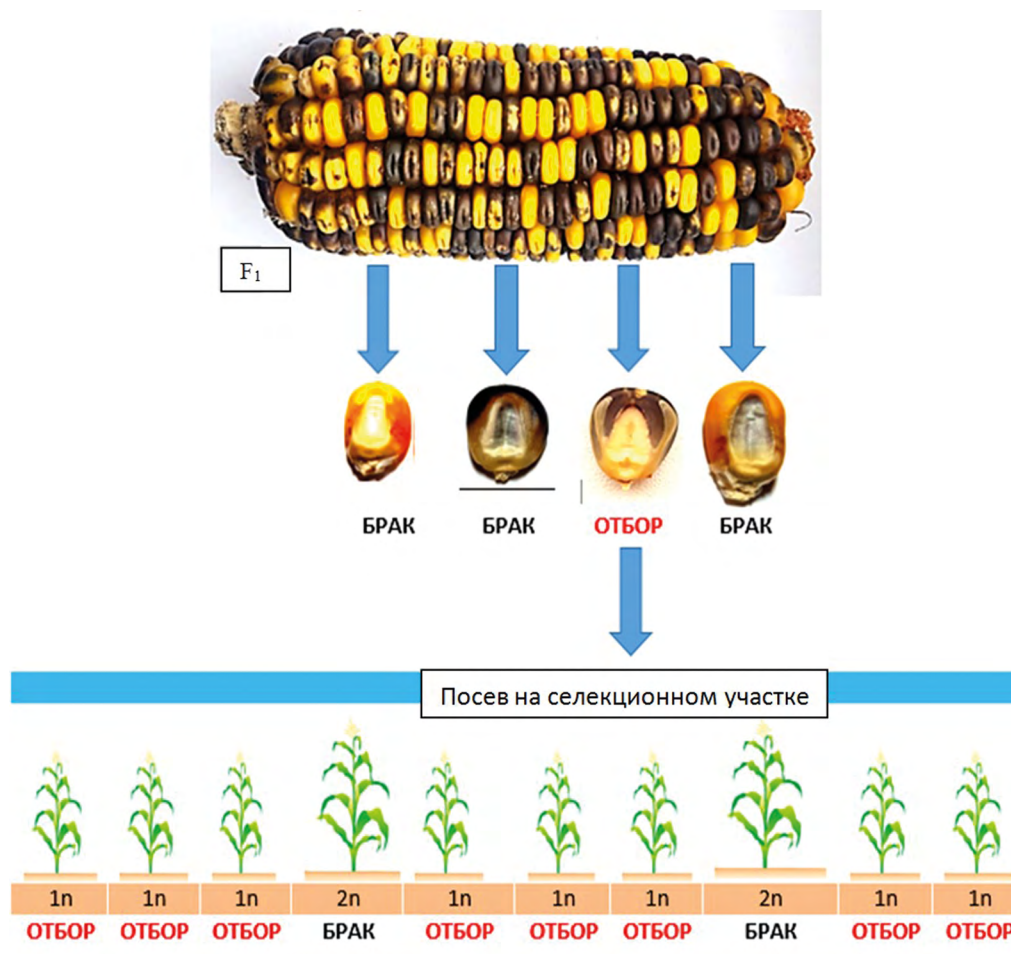


Рис. 7. Схема выделения гаплоидных зерновок кукурузы на початке и идентификация гаплоидных растений в посеве на селекционном участке.

Fig. 7. Scheme of haploid maize kernel selection from the cob and haploid plant identification at the breeding site.

