

Введение

Кукуруза – третий по экономическому значению хлебный злак в мировом земледелии, в чем немаловажную роль сыграло е 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 локусов в геноме 99,90 % селекционер затрачивает 10 лет, а с долей гомозиготных локусов 99,99 % – до 14 лет селекционной работы (инцухта). Для получаемых гетерозисных гибридов очень важно достижение высокой доли гомозиготности у исходных родительских линий, поскольку от её значения зависит выравнивание фенотипических 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 основе инбредных линий, полученных с помощью инцухта, не дают семеноводческим компаниям и аграриям 100 % выравнивания по всем признакам, дружности всходов и созревания, одинаковой отзывчивости на агротехнику. 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 ploидности гаплоидного генома. Первые дигаплоидные (DH) линии кукурузы показали 100 % гомозиготность по всем аллелям генов, которая была достигнута селекционным путем в течение двух циклов репродукции (Приложение, рис. 1). При этом возрастает фенотипическая 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 дигаплоидных линий кукурузы по всему миру и в том числе в России (Шацкая, 2013). Первые исследования по гаплоиндукции кукурузы были начаты в СССР В. С. Тырновым, А. Н. Завалишиной в Саратовском университете под руководством проф. С. С. Хохлова (Хохлов и др., 1976; Тырнов, 1984). Ими были созданы первые отечественные гаплоиндукторные линии кукурузы. Использование в селекционной работе фитотронов и теплиц значительно ускоряет получение дигаплоидных линий за счет возможности получения репродукции семян в зимний период и завершения цикла дигаплоидной селекции кукурузы за 1 год (Приложение, рис. 2).

У цветковых растений гаплоидия является результатом развития зародыша из редуцированных (гаплоидных) гамет или из функционально равноценных им клеток путём апомиксиса, т. е. без оплодотворения либо развития зародыша

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 *Hordeum bulbosum* L. (2x) (Kasha, Kao, 1970; Hayes, et al., 2003; Devaux, 2003; Мишуткина и др., 2013). Гаплоидия встречается более чем у 150 видов растений из 70 родов 33 семейств (в т. ч. из семейства злаков, паслёновых, орхидных, бобовых и др.). Гаплоидия обнаружена у всех основных культурных растений: пшениц, ржи, кукурузы, риса, ячменя, сорго, картофеля, табака, хлопка, льна, свёклы, капусты, тыквы, огурцов, томатов; у кормовых трав: мятликов, костра, тимopheевки, люцерны, вики и др. (Кириллова, 1966). Явление гаплоидии у диплоидных цветковых растений завершается формированием семян (зерновок) 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 – андрогенеза и гиногенеза.

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, а оплодотворение относится к псевдогамному (ложному) типу. Потомство, полученное путем андрогенеза, наследует гаплоидный или дигаплоидный генетический материал и наследует признаки только отцовской формы (Астауров, 1977; Darevsky et al., 1985; Голубовский, 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, либо спермий не проникает в яйцеклетку и выступает в качестве стимулирующего агента в развитии яйцеклетки. Организм, формирующийся путем гиногенеза, несет гаплоидный или дигаплоидный материал материнского растения наследует признаки только материнской формы (Вильсон, 1936; Астауров, 1966; Струнников, 1998).

Возникновение гаплоидных генотипов у кукурузы в естественных условиях происходит очень редко, вследствие нарушения процессов слияния с яйцеклеткой либо элиминации одного из двух спермиев, проникающих в зародышевый мешок в процессе оплодотворения (Тырнов, Хохлов, 1974; 1976). Второй спермий, успешно слившись с полярной клеткой, образует триплоидную клетку, которая начинает интенсивное митотическое деление и накопление крахмала в формирующейся вокруг зародыша триплоидной ткани эндосперма зерновки. Интенсивный рост и накопление в триплоидной ткани 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 Махешвари в 1964 году (Guha, Maheshwari, 1964). Вслед за этим открытием были получены *in vitro* гаплоиды табака (*Nicotiana tabaccum* 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, Buyser, 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), как и использование методов отдаленной гибридизации с диким ячменем (*Hordeum bulbosum*) 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 гаплоидии и способны индуцировать её на материнских початках при гибридизации с другими генотипами. Селекционеры создают на основе таких мутантных линий гаплоиндукторы для получения матроклиных гаплоидных зерновок (Сое, 1959; Хохлов и др., 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) было предложено генетическое маркирование. Суть предложенного метода генетических маркеров заключается в том, что в гибридном потомстве от таких скрещиваний мы можем наблюдать фенотипическое проявление доминантных признаков (ксении), тогда как у матроклиных гаплоидов – рецессивные (Гутурова и др., 2016). Отцовская форма (гаплоиндуктор) должна нести доминантные гены с эффектами, хорошо визуализируемыми на зерновках или проростках, а материнская (донор) – рецессивные гены. Такое маркирование упрощает работу селекционера и позволяет эффективно выбраковывать все зерновки и проростки с доминантными признаками (гибридные) и отбирать только гаплоидные, у которых отсутствуют эти признаки. На основе предложенного С. Чейзом метода маркирования был создан целый ряд гаплоиндукторов, существенно упростивших эту технологию (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969).

Гаплоиндукторы кукурузы представляют собой специализированные, высокофертильные линии, которые в результате гибридизации с диплоидным растением способствуют развитию гаплоидного генотипа будущих дигаплоидных линий кукурузы, а также формируют на его початке гибридные зерновки. Благодаря определенной частоте гаплоиндуцирующей способности (нарушения фертильности одного из спермиев) у гаплоиндуктора, часть этих гибридных зерновок имеет гаплоидное число хромосом в зародыше при формировании полноценного, триплоидного, гибридного эндосперма. При этом триплоидный генотип клеток эндосперма развивается у зерновок одинаково как

с гаплоидным, так и с диплоидным зародышем (Coe, Sarkar, 1964). Частота формирования гаплоидных зерновок на гибридных початках зависит от гаплоиндуцирующей способности применяемого гаплоиндуктора, генотипа материнского растения (донора) и условий окружающей среды. Гаплоидность той или иной зерновки на початке определяют визуально по специфическим доминантным маркерным генам, эффекты которых проявляются чаще всего в виде антоциановой окраски на зерновке, зародыше, проростках, стебле, листьях, рыльцах початка, метелке и некоторых частей растения (Приложение, рис. 3–5). Наиболее распространенными генами, используемыми в современных гаплоиндукторах кукурузы, являются гены, локализованные в районах **qhir1**, **qhir11**, **qhir12** хромосомы 1 кукурузы (Hu et al., 2016), в сочетании с маркерным геном **R1-nj** антоциановой окраски зерновки и зародыша, а также генами **A1** и **B1**, определяющими антоциановую окраску растения. Источником доминантного цветового маркера 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, которые обычно не имеют какой-либо окраски антоцианом зародыша или эндосперма. Ген **R1-nj** в сочетании с другими генами, участвующими в пути биосинтеза антоцианов, такими как: **A1**, **A2**, **C2**, **Bz1**, **Bz2** и **C1**, обуславливает пурпурную окраску алейронового слоя эндосперма и щитка эмбриона у диплоидов, что обычно называют фенотипом навахо (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967). Таким образом, **R1-nj** в качестве доминантного цветового маркера помогает в дифференцировке гаплоидных зерновок (окрашенные маркером зерновки и неокрашенные щиток и зародыш) от диплоидных зерновок (окрашенные антоциановым маркером зерновка и щиток с зародышем) (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969) (Приложение, рис. 5А, В). Следует отметить, что экспрессия цветового маркера окраски **R1-nj** может значительно варьировать в зависимости от генетического фона материнской линии, используемой для гибридизации, генотипа самого гаплоиндуктора, а также факторов окружающей среды (Приложение, рис. 6, 7) (Chase, 1952; Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011). Отдельные зерновки без какой-либо маркерной окраски относят к загрязнению селекционного материала в результате случайной гибридизации.

