


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Использование гаплоиндукторов кукурузы как инструмента в биотехнологии сельскохозяйственных растений

А.В. Ульянов¹, А.В. Карлов², Э.Б. Хатефов¹ 

¹ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

 haed1967@rambler.ru

Аннотация. Использование гаплоиндукторов в гибридной селекции растений является одним из перспективных и востребованных направлений в области репродуктивной биологии. Продолжается совершенствование уже существующих линий-гаплоиндукторов и поиск новых генов, способствующих повышению частоты гаплоидии. Наравне с этими исследованиями расширяется область применения гаплоиндукторов в генетике и селекции растений. Гаплоиндукторы, несущие гены *R1-nj*, которые маркируют антоциановую окраску верхушки зерновки и зародыш, используются не только для выявления гибридных зародышей (окрашенный зародыш) и гаплоидных генотипов (неокрашенный зародыш), но и для обнаружения генов, репрессирующих антоциановую окраску зерна, таких как *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*. В зависимости от количества генов изменяется их фенотипическое проявление в зерновке. Гаплоидия широко применяется для ускорения гибридной селекции и получения новых линий кукурузы с улучшенными признаками и их стерильных аналогов. Вводя те или иные гены в геном улучшаемой линии, селекционеры могут ускорить создание чистых линий, несущих нужный ген, методом дигаплоидной (DH) селекции. Гаплоиндукторные линии кукурузы и их тетраплоидные аналоги используются в селекции редиплоидных линий кукурузы методом ресинтеза из тетраплоидных генотипов. Фирма Syngenta в 2019 г. синтезировала гаплоиндукторную линию кукурузы, несущую в спермиях пыльцевого зерна конструкцию CRISPR/cas, которая способна к одновременному стимулированию гаплоидии и редактированию генома на заданном участке ДНК. Благодаря этой технологии стало возможным совершенствование линий гаплоиндукторов кукурузы с помощью введения различных конструкций CRISPR/cas в ее геном для редактирования на любом участке ДНК. Гаплоиндукторы кукурузы широко применяются в селекции дигаплоидной пшеницы. Первые опыты показали, что наиболее эффективным гаплоиндуктором для стимулирования гаплоидии на пшенице является пыльца кукурузы. Исследователи ведут интенсивный поиск других возможностей использования гаплоиндукторов кукурузы в селекции растений. В данном обзоре рассмотрено современное состояние в технологии гаплоиндукции у растений. Ключевые слова: кукуруза; гаплоидия; гаплоиндуктор; гаплоид; дигаплоид; тетраплоид; редиплоид.


Для цитирования: Ульянов А.В., Карлов А.В., Хатефов Э.Б. Использование гаплоиндукторов кукурузы как инструмента в биотехнологии сельскохозяйственных растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7): 704-713. DOI 10.18699/VJGB-22-85

The use of maize haploidy inducers as a tool in agricultural plant biotechnology

A.V. Ulyanov¹, A.V. Karlov², E.B. Khatetov¹ 

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² Saratov State University, Saratov, Russia

 haed1967@rambler.ru

Abstract. The discovery of the ability of some mutations to stimulate haploidy during hybridization made it possible to create one of the most promising and sought-after trends in the field of reproductive biology. Haploid inducers created on their basis are capable of increasing the frequency of haploidy up to 15 %. The improvement of the existing haploid inducer lines and the search for new genes that contribute to a high frequency of haploidy are underway. Along with these studies, the field of application of haploid inducers in genetics and plant breeding is expanding. Haploid inducers carrying *R1-nj* genes for anthocyanin pigmentation of the seed and embryo are able not only to mark the hybrid embryo and identify haploid genotypes, but also to detect genes that suppress the anthocyanin color of the grain, like *C1-I*, *C2-Idf*, and *In1-D*. Depending on their quantity, the phenotypic manifestation of the gene in the seed varies. Haploidy is widely used for accelerating hybrid breeding and obtaining both new maize lines with improved traits and their sterile counterparts. By introducing certain genes into the genome of the improved line, breeders can use the doubled haploid (DH) breeding technology to accelerate the creation of pure lines carrying the desired gene. Haploid inducer maize lines and their tetraploid analogs are used in the selection of rediploid maize lines by their resynthesis from tetraploid genotypes. In 2019, Syngenta Company synthesized a haploid inducer maize line carrying a CRISPR/cas construct capable of simultaneously stimulating haploidy and editing the genome at a specified DNA site. Thanks to

this technology, it became possible to improve haploid inducers by introducing various CRISPR/cas constructs into the haploid inducer genome for editing any DNA site. Maize haploid inducers are widely used in doubled haploid wheat breeding. The first experiments showed that the most effective haploid inducer for stimulating haploidy in wheat is maize pollen. Researchers are intensively searching for other ways of using maize haploid inducers in plant breeding. Key words: maize; haploidy; haploid inducer; haploid; doubled haploid; tetraploid; rediploid.

For citation: Ulyanov A.V., Karlov A.V., Khatefov E.B. The use of maize haploidy inducers as a tool in agricultural plant biotechnology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):704-713. DOI 10.18699/VJGB-22-85

Введение

Создание инбредных линий является основной целью гибридной селекции кукурузы. В результате длительного самоопыления селекционерам удается получить гомозиготные линии для использования в качестве родителей при подборе гибридных комбинаций. Это самая продолжительная и трудоемкая часть селекционной работы. Дигаплоидные линии кукурузы обычно создают *in vivo* путем скрещивания с гаплоиндукторами, которые способны стимулировать образование гаплоидных зародышей в некоторой части зерновок материнского растения, служащего донором генетического материала для будущей дигаплоидной линии. Выделенные гаплоидные растения подвергают процедуре удвоения хромосомного числа до диплоидного, в результате чего на початке формируются гомозиготные дигаплоидные зерновки. Этот метод позволил быстро получать 100 % гомозиготные линии, что в свою очередь существенно сократило время и средства, затрачиваемые селекционерами на создание гибридной комбинации.

Существующие гаплоиндукторные линии характеризуются невысокой частотой гаплоиндукции и требуют дополнительных исследований по улучшению этого признака. Проведение исследований по повышению частоты гаплоиндукции у гаплоиндукторных линий вызвало интерес к механизму явления и изучению ее генетики. Область применения гаплоиндукторов и гаплоидии шагнула далеко за пределы только селекции дигаплоидных линий. На ее основе разрабатываются новые технологии в генетике и селекции растений.

В настоящей статье рассмотрены различные способы применения гаплоиндукторов кукурузы и явления гаплоиндукции, имеющие важное значение для исследований в области фундаментальной и прикладной генетики кукурузы и других культур, объясняется их генетическая основа, перечислены известные гены и локусы количественных признаков и обсуждаются разные подходы к селекции для развития технологий использования гаплоиндукторов.