Заключение

Создание дигаплоидных линий кукурузы способствует существенному ускорению селекционного процесса гибридной кукурузы. В крупных селекцентрах благодаря применению метода гаплоиндукции появилась возможность создания гомозиготных линий кукурузы за два года, а с использованием фитотронов или зимних

питомников - в течение 1 года вместо 8-10 лет селекционной работы. Все дигаплоидные линии характеризуются 100% гомозиготностью по всем аллелям селекционно ценных генов, и соответственно высокой выравненностью всех морфологических признаков, что существенно повышает качество семеноводческой продукции родительских линий и их гибридов. Благодаря селекционной работе по совершенствованию гаплоиндукторов, частота

гаплоиндукции на початках кукурузы увеличилась с 0,1% до 10-15%. Учитывая, что при использовании гаплоиндуктора, характеризующегося частотой гаплоиндукции в среднем 5%, число завязываемых зерновок на гибридном початке составляет в среднем не менее 300 штук, данный метод позволяет получить селекционеру не менее 200 гаплоидных зерновок со стандартной 15-гнездной делянки. Этого количества достаточно для проведения процедуры дигаплоидизации колхицинированием, получения зерен и репродукции дигаплоидных линий кукурузы. Дальнейшее совершенствование метода гаплоиндукции и создания гаплоиндукторных линий имеет перспективы не только для селекции гибридной кукурузы, но и для развития биотехнологических методов (например, редактирования геномов) селекции других сельскохозяйственных растений.

Благодарности/Acknowledgements

Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

The present work was performed within the framework of the State Assignment to VIR, in accordance with the Thematic Plan, Project No. 0662-2019-0006 "Search, maintenance of viability and revealing of the hereditary variability potential in the VIR global collection of cereal and groat crops for the development of an optimized genebank and for rational use in breeding and crop production.

References/Литература

Astaurov B.L. Genetics of sex (Genetika pola). In: S.I. Alikhanyan (ed.). *Actual problems of modern genetics (Aktualnye voprosy sovremennoy genetiki)*. Moscow: Publishing House of Moscow University; 1966. [in Russian] (Астауров Б.Л. Генетика пола. В кн.: *Актуальные вопросы современной генетики* / под ред. и с предисл. С.И. Алиханяна. Москва: Изд-во Изд-во Моск. ун-та; 1966).

Astaurov B.L. Parthenogenesis, androgenesis, polyploidy (Partenogenez, androgenez, poliploidiya). Moscow: Nauka; 1977. [in Russian] (Астауров Б.Л. Партеногенез, андрогенез, полиплоидия. Москва: Наука; 1977).

Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*. 1975;256:410-411. DOI: 10.1038/256410a0

Barret P., Brinkmann M., Beckert M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;117(4):581-594. DOI: 10.1007/s00122-008-0803-6

Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D. A haploid mutant in the Jimson weed, "*Datura stramonium*". *Science*. 1922;55(1433):646-647. DOI:10.1126/science.55.1433.646

Chang M.T., Coe E.H. Doubled haploids. In: A.L. Kriz, B.A. Larkins

(eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 63. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009. p.127-142.

Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics*. 1949;34(3):328-332.

Chase S.S. Monoploids in maize. Ames (Iowa): Iowa State College Press; 1952. p.389-399.

Chase S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews*. 1969;35:117-167. DOI: 10.1007/BF02858912

Chebota O.D., Chalyk S.T. The use of maternal haploids for genetic analysis of the number of kernel rows per ear in maize. *Hereditas*. 1996;124(2):173-178. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1996.00173.x

Chen S., Li L., Li H. Maize doubled haploid breeding [in Chinese]. Beijing: China Agricultural University Press; 2009.

Chumak M.V. Experimental haploidy in maize (Experimentalnaya gaploidiya u kukuruzy [dissertation]. Leningrad; 1977. [in Russian] (Чумак М.В. Экспериментальная гаплоидия у кукурузы : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Ленинград; 1977).

Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist*. 1959;93(873):381-382.

Coe E.H. Anthocyanin genetics. In: M. Freeling, V. Walbot (eds). *The maize handbook*. New York: Springer-Verlag; 1994. p.279-281.

Coe E.H., Sarkar K.R. The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*. 1964;55(5): 231-233. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107340

Darevsky I.S., Kupriyanova L.A., Uzzell T. Parthenogenesis in reptiles. *Biology of the Reptilia*. 1985;15:412-526.

Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Science*. 1987;48(1):49-54. DOI: 10.1016/0168-9452(87)90069-07

Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*; 2003. p.15-19.

Eder J, Chalyk S.T. *In vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104:7037-08. DOI: 10.1007/s00122-001-0773-4

Enaleeva N., Otkalo O., Tyrnov V. Cytological expression of ig mutant in megagametophyte. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1995;69:121.

Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological manifestation of apomixis in AT-1 plants of corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1997;71:74.

Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breeding Reviews*. 2005;25:57-88. DOI: 10.1002/9780470650301.ch3

Geiger H.H., Gordillo G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 2009;54(4):485-499.

Golubovsky M.D. Age of Genetics: Evolution of Ideas and Concepts (Vek genetiki: Evolutsiya idey i ponyatiy). St. Petersburg: Borey Art; 2000. [in Russian] (Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. Санкт-Петербург: Борея Арт; 2000).

Greenblatt I.M., Bock M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *Journal of Heredity*. 1967;58(1):9-13. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107543

Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura*. *Nature*. 1964;204(4957):497. DOI: 10.1038/204497a0

Gutorova O.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis (Sozdaniye geneticheski markirovannykh liniy kukuruzy s nasleduyemym i indutsirovannym tipami partenogeneza). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2016;18(2):341-344. [in Russian] (Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированными типами партеногенеза. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2016;18(2):341-344).

Hayes P., Corey A., DeNoma J. Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds). *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Springer Science+Business

- Media New York; 2003. p.5-14. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4
- Heckenberger M., Muminovic J., Rouppe van der Voort J., Peleman J., Bohn M., Melchinger A.E. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds. *Crop Science*. 2005;45:1120-1131. DOI: 10.1007/s11032-005-3851-5
- Hu H., Schrag T.A., Peis R., Unterseer S., Schipprack W., Chen Sh., Lai J., Yan J., Prasanna B.M., Nair S.K., Chaikam V., Rotarenco V., Shatskaya O.A., Zavalishina A., Scholten S., Schön Ch.-C., Melchinger A.E. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics*. 2016;202(4):1267-1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234
- Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Japanese Journal of Breeding*. 1990;40(2):209-216. DOI: 10.1270/jsbbs1951.40.209
- Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970;225:874-876. DOI: 10.1038/225874a0
- Khokhlov S.S. Haploidy and breeding (Gaploidiya i selektsiya). Moscow: Nauka; 1976. [in Russian] (Хохлов С.С. Гаплоидия и селекция. Москва: Наука; 1976).
- Kirilova G.A. The phenomenon of haploidy in angiosperms (Yavleniye gaploidii u pokrytosemennih rasteniy) *Genetika*. 1966;2:137-147. [in Russian] (Кириллова Г.А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1966;2:137-147).
- Kebede A.Z., Dhillon B.S., Schipprack W., Araus J.L., Banziger M., Semagan K., Alvarado G., Melchinger A.E. Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica*. 2011;180(2):219-226. DOI: 10.1007/s10681-011-0376-3
- Kimber G., Riley R. Haploid angiosperms. *The Botanical Review*. 1963;29(4):480-531. DOI: 10.1007/BF02860814
- Lashermes P., Beckert M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;76:404-410. DOI: 10.1007/BF00265341
- Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 1986;28(2):313-316. DOI: 10.1139/g86-046
- Li L., Xu X., Jin W., Chen S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*. 2009;230(2):367-376. DOI: 10.1007/s00425-009-0943-1
- Lin B-Y. Structural modification of the female gametophyte associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutant in maize. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 1978;20(2):249-257. DOI: 10.1139/g78-028
- Magoon M.L., Khanna K.R. Haploids. *Caryologia*. 1963;16(1):191-255. DOI: 10.1080/00087114.1963.10796097
- Mamontova E.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated in planta transformation of maize germ cells. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(4):501-504.
- Mayor P.J., Bernardo R. Doubled haploids in commercial maize breeding: One-stage and two-stage selection versus marker assisted recurrent selection. *Maydica*. 2009;54(4):439-448.
- Mejza S.J., Morgant V., DiBona D.E., Wong J.R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*. 1993;12(3):149-153. DOI: 10.1007/BF00239096