Несмотря на эффективность маркирования гаплоидных зерновок гаплоиндуктором на основе гена **R1-nj**, этот способ имеет свои недостатки. В случае если у донора присутствуют доминантные гены **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 (Coe, 1994) (Приложение, рис. 8). Исследования, проведенные в СИММУТ, позволили предположить, что экспрессия пурпурной окраски зерновки (ген **R1-nj**) ингибируется в пределах 8 % в гибридных комбинациях гаплоиндуктора с различными генотипами кукурузы (Röber, et al., 2005; Prasanna et al. 2012). В. А. Ротаренко с соавторами (Rotarenco et al., 2010) предложили ввести в геном гаплоиндукторов гены с эффектами синтеза антоцианов

B1 (Booster1) и **Pl1 (Purple1)**, которые приводят к независимой от солнечного света пурпурной пигментации в растительной ткани (колеоптиле и корне для тех случаев, когда гаплоидная сортировка по фенотипу невозможна на стадии сухих семян (Sastry, 1970) (см. Приложение, рис. 3, 4). В этом случае пигментация колеоптиля или корня на проростках указывает на диплоидный генотип, а проростки без пигментации относят к гаплоидным (см. Приложение, рис. 5А, В) (Geiger, Gordillo, 2009). Существуют не только альтернативные методы создания гаплоидов, но и альтернативные маркеры, которые могут быть использованы вместо R1-nj для идентификации гаплоидов. Для этого можно использовать признаки, определяемые методами инфракрасной (ИК) спектроскопии, ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), флуоресценции белков и др. Самый надежный и точный из этих альтернативных методов отбора содержание масла, с точностью выше 90 % (Rotarengo et al., 2007; 2010; Liu et al., 2016). Такое предположение основано на том, что гаплоиндукторы, характеризующиеся высоким содержанием масла, накапливают (как и другие высокомасличные линии) его только в зародыше, следовательно, в индуцируемых им гаплоидных зерновках значение содержания масла будут значительно меньше. Для автоматизации процесса идентификации и отбора гаплоидных зерновок из общей выборки гибридных семян В. А. Ротаренко с соавторами (Rotarengo et al., 2010) предложили определять гаплоидные зерновки по содержанию масла в зерне с помощью ЯМР. Исследования, проведенные методом ЯМР, показали, что содержание масла в среднем для диплоидных зерновок составляет 5,26 %, а для гаплоидных не превышает 3,42 % (Chen, Song, 2003). На основе этих результатов китайским ученым (Li et al., 2009) удалось разработать гаплоиндуктор CAUHOI, полученный из гибрида между Stock-6 и высокомасличной популяцией. Он показал значение гаплоиндукции до 2 % и высокое содержание масла в зерновке (7,8 %). Этот гаплоиндуктор послужил основой для разработки технологии по автоматизированной идентификации гаплоидных зерновок с ингибированием фенотипического проявления генов **R1-nj** при помощи ЯМР и ИК-спектрометрии. К гаплоиндукторам с высоким содержанием масла относятся такие, как CAUHOI (7,8 % масла) (Chen, Song, 2003), CHOIL (~ 8,5 % масла) (Dong et al., 2014) и UH600 (10,8 % масла) и UH601 (11,7 % масла) (Melchinger et al., 2013).

Технология получения дигаплоидных линий кукурузы, основанная на гаплоидной индукции *in vivo*, признана во всем мире как один из наиболее эффективных подходов к ускорению селекции (Приложение, рис. 9А). 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):

- достижение 100 % гомозиготности генома за короткий промежуток времени (2–3 года);

- значительная экономия материальных и временных затрат на создание 100 % гомозиготной линии;

- высокая эффективность и точность отбора селективируемых признаков (в том числе с молекулярно маркированных) за 1 год, за счет использования зимних питомников или фитотронов (Röber et al., 2005; Geiger, Gordillo, 2009);

- ускоряет селекционный процесс создания линий за счёт быстрого накопления благоприятных аллелей генов по полигенным признакам, влияющим на продуктивность кукурузы и стрессоустойчивость, которые в других случаях сложно и трудоемко объединить в адаптированной зародышевой плазме при традиционных методах размножения;

- идеально соответствует требованиям DUS (uniformity, distinctness, stability) testing methodologies) (выравненность, однородность и стабильность) в системе UPOV (Union Internationale pour la protection des obtentions végétales) для защиты селекционных достижений растений благодаря полной гомозиготности и однородности родительских линий, созданных на основе гаплоиндукции (Geiger, Gordillo, 2009);

- снижает трудозатраты на материально-техническое обслуживание линии в семеноводстве (Röber et al., 2005; Heckenberger et al., 2005);

- предоставляет широкие возможности для проведения исследований ассоциации маркер-признак, основанной на маркерах интрогрессии генов (Forster, Thomas, 2005), функциональной геномики, молекулярной цитогенетики и генной инженерии (Wijnker et al., 2007);

- возможный механизм для переноса конструкции CRISPR/Cas-компонентов с помощью агробактериальной T-ДНК в геном кукурузы во время оплодотворения (Мамонтова и др., 2010);

- вспомогательный инструмент для редиплоидизации (ресинтеза) полиплоидных генотипов (Хатефов, Матвеева, 2019) (Приложение, рис. 9Б).

Процесс создания гаплоиндукторов с высокой гаплоиндуцирующей способностью идет непрерывно в течение многих лет. Одной из первых линий, заслужившей популярность среди селекционеров как наиболее эффективный гаплоиндуктор, была Stock-6. Позже, на ее основе либо с её участием были созданы другие, более совершенные линии-гаплоиндукторы, такие как:

- KMS (Korichnevy Marker Saratovsky) и ZMS (Zarodyshevy Marker Saratovsky), оба получены из Stock 6 (Тырнов, Завалишина, 1984);

- WS14, созданный на основе гибридов между линией W23ig и Stock 6 (Lashermes, Beckert, 1988);

- KEMS (Krasnodar Embryo Marker Synthetic), полученный на основе гибрида с линией Stock 6 (Shatskaya et al., 1994);

- MHI (Moldovian Haploid Inducer полученный из гибрида KMS × ZMS (Eder, Chalyk, 2002);

- RWS (KEMS + WS14), получен из потомства гибрида KEMS × WS14 (Röber et al., 2005);

- UN400, выделен из KEMS в университете Хоэнхайма (Chang, Coe, 2009);

- PK6 создана на основе линий Stock6, WS14 (Lashermes, Beckert, 1988), FIGH1 (Bordes et al., 1997) и MS1334 (Barret et al., 2008);
- HZI1, выделен из Сток 6 (Zhang et al., 2008);
- CAUHOI, созданный в Китайском аграрном университете на основе гибрида между Сток 6 и популяцией Пекинская высокомасличная (Li et al., 2009);
- PHI (Procera Haploid Inducer), полученный из гибрида между МНІ и Stock 6 (Rotarenco et al., 2010).