Прогресс в селекции гаплоиндукторов кукурузы

Бурное развитие семеноводства гибридной кукурузы с середины XX в. способствовало интенсификации селекции инбредных линий с максимальной гомозиготностью генома. Эффективным методом улучшения качества семеноводства и ускоренного получения инбредных линий, селекции хозяйственно ценных признаков по сегодняшний день было и остается использование гаплоиндукции для создания дигаплоидных (DH) линий. Наиболее распространенным методом селекции инбредных линий долгое время был инцухт. Этот метод имел множество недостатков, один из которых – невозможность достижения 100 % гомозиготности по всем локусам аллелей генов у

инбредлируемой линии даже при десяти инцухтах. Высокая степень гомозиготности необходима для достижения максимальной выровненности всех селекционно ценных признаков (дружность всходов, сроки цветения и созревания, качество зерна и др.) и доведения до совершенства качества семеноводства, технологичности гибридных комбинаций, получаемых на ее основе, и, соответственно, улучшения качества товарной продукции. На создание линий с долей гомозигот 99.90 селекционер затрачивает 10 лет, а с долей 99.99 – до 14 лет (инцухта). Для селекции гетерозисных гибридов очень важна высокая доля гомозиготности, поскольку от нее зависит выровненность 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.

Внедрение в селекционную практику первых гаплоиндукторов позволило в короткий срок получить инбредные линии кукурузы со 100 % гомозиготностью по всем локусам генов. Благодаря их внедрению в практику гибридной селекции кукурузы, США с середины XX в. заняли лидирующие позиции в мире по производству гибридных семян кукурузы. Кроме улучшения качества семеноводческой продукции, гаплоиндукторная селекция широко применяется в улучшении инбредлируемых линий кукурузы. Быстрое получение чистых дигаплоидных линий кукурузы, в течение двух-трех лет, позволяет селекционерам за короткое время провести качественную оценку большего числа линий и генотипов по сравнению с ранее применявшимся методом инцухта (Seitz, 2005; Ravi et al., 2011). При этом расширились возможности отбора ценных аллелей генов и их быстрого введения в геном инбредлируемых генотипов. Гаплоиндукторные линии (HI) ежегодно используются для производства миллионов рекомбинантных растений на основе дигаплоидных (DH) линий, производных от F₁ или F₂ поколений. Это позволяет избежать шести и более поколений самоопыления, которые обычно требуются для получения инбредных линий, используемых не только в гибридной селекции, но и для генетического картирования, выявления интрогрессии признаков и в генетических исследованиях количественных признаков (Chang, Coo, 2009). Кроме того, DH-технология расширяет возможности как для улучшения качества селекционного отбора, так и для проведения более точного фенотипирования на разных этапах инцухта (Yan et al., 2017).

Методы гаплоиндукции находят применение во многих направлениях селекции, не только кукурузы, но и других культур. Явление гаплоидии недостаточно изучено и вызывает много вопросов, на которые предстоит ответить исследователям, начиная с понимания механизма гаплоид-

дии и до изучения всех возможностей его использования в генетических и селекционных исследованиях.

Впервые явление гаплоидии было описано Дороти Бергнер в 1922 г. на дурмане (*Datura stramonium*) (Blakelee et al., 1922). Через некоторое время гаплоидные генотипы были обнаружены у пшеницы (Gains, Aase, 1926) и табака (Clausen, Mann, 1924). Позже гаплоидия была найдена у всех основных культурных растений: пшеницы, ржи, кукурузы, риса, ячменя, сорго, картофеля, табака, хлопка, льна, свеклы, капусты, тыквы, огурцов, томатов; у кормовых трав: мятликов, костра, тимopheевки, люцерны, вики и др. (Кириллова, 1966). Гаплоиды были обнаружены и у многих других растений, но частота гаплоидии оставалась незначительной (0.001–0.01 %) для использования ее в селекции.

Гаплоидия является следствием нарушения механизма оплодотворения цветковых растений – андрогенеза и гиногенеза либо апомиксиса (Асадова и др., 2020). Потомство, полученное путем андрогенеза, характеризуется гаплоидным или дигаплоидным генетическим материалом и наследует признаки только отцовской формы (Астауров, 1977; Drevsky et al., 1985; Голубовский, 2000). Организм, формирующийся путем гиногенеза, несет гаплоидный или дигаплоидный материал материнского растения и наследует признаки только материнской формы (Астауров, 1966; Струнников, 1998). Организм, формирующийся путем апомиксиса, несет гаплоидный или дигаплоидный материал материнского растения и наследует признаки только материнской формы (Тахтаджян, 1980; Батыгина, 2000).

Серьезный прогресс в технологии гаплоиндукции был достигнут лишь спустя сорок лет после открытия гаплоидии у растений дурмана (*Datura stramonium*) *in vitro* посредством культуры пыльников (Guha, Maheshwari, 1964). Настоящий прорыв в селекции гибридов и их родительских линий был совершен благодаря созданию первых гаплоиндукторов и дигаплоидных линий кукурузы, которые впервые описал S. Chase (1949). Ему удалось установить, что гаплоидные растения кукурузы встречаются в посевах коммерческих инбредных линий с частотой 0.1 % (Chase, 1947). Он предположил, что при помощи гаплоидов можно селекционировать диплоидные чистые линии, что, в свою очередь, не могло не вызывать интерес у селекционеров и генетиков.

После опубликования S. Chase своих результатов во всем мире начались исследования по поиску линий кукурузы, способных стимулировать гаплоидию с определенной частотой, и разработка на их основе гаплоиндукторов с антоциановыми маркерами. Первый такой гаплоиндуктор, Stock 6, был получен в 1959 г. (Coe, 1959). Он имел частоту гаплоиндукции не выше 2–3 %, что по тем временам считалось достаточно высоким значением для начала его внедрения в селекционную практику и коммерческого использования для гибридной селекции кукурузы (Coe, 1959). Впоследствии с помощью различных методов селекционерам удалось увеличить частоту гаплоидии у вновь селективируемых гаплоиндукторов, происходящих от Stock 6, до 7–15 % (Eder, Chalyk, 2002; Xu et al., 2013; Асадова и др., 2020). В СССР первые исследования по гаплоиндукции кукурузы были начаты В.С. Тырновым и А.Н. Завалишиной в Саратовском университете под руководством проф. С.С. Хохлова (Хохлов и др., 1976; Тыр-

нов, Завалишина, 1984). Ими были выведены первые отечественные гаплоиндукторные линии кукурузы на основе линии AT-1, которая послужила источником для большинства гаплоиндукторов отечественной селекции. Количество эффективных гаплоиндукторов, используемых в мире для селекции гаплоидов кукурузы, варьирует в пределах 50–60 линий, большая их часть создана на основе линии Stock 6 (Hu et al., 2016).

Физиологические механизмы гаплоиндукции у кукурузы

Изучению механизма проявления гаплоидии у растений было посвящено много исследований, которые показали, что в ее основе лежит явление партеногенеза (Шинкинская, Юдакова, 2009; Юдакова, 2017) либо гиногенез – когда семена формируют зародыш, который развивается из неоплодотворенной яйцеклетки, с триплоидным эндоспермом, возникшим в результате слияния родительских гамет со вторичным ядром зародышевого мешка (Тахтаджян, 1980; Батыгина, 2000). Метод получения гаплоидов на основе явления гиногенеза *in vitro* используют в селекции лука (*Allium cepa* L.) (Campion et al., 1992), сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) (Doctrinal et al., 1989), некоторых деревьев *in vivo* (Бородина, 1982). У лука (*A. cepa*) гиногенез протекает в культуре цветочных почек или завязей (Keller, 1990). Следует отметить, что для индукции гиногенеза решающую роль играет размер цветочных почек и состав питательной среды (Michalik et al., 2000).