- Mishutkina Ya.V., Neskorodov Ya.B., Novokreshchenova M.G., Malakho S.G., Turaev A.M. Doubled haploids of barley and their use in genetic and breeding studies (Udvoyenniye gaploidy yachmenya i ih ispolzovaniye v genetiko-selektzionnyh issledovaniyah). *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2013;5:476. [in Russian] (Мишуткина Я.В., Нескородов Я.Б., Новокрещенова М.Г., Малахо С.Г., Тураев А.М. Удвоенные гаплоиды ячменя и их использование в генетико-селекционных исследованиях. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;5:476. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=10252> [дата обращения: 30.09.2020]).
- Nakata K., Tanaka M. Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. *The Japanese Journal of Genetics*. 1968;43(1):65-71. DOI: 10.1266/jjg.43.65
- Nanda D.K., Chase S.S. An embryo marker for detecting monohaploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*. 1966;6(2):213-215. DOI: 10.2135/cropsci1966.0011183X000600020036x
- Nistch J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*. 1969;19:389-404.
- Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proceedings of the Japan Academy*. 1968;44:554-557. DOI: 10.2183/pjab1945.44.554
- Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Scientia Sinica*. 1973;16(1):79-95. DOI: 10.1360/yal1973-16-1-79
- Picard E., Buysy J.D. Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d'antheres *in vitro*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 1973;277:1463-1466. [in French]
- Prasanna B.M., Chaikam V., Mahuku G. Doubled haploid technology in maize breeding: Theory and practice. Mexico: CIMMYT, DF; 2012.
- Prigge V., Sanchez C., Dhillon B.S., Schipprack W., Araus J.L., Banziger M., Melchinger A.E. Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Science*. 2011;51:1498-1506. DOI: 10.2135/cropsci2010.10.0568
- Rotarenco V.A., Kirtoca I.H., Jacota A.G. Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2007;81:11.
- Rotarenco V., Dicu G., State D., Fuia S. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2010;84:21-22.
- Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. *In vivo* haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*. 2005;50(3-4):275-283.
- Shatskaya O.A. The results of using the haploidy method in corn breeding. *Kukuruz a i sorgo = Maize and sorghum*. 2001;4:14-17. [in Russian] (Шацкая О.А. Результаты использования метода гаплоидии в селекции кукурузы. *Кукуруза и sorgo*. 2001;4:14-17).
- Shatskaya O.A. Increase in the frequency of induction of maize matroclinal haploids under individual selection of pollinators in crop production (Povysheniye chastoty induktsii matroklennykh gaploidov kukuruzy pri individualnom otbore opyliteley v rasteniyevodstve). In: *Sbornik nauchnykh trudov, posvyashchenny 90-letiyu KNIISKH im. P.P. Lukyanenko = Collection of scientific papers dedicated to the 90th anniversary of the Krasnodar Agricultural Research Institute*. Krasnodar; 2004. p.322-331. [in Russian] (Шацкая О.А. Повышение частоты индукции матроклинных гаплоидов кукурузы при индивидуальном отборе опылителей в растениеводстве. В кн.: Сборник научных трудов, посвященный 90-летию КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Краснодар; 2004. С.322-331).
- Shatskaya O.A. Creation of maize haploinducers: three selection cycles for a high frequency of induction of matroclinal haploids (Sozdaniye gaploinduktorov kukuruzy: tri tzykla otbora na vysokuyu chastotu induktsii matroklennykh gaploidov). *Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural biology*. 2010;45(5):79-86. [in Russian] (Шацкая О.А. Создание гаплоиндукторов кукурузы: три цикла отбора на высокую частоту индукции матроклинных гаплоидов. *Сельскохозяйственная биология*. 2010a;45(5):79-86).
- Shatskaya O.A. Haploinducers isolation in maize: three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. *Selskokhozyaystvennaya biologiya (Agricultural biology)* 2010b;45(5):79-86 URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/haploinducers-isolation-in-maize-three-cycles-of-selection-on-high-frequency-of-induction-of-matroclinal-haploids/viewer> [дата обращения 06.04.2020])
- Shatskaya O.A., Scherbak V.S. The use of a modified *ig*-system to create new forms of corn with increased androgenesis (Ispolzovaniye modifitsirovannoy *ig*-sistemy dlya sozdaniya novykh form kukuruzy s povyshennym androgenezom). In: *Genetika, selektsiya i tekhnologiya vzdelyvaniya kukuruzy. Yubileynyy vypusk, posvyashchenny 100-letiyu so dnya rozhdeniya akademika M.I. Khadzhinova = Genetics, breeding and technology of corn cultivation. Anniversary issue dedicated to the 100th anniversary of the birth of academician M.I. Khadzhinov*. Krasno-