Гаплоиндукторы UH400, RWS и RWS × UH400 успешно использовались для индукции гаплоидов и получения 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 % (табл. 1).

Таблица 1. Частота гаплоиндукции основных гаплоиндукторов, распространённых в мировых селекцентрах кукурузы (Hu et al., 2016)

Гапло-индуктор	Оригинатор	Родословная	Частота гаплоин-дукции, %	Источник
Stock6.M741B	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.M741C	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.M741F	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.M741H	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe; Eder & Chalyk
Stock6.M741I	MGCSC	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.HOH	UHOH	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.INRA	INRA	Неизвестно	2.3	Coe
Stock6.ROM	USAMV	Неизвестно	2.3	Coe
ACIR	IARI	(Stock6×ACR)×Stock6	3	Sarkar
CAU079	CAU	CAUHOI×UH400	6	Xu et al.
CAU5	CAU	CAUHOI×UH400	8	Xu et al.
CAUHOI	CAU	BHO×Stock6	3	Prigge et al.
HZI1.1	HZAU	Synthetic including Stock6	6-8	F. Qiu*
HZI1.2	HZAU	Synthetic including Stock6	4-6	F. Qiu*
HZI10	HZAU	Synthetic including CAUHOI	6-8	F. Qiu*
HZI12	HZAU	Synthetic including CAUHOI	5-6	F. Qiu*
IN003	UHOH	(UH400×CAUHOI)×UH400	9	W. Schipprack
IN004	UHOH	UH400×UKW	9	W. Schipprack
IN012a	UHOH	UH400×RWS	10	W. Schipprack
IN012b	UHOH	UH400×RWS	11	W. Schipprack
IN0604a	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	10	W. Schipprack
IN0604c	UHOH	(UH400×CAUHOI)×HOS	3	W. Schipprack

Гапло-индуктор	Оригинатор	Родословная	Частота гаплоин-дукции, %	Источник
IN0605a	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	6	W. Schipprack
IN0605b	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×UH400	8	W. Schipprack
IN0703	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×RWS	11	W. Schipprack
IN0803	UHOH	((UH400×RWS)×HOS)×(UH400×HOS)	5	W. Schipprack
IN0805a	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	4	W. Schipprack
IN0805b	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	W. Schipprack
IN0805c	UHOH	((UH400×CAUHOI)×HOS)×((UH400×RWS)×HOS)	3	W. Schipprack
LfL5010	LfL	MHI×RWS	17	J. Eder*
LfL5016	LfL	MHI×RWS	10	J. Eder*
LfL5017	LfL	MHI×RWS	17	J. Eder*
MHI	IG	KMS×ZMS	7-9	Chalyk
PHI.1	USAMV	MHI×Stock6	11-12	Rotarenco et al.
PHI.2	USAMV	MHI×Stock6	12-15	Rotarenco et al.
PHI.3	USAMV	MHI×Stock6	14-15	Rotarenco et al.
PHI.4	USAMV	MHI×Stock6	10-16	Rotarenco et al.
PK6	INRA	Synthetic of Stock6, WS14, FIGH1 and MS1334	6	Barret et al.
RWK	UHOH	KEMS×WS14	9-10	Geiger
RWS	UHOH	KEMS×WS14	8	Röber et al.
TAIL5	CIMMYT	(CML451×(RWS×RWK))×(RWS×RWK)	5	Prigge et al.
TAIL7	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))×(RWS×RWK)	11	Prigge et al.
TAIL8	CIMMYT	(CML494×(RWS×RWK))×(RWS×RWK)	11	Prigge et al.
TAIL9	CIMMYT	(CML494×(RWS×UH400))×(RWS×UH400)	10	Prigge et al.
UH400	UHOH	KEMS	8	Prigge et al.
UH401	UHOH	KEMS	8	W. Schipprack*
UH403	UHOH	UH400×CAUHOI	9	W. Schipprack*
UKW	UHOH	KEMS×WS14	11	W. Schipprack*
WS14	INRA	Stock6×W23ig	3-5	Lashermes & Beckert
ZMK1F3	KLARI	Zarodishev marker krasnodar (ZMK1) synthetic	5-8	O. Shatskaya
ZMK1U	KLARI	ZMK1 synthetic	3-10	Zabirova et al.
KMS	SSU	Brown Marker × Stock6	2-4	Zavalishina *
ZMS8	SSU	ZM × KMS	8-10	Zavalishina*

Примечания:

* личные сообщения авторов

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. 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;
УНОН = 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 = Moldovan Haploid Inducer;
KMS = Korichnevy Marker Saratovsky и ZMS = Zarodyshevy Marker Saratovsky.

В России разработкой и внедрением метода индукции гаплоидии кукурузы 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 России, в производстве дигаплоидных линий кукурузы, 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; Enaleeva, Tyrnov, 1997; Тырнов, Еналеева, 1983). В 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***, характеризуются высокой частотой гаплоиндукции (10–15 %) (Шацкая, 2001, 2004, 2010). Практическое использование метода гаплоиндукции кукурузы в производстве гибридов кукурузы были начаты в отделе селекции и первичного семеноводства кукурузы Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко (ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко»), где впервые в РФ была разработана и внедрена в промышленное производство семян гибридной кукурузы технология ускоренного создания дигаплоидных линий на основе собственных гаплоиндукторов, созданных группой селекционеров под руководством М. В. Чумака (Забирова и др., 1996). Методом гаплоидии в отделе кукурузы ежегодно получают от 400 до 1000 дигаплоидных линий. Массовое производство матроклиных гаплоидных зерновок проводят при помощи опыления початков материнских растений пылью от гаплоиндуктора и последующим выделением на спелых початках гаплоидных зерновок по доминантным маркерным признакам. Наравне с гаплоиндукторной линией

ЗМК О. А. Шацкой создан её тетраплоидный аналог (Приложение, рис. 10). В ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» разработана технология ускоренного создания стерильных аналогов линий кукурузы методом андрогинии (андрогенеза,) с помощью ЦМС-**ig** гаплоиндукторов, несущих мутацию **ig1** (Kermicle, 1969; 1971; 1994), обуславливающую слияние одного из спермиев с аномальной безъядерной яйцеклеткой, на стерильной цитоплазме М и С типов ЦМС в сочетании с маркерными генами окраски зерновки **R1-nj**. В основу метода заложен принцип андрогинии, при котором ядро спермия замещает ядро яйцеклетки. Если мутанты гомозиготны по мутации **ig1**, гаметофиты проявляют длительную фазу безъядерных делений, которая формирует безъядерные яйцеклетки (Evans, 2007). При проведении гибридизации с источником спермиев, несущих ядерные гены (**rfrf**), в завязавшемся на стерильной материнской цитоплазме гаплоидном зародыше формируется генотип стерильного аналога отцовской линии со 100 % стерильностью (Чумак, 1977, Шацкая, Щербак, 1999). Опылителем полученной дигаплоидной стерильной линии служит только отцовская линия, послужившая источником пыльцы для гаплоиндукции. Следует отметить, что все линии-закрепители (на нормальной – фертильной цитоплазме) должны быть дигаплоидными линиями, полученными заранее для этих целей методом матроклинной гаплоидии. 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 занесены 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, Красноднэпровский 300МВ (Шацкая, 2013).