Механизм гаплоидии у кукурузы в естественных условиях может быть запущен вследствие нарушения процессов слияния одного из двух спермиев с яйцеклеткой. Возникновению гаплоидии способствует также процесс элиминации одного из спермиев после их проникновения в зародышевый мешок (Тырнов, Хохлов, 1974, 1976). Накопление мутаций в геноме, нарушающих процесс оплодотворения у кукурузы, способствует повышению частоты гаплоидии как на собственных, так и на гибридных початках при перекрестном опылении. Поиск таких мутаций и их выявление позволяют накопить ценный исходный материал для создания линий-гаплоиндукторов кукурузы (Хохлов и др., 1976). Установлено, что гаплоидные зародыши могут образовываться при отдаленной гибридации (Kasha, Kao, 1970; Laurie, Snape, 1990).

Механизмы возникновения гаплоидии при оплодотворении зародышевого мешка цветковых растений все еще выясняются. В большинстве случаев происходит нормальное двойное оплодотворение с образованием зиготы и эндосперма, но последующие несколько первых митотических делений приводят к элиминации отцовских хромосом как в зиготе, так и в клетках эндосперма (Chaikam et al., 2019). Для объяснения этого процесса у линий гаплоиндукторов, полученных из Stock 6 в настоящее время, предложены две гипотезы: гипотеза одинарного оплодотворения и гипотеза исключения хромосом. Первой была выдвинута гипотеза одинарного оплодотворения (Sprague, 1929, 1932), согласно которой один из спермиев не может слиться с яйцеклеткой, что способствует запуску развития гаплоидного зародыша. Обнаружено, что около 6 % пыльцы у линии гаплоиндукторов ZMS (Зародышевый Маркер Саратовский) имели разные размеры спермиев

(Bylich, Chalyk, 1996). Авторы предположили, что один из спермиев успешно оплодотворяет эндосперм или яйцеклетку, а другой, вследствие своей аномальности, не способен к оплодотворению (Bylich, Chalyk, 1996). В. Chen с коллегами показали, что в слабо развитых яйцеклетках незрелых зародышей не образуется четко оформленного зародыша, несмотря на нормальное формирование эндосперма (Chen B. et al., 2016; Tian et al., 2018). Это позволяет предположить, что имеет место событие одинарного оплодотворения только одним спермием из двух (Chen B. et al., 2016; Tian et al., 2018).

Согласно второй гипотезе, придерживающейся теории элиминации хромосом, двойное оплодотворение происходит нормально, но хромосомы гаплоиндукторов элиминируют в течение нескольких зиготических делений. В пользу этой гипотезы свидетельствуют несколько фактов, одним из которых является пример возникновения нескольких микроядер в некоторых семязачатках, которые были оплодотворены пылью гаплоиндуктора с последующей элиминацией хромосом гаплоиндуктора (Wedzony et al., 2002, Fischer, 2004; Li L. et al., 2009). Позже X. Li с коллегами обнаружили, что элиминация хромосом напрямую связана с индукцией гаплоидного генотипа у зародыша и процесс элиминирования происходит постепенно, поэтому они предложили две модели механизма гаплоиндукции у кукурузы в соответствии с важностью элиминации хромосом в обоих спермиях (Li X. et al., 2017). Модель I предполагает слияние нормальных или слегка дефектных спермиев с нормальными яйцеклетками с последующим образованием диплоидных гибридных зерновок на початке. Модель II предполагает образование гаплоидов при оплодотворении спермием яйцеклетки с последующей элиминацией его хромосом, тогда как при оплодотворении этим же спермием центральной клетки образуются abortивные зерновки.

Генетические механизмы гаплоиндукции у кукурузы

Важным этапом в исследовании гаплоиндукции стало определение локализации группы генов, способствующих гаплоидии, которое было проведено на гаплоиндукторных линиях Stock 6. Установлено, что наиболее часто в современных гаплоиндукторах кукурузы используют гены, локализованные в районах *qhir1*, *qhir11*, *qhir12* хромосомы 1 (Hu et al., 2016). Однако оценка частоты гаплоиндукции у генотипов, содержащих субрегионы *qhir11* и *qhir12*, показала, что только *qhir11* оказывает значительное влияние на гаплоиндукцию (Nair et al., 2017). В области *qhir11* ген, кодирующий фосфолипазу A, был идентифицирован как ответственный за гаплоиндукцию тремя независимыми исследовательскими группами и назван *MATRILINEAL (MTL)* (Kelliher et al., 2017), *NOT LIKE DAD (NLD)* (Gilles et al., 2017) и *ZmPLA1* (Liu C. et al., 2017). Показано, что мутантный ген *MTL/NLD/ZmPLA1* имеет вставку 4 п. н. в четвертом экзоне (CGAG), что в свою очередь оказывает эффект гаплоиндукции. Данная вставка сдвигает рамку считывания, изменяя тем самым последовательности 20 нуклеотидов и образуя преждевременный стоп-кодон, который укорачивает белок на 29 аминокислот в сравнении с белком, производным от гена дикого типа. Эта вставка присутствовала во всех гаплоиндукторных лини-

ях кукурузы, которые происходили от Stock 6 (Liu C. et al., 2017). Следует обратить внимание на то, что данная мутация не обнаружена у предковой формы кукурузы – теосинте, что предполагает возникновение этой мутации после одомашнивания кукурузы (Liu C. et al., 2017).

Другим не менее интересным открытием является то, что некоторые события генного редактирования и нокадауна увеличивают частоту гаплоидии, указывая этим на возможность создания индуктора с более высокой частотой гаплоиндукции путем модификации гена *MTL*. Ген *MTL*, кодирующий пататин-подобную фосфолипазу, экспрессируется именно в пыльце кукурузы (Gilles et al., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu C. et al., 2017). В свою очередь, измененная фосфолипаза влияет как на скорость прорастания пыльцы на рыльцах кукурузы, так и на рост пыльцевых трубок к зародышевым мешкам, значительно замедляя их прорастание (Kim et al., 2011), что объясняет гаплоиндукторную способность кукурузы (Xu et al., 2013; Kelliher et al., 2017). Однако механизмы гаплоидии путем одинарного оплодотворения (Sarkar, Coe, 1966) или пост-зиготической элиминации генома (Qiu et al., 2014; Li X. et al., 2017) все еще оставляют много вопросов и не ясны.

В недавних исследованиях китайских ученых, посвященных изучению факторов, влияющих на частоту гаплоидии, был охарактеризован мембранный белок DUF679 (*ZmDMP*) у линии, которая не имеет родства с линией-гаплоиндуктором Stock 6 (Zhong et al., 2019). Исследователям удалось установить, что этот ген локализован в хромосоме 9 в области *qhir8*. Доказано, что мутация в данном гене в сочетании с мутантным геном гаплоиндукции (содержащим вставку 4 п. н.) *MTL/ZmPLA1/NLD* значительно усиливает гаплоиндукцию. При этом авторы отмечают, что сама по себе мутация гена *ZmDMP*, без взаимодействия с *mtl/pla1/nld*, не вызывает повышения частоты гаплоиндукции. Нокаут *ZmDMP* дикого типа приводил к значению частоты гаплоиндукции 0.1–0.3 % при отсутствии мутации в гене *MTL*, но в сочетании с мутацией в гене *MTL* это увеличивало частоту гаплоиндукции в 5–6 раз. Результаты показывают, что мутация в гене *MTL* имеет решающее значение для индукции гаплоидов с высокой частотой в присутствии гена *ZmDMP*. Механизм, с помощью которого ген *MTL* обуславливает гаплоидную индукцию, и то, как взаимодействие этого гена с *ZmDMP* увеличивает частоту гаплоиндукции, еще предстоит расшифровать.