- dar; 1999. p.211-218. [in Russian] (Шацкая О.А., Щербак В.С. Использование модифицированной *ig*-системы для создания новых форм кукурузы с повышенным андрогенезом. В кн.: *Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы Юбилейный выпуск, посвященный 100-летию со дня рождения академика М.И. Хаджинова*. Краснодар; 1999. С.211-218).
- Shatskaya O.A., Zabirowa E.R., Shcherbak V.S., Chumak M.V. Mass induction of maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1994;68:51.
- Schmidt W. Hybridmaiszüchtung bei der KWS SAAT AG. In: Bericht über die 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2003, Gumpenstein, Austria; 2004. p.1-6. [in German]
- Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders' School; 2005; Urbana-Champaign, Illinois, USA; 2005. p.1-7.
- Strunnikov V.A. Animal cloning: theory and practice (Klonirovaniye zhivotnykh: teoriya i praktika). *Priroda*. 1998;7:3-9. [in Russian] (Струнников В.А. Клонирование животных: теория и практика. *Природа*. 1998;7:3-9).
- Turesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993;34:163-167. DOI: 10.1007/BF00036097
- Tymov V.S. Autonomous development of the embryo and endosperm in maize (Avtonomnoye razvitiye zarodysha i endosperma u kukuruzy) *Doklady AN SSSR = Transactions of the USSR Academy of Sciences*. 1983;272(3):722-725. [in Russian] (Тырнов В.С. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы. *Доклады АН СССР*. 1983;272(3):722-725).
- Tymov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis in angiosperms. *Genetics*. 1974;10(9):154-167 [in Russian] (Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1974;10(9):154-167).
- Tymov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis (Androgenez). In: *Haploidy and breeding (Gaploidiya i selektsiya)*. Moscow; 1976. p.87-99. [in Russian] (Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез. В кн.: Гаплоидия и селекция. Москва; 1976. С.87-99).
- Tymov V.S., Zavalishina A.N. Induction of a high incidence of matroclinous haploids in maize (Induktziya vysokoy chastoty vzniknoveniya matroklinnnyh gaploidov u kukuruzy). *Doklady AN SSSR = Transactions of the USSR Academy of Sciences*. 1984;276(3):735-738. [in Russian] (Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов у кукурузы. *Доклады АН СССР*. 1984;276(3):735-738).
- Wei Z.M. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1982;67:71-73.
- Wijnker E., Vogelaar A., Dirks R., van Dun K., de Snoo B., van den Berg M., Lelivelt C., de Jong H., Chunting L. Reverse breeding: reproduction of F₁ hybrids by RNAi-induced asynaptic meiosis. *Chromosome Research*. 2007;15:87-88. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00450.x
- Wilson E.B. Cell and its role in development and heredity (Kletka i yeyo rol v razviti i nasledstvennosti). Vol. 1. Moscow ; Leningrad; 1936. [in Russian] (Вильсон Э.Б. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. Т. 1. Москва ; Ленинград; 1936).
- Zabirowa E.R., Chumak M.V., Shatskaya O.A., Shcherbak V.S. Technology of mass accelerated production of homozygous maize lines (Tekhnologiya massovogo uskorenno go polucheniya gomozigotnykh liniy kukuruzy). *Kukuruza i sorgo = Maize and sorghum*. 1996;4:17-19. [in Russian] (Забирова Э.Р., Чумак М.В., Шацкая О.А., Щербак В.С. Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы. *Кукуруза и сорго*. 1996;4:17-19).
- Zhang Z., Qiu F., Lui Y., Ma K., Li Z., Xu S. Chromosome elimination and vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*. 2008;27:1851-1860. DOI: 10.1007/s00299-008-0601-2