В генетической коллекции ВИР имеются доноры генов **ig** (C-622), высокой частоты гаплоиндукции «High haploidy inducer line» (C-453), **R-nj** (C-221, C-222, C-799), высокомасличности «High oil» (C-474), **B1** (C-905, C-911, C-916, C-917) и **PI1** (C-905, C-924, C-925) и многие другие, контролирующие у кукурузы окраску стебля, листьев, рылец на початке, цветковых чешуй на метелке и окраску пыльников, окраску перикарпа и колеоптиля зерновки.

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 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 деланки. Этого количества достаточно для проведения процедуры дигаплоидизации колхицинированием и получения репродукции зерен 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.

Материалы и оборудование

1. Семена донора (гибрида или популяции, являющиеся донором гаплоидного генома).
2. Семена гаплоиндуктора.
3. Семена диплоидного/тетраплоидного тестера.
3. Селекционный участок.
4. Пергаментные изоляторы для метелки и початка.
5. Степлер со скобами.
6. Журнал для записи.
7. Рабочий раствор (Колхицин + ДМСО).
8. Вода проточная (холодная).
9. Торфяные (пластиковые) стаканчики.
10. Пластиковый контейнер для проращивания.
11. Пластиковый контейнер для колхицинирования.
12. Капроновая сетка.
13. Скальпель.
14. Фильтровальная бумага.
15. Термостат.
16. 7,0 % раствор гипохлорита натрия («Белизна»).
17. Пленка мульчирующая.

Приложение

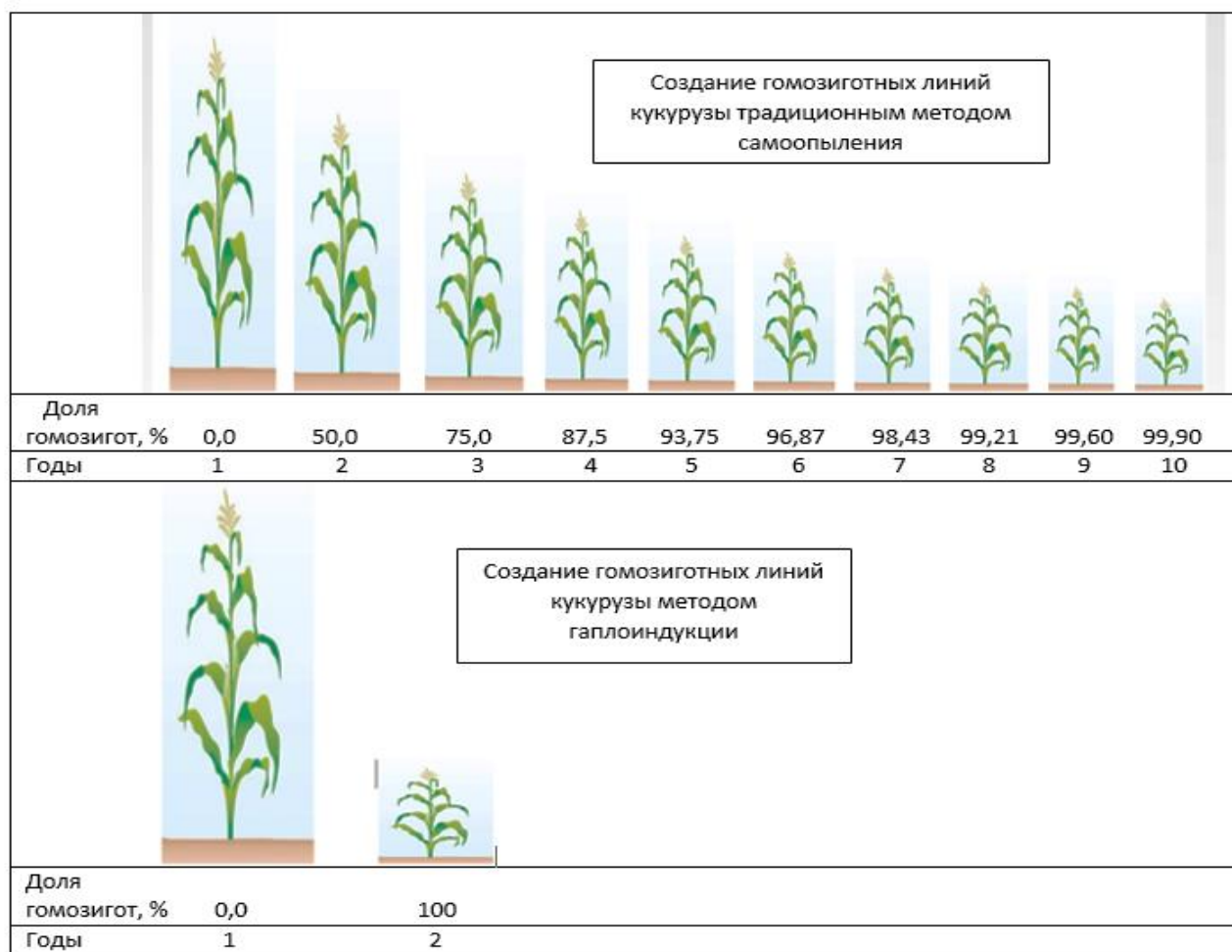


Рис. 1. Динамика накопления доли гомозигот методом самоопыления (инцухт) и гаплоиндукции у гибридов кукурузы



Рис. 2. Использование фитотрона и теплицы для ускоренного получения репродукции семян кукурузы