Использование гаплоиндукторов кукурузы для маркирования гаплоидных зерновок у генотипов с окрашенными и неокрашенными зерновками

В 1949 г. S. Chase предложил ввести генетические маркеры в геном линий-гаплоиндукторов кукурузы (Chase, 1949), значение которых сводится к тому, что в гибридном потомстве от их скрещиваний с линиями-донорами мы можем наблюдать фенотипическое проявление доминантных признаков, тогда как у матроклинных гаплоидов – рецессивных (Гуторова и др., 2016). Применение доминантных маркеров в гаплоиндукторных линиях кукурузы существенно упрощает работу по выбраковке гибридных диплоидных зерновок и повышает качество отбора гаплоидных, у которых эти маркеры отсутствуют.

Благодаря предложенному методу маркирования были созданы различные гаплоиндукторы, значительно повысившие эффективность этой технологии (Nanda, Chase, 1966; Greenblatt, Bock, 1967; Chase, 1969).

Большинство фенотипических маркеров, используемых для выделения гаплоидных зерновок из диплоидных, представлены доминантными генами. Эти гены характеризуются эффектами антоциановых (пурпурных) маркеров на различных частях зерна и растения. В самых популярных гаплоиндукторных линиях кукурузы визуальная дифференциация гаплоидных и диплоидных зерновок основана на маркере пурпурной окраски зародыша, который кодирует ген *R1 – navajo (R1-nj)*, а отсутствие доминантного аллеля блокирует синтез антоцианов в алейроновом слое зерновки (Ford, 2000). Следует отметить, что экспрессия антоцианового маркера *R1-nj* на гибридных зерновках кукурузы может значительно варьировать в зависимости от генотипа материнской линии, используемой в гибридной комбинации, генотипа самого гаплоиндуктора, а также факторов окружающей среды (Chase, 1952; Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011).

Помимо гена *R1-nj*, для более надежного отбора гаплоидных генотипов были использованы другие гены контролирующего биосинтеза антоцианов (пурпурная окраска), такие как *A1, A2, C2, Bz1, Bz2*, и другой регуляторный ген *C1*, экспрессия которых основывалась на ингибировании синтеза антоцианов в растениях, несущих гомозиготы рецессивных аллелей любого из перечисленных (*A1, A2, C2, Bz1, Bz2*) генов (Chase, Nanda, 1965; Geiger, Gordillo, 2009). Кроме того, на фенотип пурпурной окраски семян могут влиять доминантные гены-ингибиторы синтеза антоцианов *C1-I, C2-Idf* и *In1-ID* (Сое, 1994; Eder, Chalyk, 2002). Исследования, проведенные в CIMMYT, позволили предположить, что экспрессия пурпурной окраски зерновки геном *R1-nj* ингибируется в пределах 8 % скрещиваний гаплоидных индукторов с различными генотипами кукурузы (Röber et al., 2005; Prasanna et al., 2012). Ген *P11 (Purple1)* характеризуется зависимой от освещения продукцией антоцианов в корнях. Этот эффект обеспечивает дополнительный способ различия между гаплоидными и диплоидными генотипами. В случае, если под воздействием генов-ингибиторов синтеза антоцианов (*C1-I, C2-Idf* и *In1-ID*) у маркера *R1-nj* были неправильно классифицированы зерновки, эффект действия гена *P11* позволяет отличить гибридные зерновки по наличию пурпурной окраски на первичных (зародышевых) корешках у предполагаемых гаплоидных зерновок кукурузы. Однако корни проростков некоторых реципиентов, несущих этот ген, могут сами приобретать пурпурную окраску при воздействии света, что в этом случае делает классификацию на основе *P11* ошибочной. Соединение в одном геноме генов *P11* и *B1 (Booster1)* приводит к продукции антоцианов в колеоптиле проростка, кончике листьев, первичном корешке. Растения, гомозиготные по аллелям генов *B1* и *P11*, приобретают темно-пурпурный цвет обертков початка и стебля (Сое, 1994), но эти маркеры были эффективны для генотипов, которые не содержат пигменты в алейроновом слое или различных частях кукурузного растения-реципиента.

С появлением метода ИК-спектроскопии для анализа химического состава зерна расширились возможности

маркирования гаплоидов. В 2007 г. V. Rotarencо предложил использовать в качестве маркеров гаплоидных зерновок содержание масла в зародыше семян (Rotarencо et al., 2007, 2010). Анализ химического состава зародыша методом ЯМР показал значительные различия в содержании масла в диплоидных и гаплоидных зерновках, которые составили 5.26 и 3.42 % соответственно (Chen S., Song, 2003). Основываясь на этих результатах, L. Li с коллегами скрестили высокомасличную линию с линией Stock 6, создав на основе полученного гибрида гаплоиндуктор SAUHO1 с частотой гаплоиндукции до 2 % и содержанием масла в зерновке до 7.8 % (Li L. et al., 2009). Этот гаплоиндуктор позволяет существенно расширить применение линий-гаплоиндукторов для получения гаплоидов на различных генотипах кукурузы, характеризующихся наличием пурпурной окраски разных частей растения и зерновки, либо ингибиторов фенотипического проявления генов *R1-nj*. В исследованиях Z. Liu с коллегами (Liu Z. et al., 2016) было доказано, что содержание масла в зародыше зерновки позволяет идентифицировать гаплоидные генотипы с точностью не ниже 90 %.

Использование гаплоиндукторов кукурузы для ресинтеза полиплоидных генотипов

Создание эффективных гаплоиндукторов позволило выделить новое направление в селекции – селекцию редиплоидной кукурузы с помощью ресинтеза полиплоидных генотипов. Впервые для кукурузы этот метод был описан О.А. Шацкой и Э.Б. Хатефовым в 2007 г. Авторы предложили два способа селекции редиплоидных линий кукурузы (Хатефов, Шацкая, 2007). Первый способ предусматривал ресинтез редиплоидных линий из гибридных триплоидных зерновок без использования гаплоиндуктора; он был очень громоздким и трудоемким и не нашел широкого применения в селекции. Вторым предлагалось использование диплоидных и тетраплоидных аналогов линий-гаплоиндукторов в схеме скрещиваний с тетраплоидными источниками. Этот метод был значительно проще и удобнее при условии наличия у селекционера тетраплоидного аналога линии-гаплоиндуктора. С использованием метода редиплоидизации тетраплоидных генотипов была создана серия редиплоидных линий кукурузы из тетраплоидной синтетической популяции МРПП20.

Дальнейшее испытание селекционной ценности коллекции редиплоидных линий, полученных методом ресинтеза из тетраплоидных популяций, показало их высокую эффективность в гибридной селекции кукурузы (Хатефов, Матвеева, 2018; Хатефов и др., 2019, 2021). Использование этого метода для ресинтеза на естественных тетраплоидных генотипах и популяциях культурных и диких сородичей кукурузы открывает перспективы для расширения генетического полиморфизма исходного селекционного материала и селекционного улучшения кукурузы.