Рис. 3. Фенотип растений различных гаплоиндукторов кукурузы

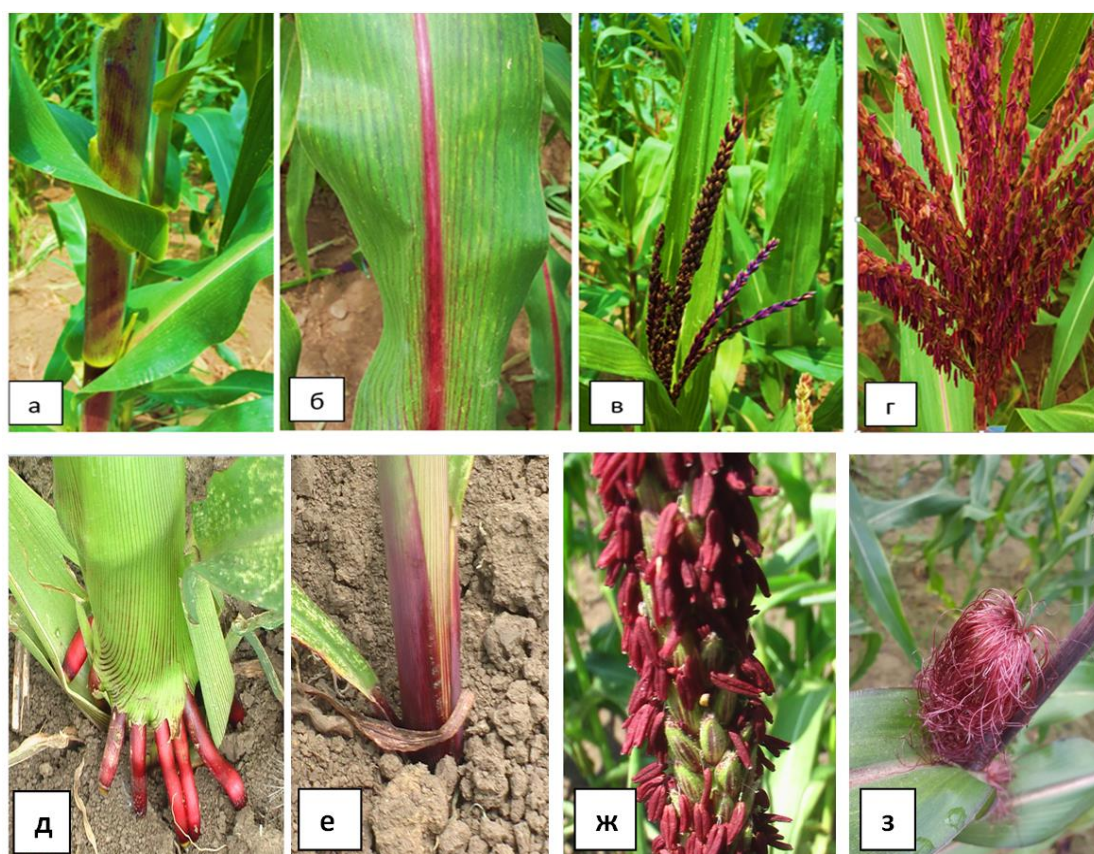


Рис. 4. Фенотипическое проявление эффекта различных генов антоциановой окраски на стебле (а), центральной жилке листа (б), колосковых чешуях метелки (в), пыльниках (г, ж), придаточных корнях (д), основании стебля (е), рыльцах початка (з) в гибридном потомстве F_1



Рис. 5. Фенотипическое проявление эффекта гена *R1-nj* на зерновке (А) и в сочетании с генами *Pl1* и *B1* (В) на проростках гаплоиндуктора кукурузы



Рис. 6. Экспрессивность гена *R1-nj* в зерновках, сформированных на початках разных гаплоиндукторов кукурузы



Рис. 7. Полиморфизм початков разных гаплоиндукторов кукурузы

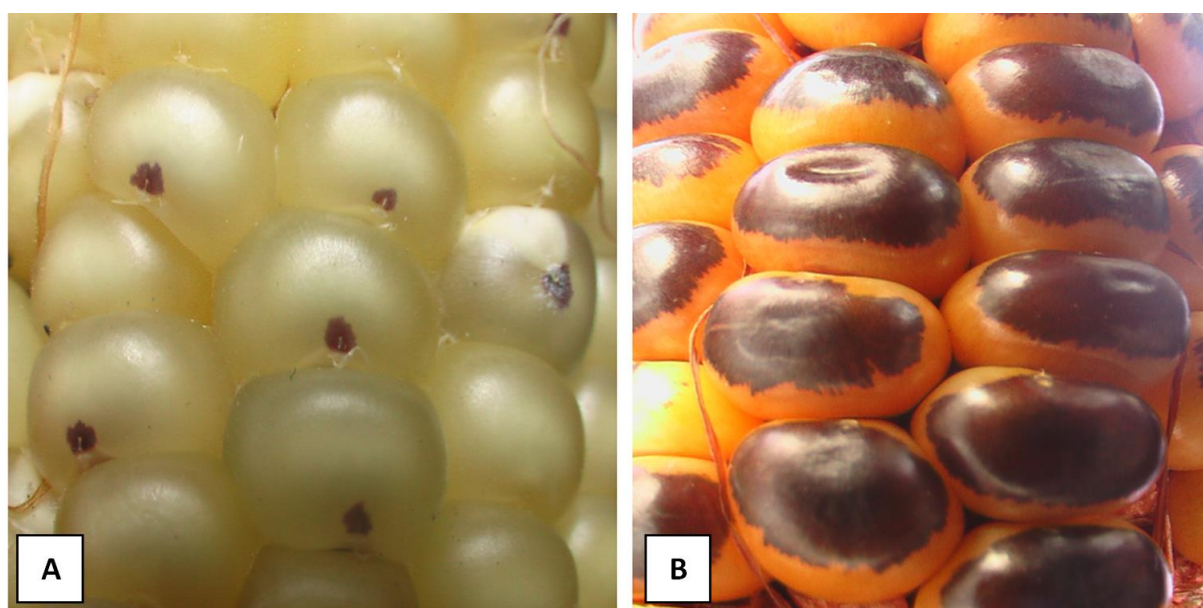


Рис. 8. Ингибирование генами *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* фенотипического проявления гена *R1-nj* (антоцианового маркера на зерновке) у кремнистой кукурузы (А) в сравнении со стандартом (В)

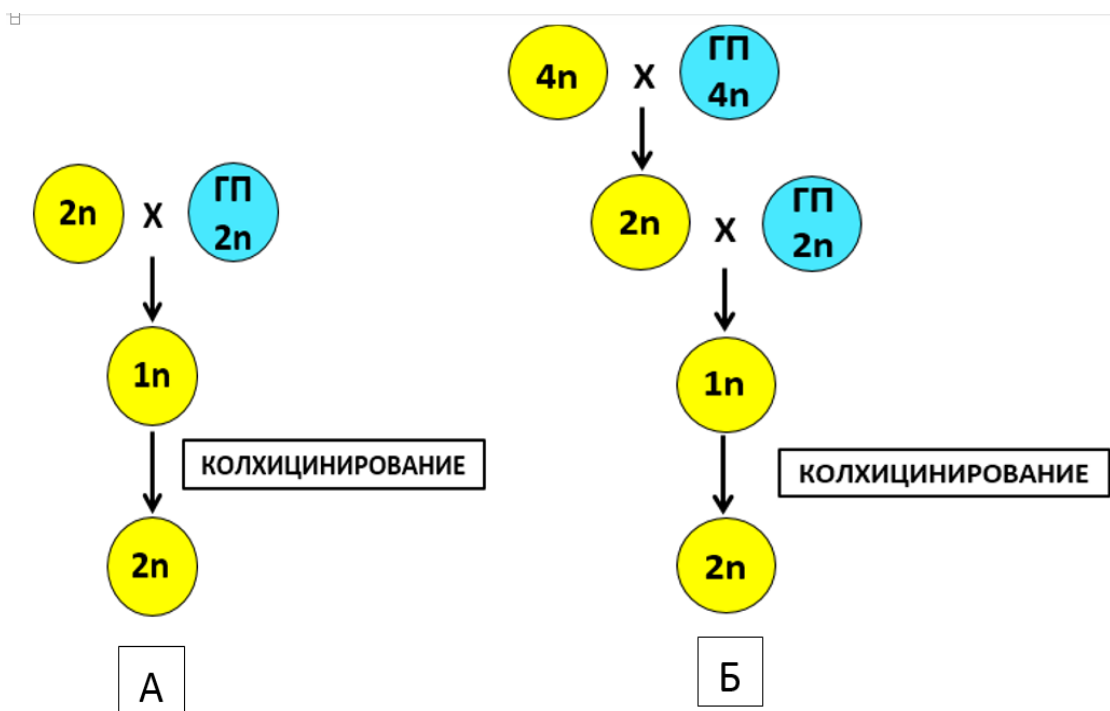


Рис. 9. Схема получения дигаплоидных (А) из диплоидных и редиплоидных (Б) из тетраплоидных линий кукурузы с использованием $2n$ и $4n$ гаплоиндукторов (ГП)

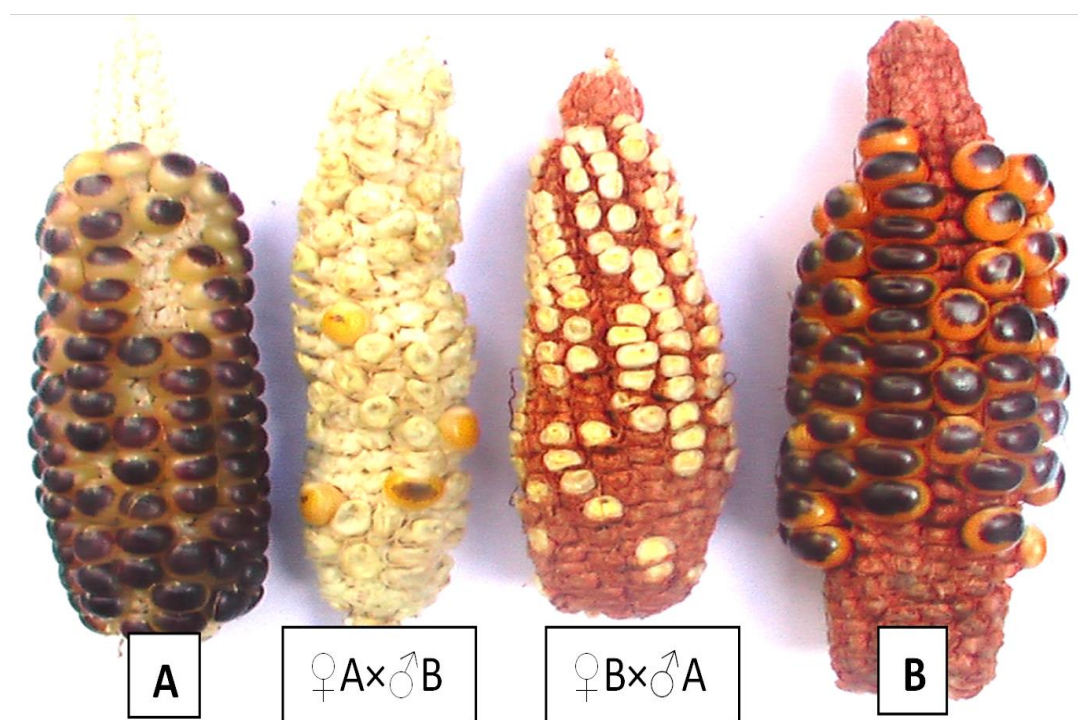


Рис. 10. Диплоидный (А) и тетраплоидный (В) гаплоиндукторы с нормальными зерновками селекции КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко (оригинатор О. А. Шацкая) и их реципрокные гибриды с щуплыми триплоидными зерновками на початке



Рис. 11. Схема скрещивания между гаплоиндуктором и донором гаплоидных зерновок кукурузы



Рис. 12. Выборка гаплоидных зерновок (указано стрелкой) среди гибридных диплоидных на початке материнского растения

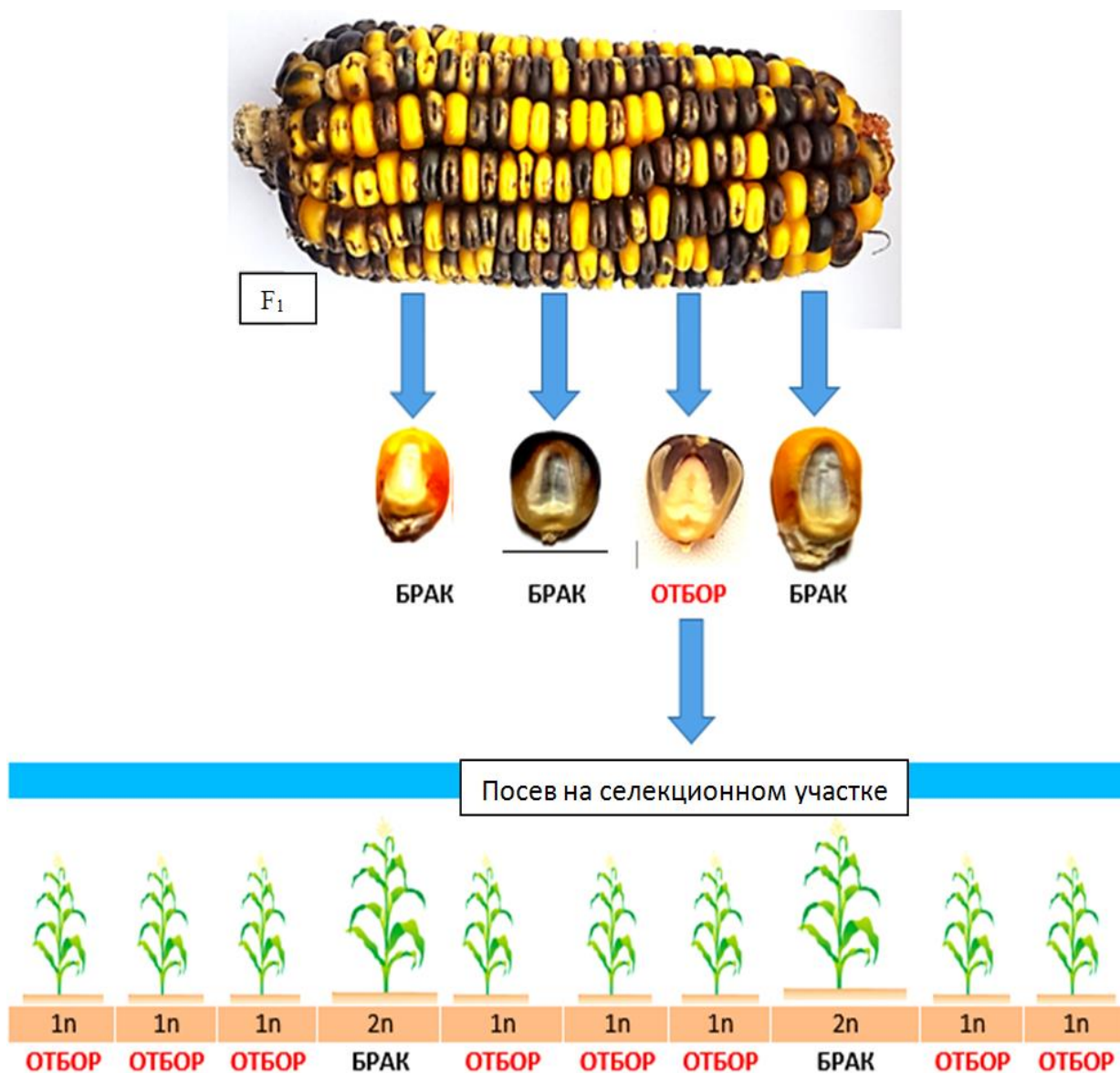


Рис. 13. Схема выделения зерновок кукурузы с гаплоидным зародышем и идентификация гаплоидных растений в посеве на селекционном участке