Использование гаплоиндукторов кукурузы для создания стерильных аналогов линий-закрепителей ЦМС

Наравне с распространением метода создания дигаплоидных линий для гибридной селекции кукурузы с течением времени возникла проблема селекции их стерильных аналогов. Сложность решения этой задачи заключается в

том, что стерильный аналог получают на стерильной (S) цитоплазме, являющейся материнской формой в гибридной селекции кукурузы. Ее селекционируют путем проведения серии беккроссов источника ядерного материала на нормальной (N) цитоплазме от линии-закрепителя, служащей отцовской формой. В этой схеме становится невозможным использовать линию-гаплоиндуктор для создания стерильного аналога традиционным способом, где гаплоиндуктор служит отцовской формой, поскольку выделенный на стерильной цитоплазме дигаплоидный аналог будет стерильным и после дигаплоидизации размножить его будет невозможно.

В ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко» был найден способ селекции стерильных аналогов линий кукурузы методом андрогенеза с помощью ЦМС-*ig* гаплоиндукторов, несущих мутацию *ig1* (Kermicle, 1969, 1971, 1994). В основу метода положен принцип, при котором ядро спермия замещает ядро яйцеклетки. Предложенный метод обуславливает слияние одного из спермиев от источника генов *rf1f* с яйцеклеткой линии-гаплоиндуктора, служащей материнской формой на стерильной цитоплазме М- или С-типов ЦМС. Аналогично линиям-гаплоиндукторам, используемым в качестве источника пыльцы, материнские линии-гаплоиндукторы несут аллели генов *ig1* в сочетании с генами *R1-nj*, *P11* и *B1*. Материнские формы гаплоиндукторов, гомозиготные по мутации *ig1*, проявляют длительную фазу безъядерных делений, которая завершается формированием безъядерных яйцеклеток (Evans, 2007). При гибридизации между отцовской формой, несущей гомозиготы аллелей ядерных генов *rf1f* (закрепителем), и источником стерильной цитоплазмы (материнская форма) в завязавшихся на материнских початках зерновках формируется 100 % стерильный аналог отцовской линии (Чумак, 1977; Шацкая, Щербак, 1999). В дальнейшем для размножения стерильного аналога в качестве опылителя используют только отцовскую линию, послужившую источником пыльцы для гаплоиндукции. Благодаря этому методу в отделе кукурузы НЦЗ им. П.П. Лукьяненко ведется селекция стерильных аналогов линий кукурузы в течение двух лет, что гораздо эффективнее традиционного метода насыщающего скрещивания, занимающего восемь лет селекционной работы и более.

CENH3-опосредованная гаплоиндукция

В 2010 г. появилось сообщение, что мутантный ген *CENH3* может индуцировать гаплоиды при скрещивании с диким типом *Arabidopsis thaliana* (Ravi, Chan, 2010). Мутантный ген *CENH3* был создан путем замены эндогенного N-концевого (N-ter) хвоста у *CENH3* на флуоресцентный белок GFP, слитый с N-ter хвостом обычного гистона 3.3, который частично дополняет летальный фенотип нулевого мутанта *cenh3*. При использовании в качестве реципиента (материнского растения) пыльцы дикого типа трансгенная линия GFP-tailswap привела к индукции ~30 % гаплоидных зародышей только с мужским (дикого типа) геномом. Женские хромосомы, помеченные GFP-tailswap, теряются во время ранних делений зиготы, создавая высокую частоту отцовских гаплоидных зародышей вместе с анеуплоидными (~30 %) и нормальными диплоидными зародышами. В перспективе эту форму гаплоиндукции можно

будет внедрить в другие важные сельскохозяйственные культуры (Tek et al., 2015).

Попытки редактирования N-концевого (N-ter) хвоста у *CENH3* были успешно проведены у кукурузы (Tek et al., 2015), томата и риса (Kalinowska et al., 2019). Хотя уровень естественной гаплоиндукции оказался относительно низок (0.065–0.86 % у кукурузы, 0.2–2.3 % у томата и 0.3–1.0 % у риса), эти эксперименты продемонстрировали осуществимость гаплоиндукции путем замены N-концевого хвоста гена *CENH3* у однодольных культурных растений. М. Saneї с коллегами (Saneї et al., 2011) обнаружили, что *CENH3 H. bulbosum* неактивен и/или *CENH3 H. vulgare* не может быть введен в отцовскую форму в классическом межвидовом скрещивании ячменя (*H. vulgare* × *H. bulbosum*), поскольку приводит к формированию гаплоидов только с материнским геномом. Исследования, проведенные группой X. Zhao с коллегами (Zhao et al., 2013), выявили, что ген *CENH3* не вносит прямого вклада в способность индуцировать гаплоиды. Этот вывод согласуется с результатами исследований по картированию QTL (Prigge, Melchinger, 2012). Однако, как предполагают авторы, *CENH3* может оказывать влияние на элиминацию хромосом гаплоиндукторной линии во время образования гаплоидов у кукурузы. Авторы не нашли каких-либо различий в кодирующей последовательности и уровне экспрессии мРНК между индукторными и неиндукторными линиями, в то время как регуляторные уровни *CENH3* (сплайс-варианты, трансляция, модификация и др.) могут различаться. Результаты исследования показали, что ген *CENH3* действует эпигенетически в растениях (Han et al., 2009; Ravi, Chan, 2010; Saneї et al., 2011). Эти новые знания открывают широкие перспективы для ученых, занимающихся разработкой гаплоиндукторных линий для сельскохозяйственных культур, у которых затруднено создание гаплоиндукторов классическими селекционными методами.

Использование CRISPR/cas системы для получения редактированных дигаплоидных линий

За последнее десятилетие применение метода CRISPR/cas в сельском хозяйстве значительно расширилось. Для получения чистых линий с редактированным геномом используются различные гаплоиндукторы, и в том числе кукурузы. Это позволяет ученым ускорить селекцию, создавая растения с нужными признаками за короткие сроки. В 2019 г. две группы ученых из Америки и Китая под руководством Т. Kelliher и В. Wang независимо друг от друга решили объединить метод генетического редактирования посредством CRISPR/cas и гаплоидную индукцию *in planta*, используя два гаплоиндуктора – HI-Edit (Kelliher et al., 2019) и IMGE (Wang et al., 2019). Они провели исследования по их трансформации посредством *Agrobacter*, несущей вектор, который содержал последовательность CRISPR/cas. Трансформированные линии-гаплоиндукторы были скрещены с элитными линиями кукурузы. После созревания гибридных зерновок был проведен тест в выделенных гаплоидных зерновках на наличие мутации (маркеров трансформационных событий) в целевом участке гена (мишени). Результатом данных исследований являлось то, что инструмент CRISPR/cas

может экспрессироваться или присутствовать в зиготе до элиминации генома гаплоиндуктора, неся трансген, необходимый для редактирования нетрансгенного гаплоидного генома элитной линии. Дальнейшее изучение механизмов передачи системы CRISPR/cas через линии-гаплоиндукторы послужит их совершенствованию и расширению возможности их использования как эффективного инструмента для редактирования генома кукурузы и других сельскохозяйственных культур. Модификация единичных материнских гаплоидных растений при помощи гаплоиндуктора подтверждает факт слияния спермия с яйцеклеткой и доставки туда CRISPR/cas системы. Впоследствии в результате элиминации мужских хромосом происходит образование гаплоидного растения с отредактированным геномом (Kelliher et al., 2019), опосредованным гаплоиндуктором (IMGE) (Wang et al., 2019). Разработанная авторами методика позволяет в течение одной репродукции получать дигаплоидные линии с отредактированным по целевым генам геномом.

Создание гаплоидов возможно также при межвидовом скрещивании с последующей элиминацией хромосом гаплоиндуктора. В селекции ячменя метод селективной элиминации хромосом широко используют для получения гаплоидов при скрещивании *H. vulgare* L. × *H. bulbosum* L. («бульбозум»-метод). Впервые этот межвидовой гибрид был получен еще в 1934 г. Позднее установлено, что появление гаплоидных растений материнского типа было следствием не партеногенеза, а селективной элиминации хромосом *H. bulbosum* ($2n = 2x = 14$) в чужеродной цитоплазме *H. vulgare* ($2n = 2x = 14$) в течение 9 дней от скрещивания (Gernand et al., 2006). В результате этого процесса происходит элиминация хромосом дикого вида и образуется гаплоидный зародыш, а эндосперм остается недоразвитым. Поэтому зародыш через 12–14 дней после опыления необходимо ввести в культуру *in vitro*, а выделенные гаплоидные растения-регенеранты колхичинировать для дигаплоидизации. В исследованиях А.П. Ермишина (Ермишин, Воронкова, 2015) на культурном картофеле *Solanum tuberosum* L. ($2n = 2x = 24$) описан метод селекции дигаплоидов путем использования в качестве гаплопродюсера примитивного культурного вида картофеля *S. phureja* ($2n = 2x = 24$). В основе метода лежит явление псевдогамии, при котором оба спермия пыльцевого зерна диплоидного вида ($n = x = 12$) сливаются с центральным ядром зародышевого мешка *S. tuberosum* ($2n = 4x = 48$), что ведет к формированию гексаплоидного эндосперма. При этом неоплодотворенная яйцеклетка ($n = 2x = 24$) приступает к дифференциации; формируется семязачаток, в котором сочетается гексаплоидный эндосперм с диплоидным зародышем, который жизнеспособен и может развиваться в нормальное семя (Ермишин, Воронкова, 2015).

Довольно оригинально метод гаплоиндукции применяется в размножении двудомной культуры спаржи *Asparagus officinalis* для увеличения в потомстве доли генотипов с низким содержанием волокна в стеблях. Для этого проводят гибридизацию между женскими (XX) и мужскими (XY) генотипами, в потомстве которых выщепляются в соотношении 1:1 женские волокнистые и мужские низковолокнистые генотипы. Индуцирование гаплоидии на мужских генотипах с последующей дигаплоидизацией

гаплоидных генотипов позволяет создавать дигаплоидные супермужские (YY) и женские (XX) растения. Использование в качестве опылителей женских генотипов источника с удвоенными мужскими генотипами позволяет получить в потомстве F_1 100 % мужские (XY) растения (Bhojwani, Razdan, 1996). Аналогично применяют гаплоидию для получения однополых генотипов папайи (*Carica papaya*), с той лишь разницей, что коммерческую ценность представляют уже женские растения. В этом случае для селекции дигаплоидных линий используют метод культуры пыльников, что значительно облегчает выделение из гибридного потомства женских чистых линий (Rimberia et al., 2006).

В селекции дигаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в качестве источников пыльцы используют пыльцу других злаковых культур, таких как кукуруза, сорго, теосинте, декоративное просо, дикий ячмень *H. bulbosum*, но наиболее эффективным гаплоиндуктором для пшеницы и овса (*Avena sativa* L.) остается пыльца кукурузы (Laurie, Bennett, 1988; Dziurka et al., 2022). Цитологические исследования установили, что пыльца кукурузы успешно прорастает на рыльце пшеницы и достигает зародышевого мешка, в котором яйцеклетка пшеницы оплодотворяется спермием из пыльцевого зерна кукурузы с образованием зиготы, содержащей 21 хромосому пшеницы и 10 хромосом кукурузы (Laurie, 1989). Образовавшаяся гибридная зигота кариотипически нестабильна, поскольку хромосомы кукурузы не прикрепляются к веретену деления и элиминируют. Этот процесс послужил основой для оригинального метода, разработанного фирмой Syngenta, которая использовала его для редактирования генома пшеницы. Для достижения поставленной цели была проведена трансформация кукурузы (линия NP2222) вектором, экспрессирующим Cas9, и г-РНК, нацеленной на предполагаемые ортологи пшеницы *GRASSY TILLER1 TaGT1-4A*, *TaGT1-4B* и *TaGT1-4D*. В итоге два из 292 гаплоидов CMS были отредактированы, и секвенирование генов мишеней показало, что ген *JSWER30A22* имеет делецию 97 п. н. в *TaGT1-4B* (Kelliher et al., 2019). Этот результат свидетельствует о том, что метод Hi-edit редактирования в перспективе можно будет использовать на пшенице, получая одновременно гаплоидные зародыши с уже отредактированным геномом, что в свою очередь существенно ускорит селекцию по улучшению пшениц (Kelliher et al., 2019).

Заключение

С развитием прикладной генетики и селекционных технологий появляются все новые области применения явления гаплоиндукции с использованием линий-гаплоиндукторов кукурузы. Исследований по использованию гаплоиндукторов кукурузы на практике становится все больше, существенно увеличивая число не только представителей рода *Zea*, включая шесть собственных видов, но и межвидовых скрещиваний с представителями других родов, как *Triticinae* и *Aveneae*. Первые созданные линии-гаплоиндукторы послужили источниками многих более эффективных гаплоиндукторных линий за счет включения различных мутаций-усилителей частоты гаплоиндукции и их маркерных свойств, введения генов антоциановой окраски зерна и растений, а также генов, контролирующих

высокое содержание некоторых биохимических компонентов зародыша. Использование гаплоиндукторов кукурузы для расширения генетического полиморфизма исходного селекционного материала позволило исследователям и селекционерам разработать новые технологии и методы получения дигаплоидных линий не только из диплоидных сортов, популяций и синтетиков, но и из полиплоидных генотипов кукурузы и ее диких тетраплоидных сороридей. Этот метод значительно ускорил селекцию гибридной кукурузы путем создания новых линий-гаплоиндукторов на стерильной цитоплазме С- и М-типов ЦМС для получения стерильных дигаплоидных линий кукурузы. Совершенствование метода CRISPR/cas с помощью линий-гаплоиндукторов открывает большие перспективы в редактировании генома кукурузы, где становится возможным сочетание двух элементов в одной селекционной операции: редактирование генома с помощью CRISPR/cas и получение 100 % гомозиготной дигаплоидной линии, несущей эти генетические изменения. Исследования в сфере гаплоиндукторной селекции кукурузы давно перешагнули границы применения в гибридной селекции для получения дигаплоидных линий. С каждым годом совершенствуется область их использования в прикладной генетике и селекции.