Рис. 14. Проростки диплоидной (А) и гаплоидной (В) кукурузы



Рис. 15. Проростки диплоидной (А), гаплоидной (В) кукурузы, пророщенные в пластиковых стаканчиках

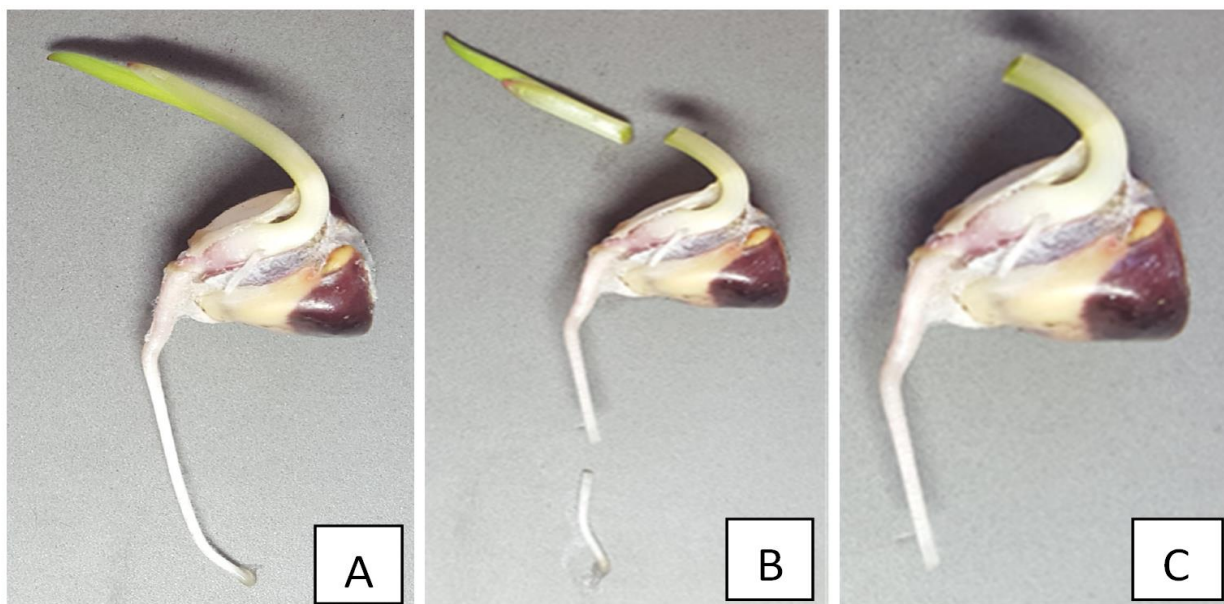


Рис. 16. Последовательность удаления (А-В-С) части шильца и части главного корешка у проростка кукурузы перед обработкой колхицином

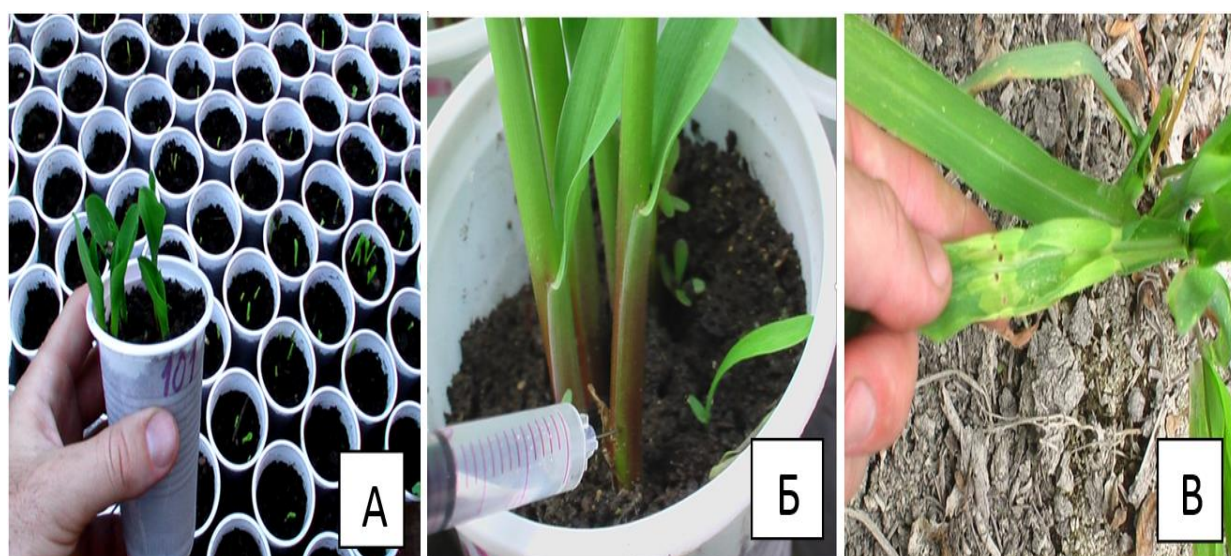


Рис. 17. Отросшие проростки кукурузы в пластиковых стаканчиках после колхицинирования методом замачивания проростков (А), процедура введения колхицина в зону апекса (Б), зона с химерной тканью и следами от инъекции колхицина на листе кукурузы после пересадки в поле (В)