Список литературы / References

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.
[Asadova G.M., Ul'yanov A.V., Karlov M.V., Hatefov E.B. The prospects for using haploinducers in maize breeding. *Biotehnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(2): 16-29. DOI 10.30901/2658-6266-2020-2-03. (in Russian)]

Астауров Б.Л. Генетика пола. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1966.
[Astaurov B.L. Genetics of Sex. Moscow: Moscow University Press, 1966. (in Russian)]

Астауров Б.Л. Партеногенез, андрогенез, полиплоидия. М.: Наука, 1977.
[Astaurov B.L. Parthenogenesis, Androgenesis, Polyploidy. Moscow: Nauka Publ., 1977. (in Russian)]

Батыгина Т.Б. Апомиксис. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. СПб.: Мир и семья, 2000.
[Batygina T.B. Apomixis. Embryology of Flowering Plants. Terminology and concepts. Vol. 3. Reproduction systems. St. Petersburg: Mir i Sem'ya Publ., 2000. (in Russian)]

Бородин Н.А. Полиплоидия в интродукции древесных растений. М.: Наука, 1982.
[Borodina N.A. Polyploidy in the Introduction of Woody Plants. Moscow: Nauka Publ., 1982. (in Russian)]

Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. СПб.: БорейАрт, 2000.
[Golubovsky M.D. The Centenary of Genetics: Evolution of ideas and concepts. St. Petersburg: BoreyArt Publ., 2000. (in Russian)]

Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза. *Изв. Самар. науч. центра РАН*. 2016;18(2-2):341-344.
[Gutorova O.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2016;18(2-2):341-344. (in Russian)]

Ермишин А.П., Воронкова Е.В. Биотехнология растений и биобезопасность: пособие. Минск: БГУ, 2015.

[Ermishin A.P., Voronkova E.V. Plant Biotechnology and Biosafety: a guide. Minsk: BGU Publ., 2015. (in Russian)]

Кириллова Г.А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1966;2(2):137-147.
[Kirillova G.A. The phenomenon of haploidy in angiosperms. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1966;2(2):137-147. (in Russian)]

Струнников В.А. Клонирование животных: теория и практика. *Природа*. 1998;7:3-9.
[Strunnikov V.A. Animal cloning: theory and practice. *Priroda = Nature*. 1998;7:3-9. (in Russian)]

Тахтаджян А.Л. Жизнь растений. М.: Просвещение, 1980.
[Taktadzhyan A.L. Plant Life. Moscow: Prosveshcheniye Publ., 1980. (in Russian)]

Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинических гаплоидов кукурузы. *Докл. АН СССР*. 1984;276(3):735-738.
[Tyrnov V.S., Zavalishina A.N. Induction of high frequency of occurrence of matroclinic haploids in maize. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Doklady Academy of Sciences of the USSR*. 1984;276(3): 735-738. (in Russian)]

Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез у покрытосеменных растений. *Генетика*. 1974;10(9):154-167.
[Tyrnov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis in angiosperms. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1974;10(9):154-167. (in Russian)]

Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез. В: Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976;87-99.
[Tyrnov V.S., Khokhlov S.S. Androgenesis. In: Haploidy and Breeding. Moscow: Nauka Publ., 1976;87-99 (in Russian)]

Хатефов Э.Б., Матвеева Г.В. Получение редиплоидных линий кукурузы. СПб.: ВИР, 2018.
[Khatefov E.B., Matveeva G.V. Raise of Rediploid Maize Lines. St. Petersburg: VIR Publ., 2018. (in Russian)]

Хатефов Э.Б., Хорева В.И., Шомахов Б.Р., Кушхова Р.С., Хаширова З.Т., Кудяев Р.А., Гяургиев А.Х. Редиплоидные линии кукурузы: (ресинтезированные из тетраплоидной популяции диплоидные линии для гибридной селекции кукурузы). СПб.: ВИР, 2021.
[Khatefov E.B., Khoreva V.I., Shomakhov B.R., Kushkhova R.S., Khashirova Z.T., Kudaev R.A., Gyaurgiev A.Kh. Rediploid Maize Lines (diploid lines resynthesized from a tetraploid population for hybrid maize breeding). St. Petersburg: VIR Publ., 2021. (in Russian)]

Хатефов Э.Б., Шацкая О.А. Применение гаплоиндукторов в гетероплоидных скрещиваниях для расширения разнообразия генетической основы кукурузы. В: Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы. Тезисы докл. II Вавиловской междунар. конф., г. Санкт-Петербург, 26–30 нояб. 2007 г. СПб.: ВИР, 2007;367-369.
[Khatefov E.B., Shatskaya O.A. The use of haploinducers in heteroploid crosses to expand the diversity of the genetic basis of maize. In: Genetic Resources of Cultivated Plants in the 21st Century: State, problems, prospects. Abstracts from the 2nd Vavilov Int. Conf., St. Petersburg, November 26–30, 2007. St. Petersburg: VIR Publ., 2007;367-369. (in Russian)]

Хатефов Э.Б., Шомахов Б.Р., Кушхова Р.С., Кудяев Р.А., Хаширова З.Т., Гяургиев А.Х. Характеристика редиплоидных линий кукурузы селекции ВИР по комбинационной способности и реакции на ЦМС. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4): 15-23. DOI 10.30901/2658-6266-2019-4-0.
[Khatefov E.B., Shomakhov B.R., Kushkhova R.S., Kudaev R.A., Khashirova Z.T., Gyaurgiev A.Kh. Combining ability and response to CMS in reverse diploid maize lines developed at VIR. *Biotehnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):15-23. DOI 10.30901/2658-6266-2019-4-0. (in Russian)]

Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В., Давоян Н.И. Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976.
[Khokhlov S.S., Tyrnov V.S., Grishina E.V., Davoyan N.I. Haploidy and Breeding. Moscow: Nauka Publ., 1976. (in Russian)]