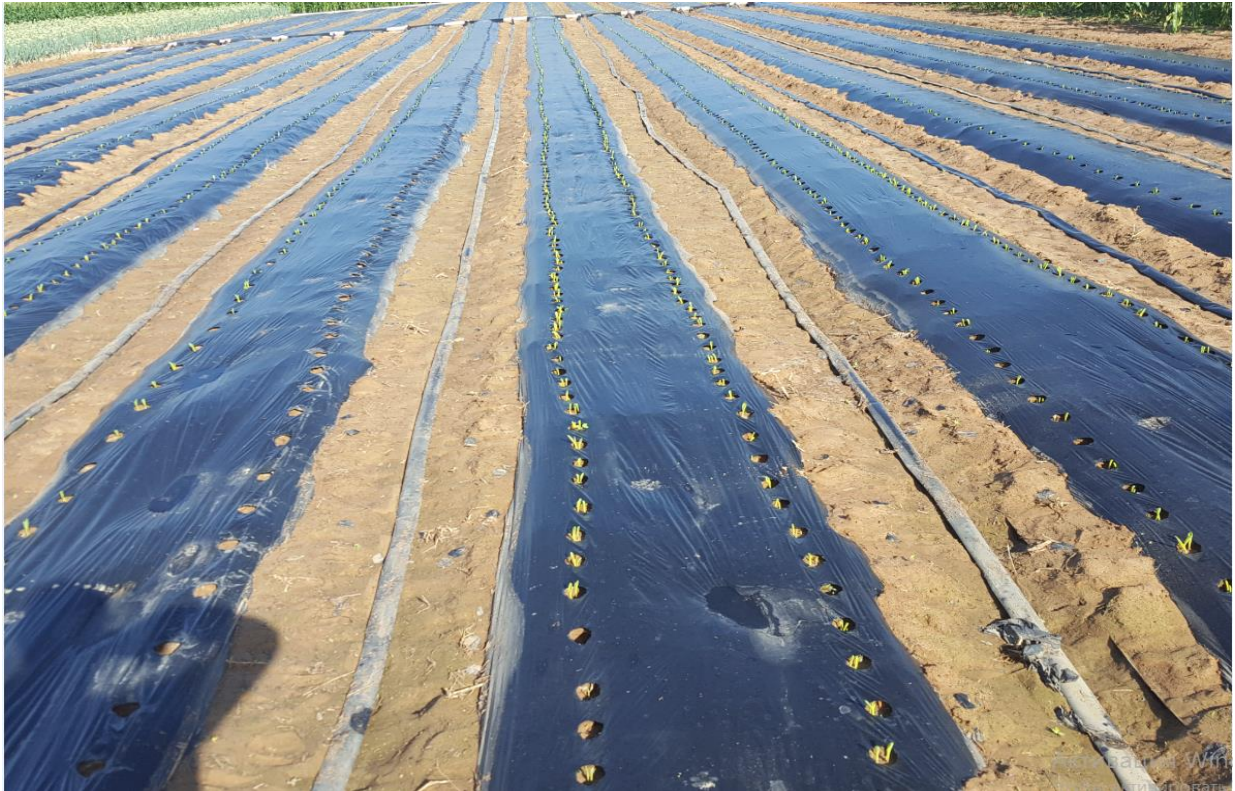


Рис. 18. Посадка колхицинированных проростков кукурузы
в поле под мульчирующую пленку



Рис. 19. Селекционный участок с деланками гаплоидных растений
на фоне диплоидных растений (тестеры) кукурузы

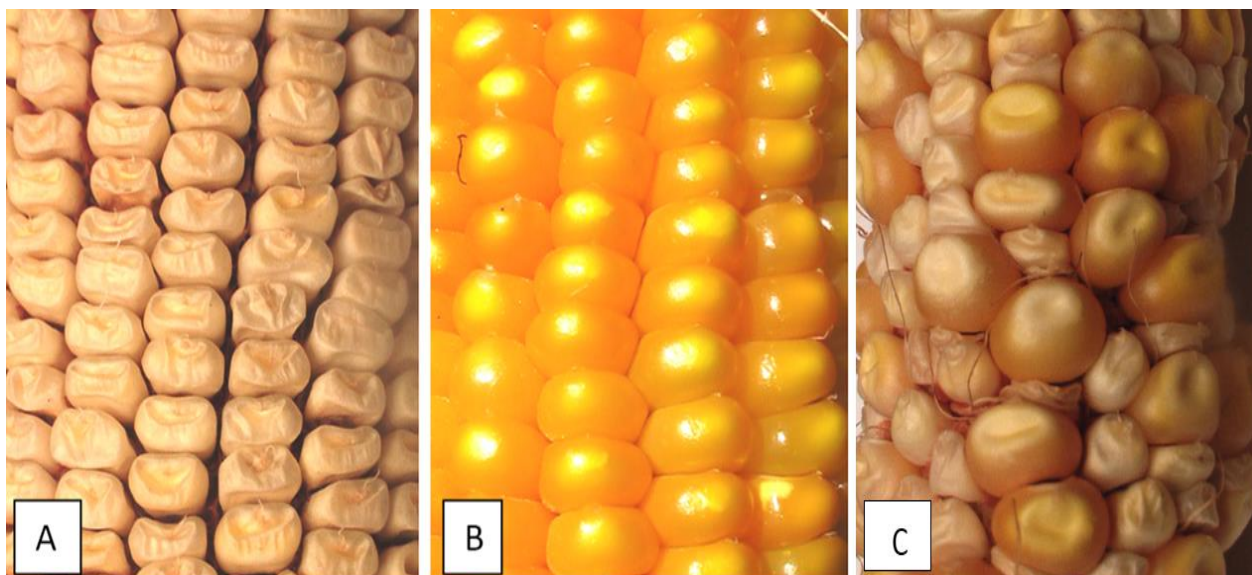


Рис. 20. Фенотип триплоидных (А), диплоидных (В) и смешанных (С) зерновок на тестерном початке кукурузы



Рис. 21. Фенотип початков и растений дигаплоидной (DH) линии кукурузы

Список иллюстраций

Рис. 1. Динамика накопления доли гомозигот методом самоопыления (инцухт) и гаплоиндукции у гибридов кукурузы.

Рис. 2. Использование фитотрона и теплицы для ускоренного получения репродукции семян кукурузы.

Рис. 3. Фенотип растений различных гаплоиндукторов кукурузы.

Рис. 4. Фенотипическое проявление эффекта различных генов антоциановой окраски на стебле (а), центральной жилке листа (б), колосковых чешуях метелки (в), пыльниках (г, ж), придаточных корнях (д), основании стебля (е), рыльцах початка (з) в гибридном потомстве F₁.

Рис. 5. Фенотипическое проявление эффекта гена R1-nj на зерновке (F) и в сочетании с генами P11 и B1 (B) на проростках гаплоиндуктора кукурузы.

Рис. 6. Экспрессивность гена R1-nj в зерновках, сформированных на початках разных гаплоиндукторов кукурузы.

Рис. 7. Полиморфизм початков разных гаплоиндукторов кукурузы.

Рис. 8. Ингибирование генами C1-I, C2-Idf, In1-D фенотипического проявления гена R1-nj (антоцианового маркера на зерновке) у кремнистой кукурузы (A) в сравнении со стандартом (B).

Рис. 9. Схема получения дигаплоидных (A) из диплоидных и редиплоидных (B) из тетраплоидных линий кукурузы с использованием 2n и 4n гаплоиндукторов (ГП).

Рис. 10. Диплоидный (A) и тетраплоидный (B) гаплоиндукторы с нормальными зерновками селекции КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко (оригинатор О. А. Шацкая) и их реципрокные гибриды с шуплыми триплоидными зерновками на початке.

Рис. 11. Схема скрещивания между гаплоиндуктором и донором гаплоидных зерновок кукурузы.

Рис. 12. Выборка гаплоидных зерновок (указано стрелкой) среди гибридных диплоидных на початке материнского растения.

Рис. 13. Схема выделения зерновок кукурузы с гаплоидным зародышем и идентификация гаплоидных растений в посеве на селекционном участке.

Рис. 14. Проростки диплоидной (A) и гаплоидной (B) кукурузы.

Рис. 15. Проростки диплоидной (A), гаплоидной (B) кукурузы, пророщенные в пластиковых стаканчиках.

Рис. 16. Последовательность удаления (A-B-C) части шильца и части главного корешка у проростка кукурузы перед обработкой колхицином.

Рис. 17. Отросшие проростки кукурузы в пластиковых стаканчиках после колхицинирования методом замачивания проростков (A), процедура введения колхицина в зону апекса (B), зона с химерной тканью и следами от инъекции колхицина на листе кукурузы после пересадки в поле (B).

Рис. 18. Посадка колхицинированных проростков кукурузы в поле под мульчирующую пленку.

Рис. 19. Селекционный участок с делянками гаплоидных растений на фоне диплоидных растений (тестеры) кукурузы.

Рис. 20. Фенотип триплоидных (A), диплоидных (B) и смешанных (C) зерновок на тестерном початке кукурузы.

Рис. 21. Фенотип початков и растений дигаплоидной (DH) линии кукурузы.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Материалы и оборудование.....	15
Этапы проведения исследований.....	16
Список цитируемой литературы.....	26
Приложение	31
Список иллюстраций.....	42