- Чумак М.В. Оценка известных и создание новых маркеров для выделения гаплоидов кукурузы. В: Вопросы селекции зерновых, зернобобовых культур и трав. Сб. науч. трудов. Вып. 14. Краснодар, 1977;110-124.
[Chumak M.V. Evaluation of known and creation of new markers for the isolation of maize haploids. In: Issues of the Breeding of Grains, Grain Leguminous Crops, and Herbs. Collection of scientific works. Iss. 14. Krasnodar, 1977;110-124. (in Russian)]
- Шацкая О.А., Щербак В.С. Использование модифицированной *ig*-системы для создания новых форм кукурузы с повышенным андрогенезом. В: Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы: Юбил. вып., посвящ. 100-летию со дня рождения академика М.И. Хаджинова. Краснодар, 1999;211-218.
[Shatskaya O.A., Shcherbak V.S. Using a modified *ig* system to create new forms of maize with increased androgenesis. In: Genetics, Breeding, and Technology of Maize Cultivation: Special issue dedicated to the 100th anniversary of Academician M.I. Khadzhi-nov. Krasnodar, 1999;211-218. (in Russian)]
- Шишкинская Н.А., Юдакова О.И. Апомиксис и эволюция растений. *Изв. Сарат. ун-та. Сер. Химия, Биология, Экология*. 2009; 9(1):55-60.
[Shishkinskaya N.A., Yudakova O.I. Apomixis and plant evolution. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Seriya Khimiya, Biologiya, Ekologiya = Izvestiya of Saratov University. Ser.: Chemistry. Biology. Ecology*. 2009;9(1):55-60. (in Russian)]
- Юдакова О.И. Системы репродукции растений. Апомиксис. Саратов, 2017.
[Yudakova O.I. Plant Reproduction Systems. Apomixis. Saratov, 2017. (in Russian)]
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier, 1996.
- 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.
- Bylich V., Chalyk S. Existence of pollen grains with a pair of morphologically divergent sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line. *Maize Genet. Coop. News Lett*. 1996;70:33.
- Campion B., Azzimonti M., Vicini E., Schiavi M., Falavigna A. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Sci*. 1992;86(1):97-104. DOI 10.1016/0168-9452(92)90183-M.
- Chaikam V., Molenaar W., Melchinger A.E., Boddupalli P.M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet*. 2019;132(12):3227-3243. DOI 10.1007/s00122-019-03433-x.
- Chang M.T., Coe E.H. Doubled haploids. In: Kriz A.L., Larkins B.A. (Eds.) Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Berlin: Springer, 2009;63:127-142. DOI 10.1007/978-3-540-68922-5_10.
- Chase S.S. Techniques for isolating haploid plants. *Am. J. Bot*. 1947; 34:579-609.
- 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. DOI 10.1093/genetics/34.3.328.
- Chase S.S. Monoploids in maize. In: Gowen J.W. (Ed.) Heterosis. Ames (USA): Iowa State College Press, 1952;389-399.
- Chase S.S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot. Rev.* 1969;35(2):117-168. DOI 10.1007/BF02858912.
- Chase S.S., Nanda D.K. Screening for monoploids of maize by use of a purple embryo marker. *Maize Genet. Coop. News Lett*. 1965;39: 59-60.
- Chen B., Liu L., Xu L., Meng Y., Gui G., Xu X., Jin W., Chen S. Observation on doubling effects of immature haploid embryo in maize. *J. China*. 2016;21(005):10-16.
- Chen S., Song T. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. *Acta Agron. Sinica*. 2003;4:587-590.
- Clausen R.E., Mann M.K. Inheritance in *Nicotiana tabacum*: V. Occurrence of haploid plants in interspecific descendants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1924;10(4):121-124. DOI 10.1073/pnas.10.4.121.
- Coe E.H. Anthocyanin genetics. In: Freeling M., Walbot V. (Eds.) The Maize Handbook. New York: Springer-Verlag, 1994;279-281. DOI 10.1007/978-1-4612-2694-9_34.
- Coe E.H., Jr. A line of maize with high haploid frequency. *Am. Nat*. 1959;93(873):381-382. DOI 10.1086/282098.
- Darevsky I.S., Kupriyanova L.A., Uzzell T. Parthenogenesis in reptiles. In: Gans C., Billet F. (Eds.) Biology of Reptiles. Vol. 15. New York: J. Wiley and Sons, 1985;411-526.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1989;17: 1-12. DOI 10.1007/BF00042276.
- Dziurka K., Dziurka M., Muszyńska E., Czyczyło-Mysza I., Warchoł M., Juzoń K., Laskoś K., Skrzypek E. Anatomical and hormonal factors determining the development of haploid and zygotic embryos of oat (*Avena sativa* L.). *Sci. Rep.* 2022;12(1):548. DOI 10.1038/s41598-021-04522-y.
- Eder J., Chalyk S. *In vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet*. 2002;104(4):703-708. DOI 10.1007/s00122-001-0773-4.
- Evans M.M.S. The *indeterminate gametophyte1* gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. *Plant Cell*. 2007;19(1):46-62. DOI 10.1105/tpc.106.047506.
- Fischer E. Molekulargenetische Untersuchungen zum Vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der *in-vivo*-Haploideninduktion bei Mais (*Zea mays* L.). Dissertation. Stuttgart: Univ. of Hohenheim, 2004.
- Ford R.H. Inheritance of kernel color in corn: explanations & investigations. *Am. Biol. Teach*. 2000;62(3):181-188. DOI 10.2307/4450870.
- Gains E.F., Aase H.C. A haploid wheat plant. *Am. J. Bot*. 1926;13(6): 373-385. DOI 10.2307/2435439.
- Geiger H.H., Gordillo G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 2009;54(4):485-489.
- Gernand D., Rutten T., Pickering R., Houben A. Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* crosses at mitosis and inrephase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet. Genome Res*. 2006;114(2):169-174. DOI 10.1159/000093334.
- Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.-B., Chaignon S., Chislaine G., Laplaige J., Berges H., Beydon G., Bayle V., Barret P., Comadran J., Martinant J.-P., Rogowsky P.M., Widiez T. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *EMBO J*. 2017;36:707-717. DOI 10.15252/embj.201796603.
- Greenblatt I.M., Bock M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 1967;58:9-13.
- Guha S., Maheshwari S.C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*. 1964;204:497.
- Han F.P., Gao Z., Birchler J.A. Reactivation of an inactive centromere reveals epigenetic and structural components for centromere specification in maize. *Plant Cell*. 2009;21:1929-1939.
- 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., Rotarencu 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.
- Kalinowska K., Chamas S., Unkel K., Demidov D., Lermontova I., Dresselhaus T., Kumlehn J., Dunemann F., Houben A. State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor. Appl. Genet*. 2019;132(3):593-605. DOI 10.1007/s00122-018-3261-9.
- Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970;225:874-876.
- Kebede A.Z., Dhillon B.S., Schipprack W., Aarus 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;180:219-226.
- Keller J.L. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*. 1990;47:241-247.

- Kelliher T., Starr D., Richbourg L., Chintamanani S., Delzer B., Nucio M.L., Green J., Chen Z., McCuiston J., Wang W., Liebler T., Bullock P., Martyin B. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*. 2017;542:105-109.
- Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Wittich P.E., Dong S., Green J., Burch E., McCuiston J., Gu W., Sun Y., Strebe T., Roberts J., Bate N.J., Que Q. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat. Biotech.* 2019;37:287-292.
- Kermicle J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*. 1969;166:1422-1424.
- Kermicle J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. *Am. J. Bot.* 1971;58:1-7.
- Kermicle J.L. Indeterminate Gametophyte (*ig*): Biology and Use. New York: Springer-Verlag, 1994.
- Kim H.J., Ok S.H., Bahn S.C., Jang J., Oh S.A., Park S.K., Twell D., Ryu S.B., Shin J.S., Notes A. Endoplasmic reticulum- and Golgi-localized phospholipase A₂ plays critical roles in *Arabidopsis* pollen development and germination. *Plant Cell*. 2011;23(1):94-110. DOI 10.1105/tpc.110.074799.
- Laurie D.A. Factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* cv. 'Highbury' × *Zea mays* cv. 'Seneca 60'. *Plant Breed.* 1989;103:133-140.
- Laurie D.A., Bennett M.D. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 1988;76:393-397.
- 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.
- Li X., Meng D., Chen S., Luo H., Zhang Q., Jin W., Yan J. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction. *Nat. Commun.* 2017; 8(1):991.
- Liu C., Li X., Meng D., Zhong Y., Chen C., Dong X., Xu X., Chen B., Li W., Li L., Tian X., Zhao H., Song W., Lio H., Zhanh Q., Lai J., Jin W., Yan J., Chen S. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. *Mol. Plant*. 2017;10:520-522. DOI 10.1016/j.molp.2017.01.011.
- Liu Z., Wang Y., Ren J., Mei M., Frei U.K., Trampe B., Lübberstedt T. Maize doubled haploids. *Plant Breed. Rev.* 2016;40:123-160.
- Michalik B., Adamus A., Nowak E. Gynogenesis in Polish onion cultivars. *J. Plant Physiol.* 2000;156:211-216.
- Nair S.K., Molenaar W., Melchinger A.E., Boddupalli P.M., Martinez L., Lopez L.A., Chaikam V. Dissection of a major QTL *qhir1* conferring maternal haploid induction ability in maize. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130:1113-1122.
- Nanda D.K., Chase S.S. An embryo marker for detecting monploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 1966;6:213-215.
- Prasanna B.M., Chaikam V., Mahuku G. Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. Mexico: CIMMYT, 2012.
- Prigge V., Melchinger A.E. Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods Mol. Biol.* 2012;877:161-172.
- Prigge V., Sánchez 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 Sci.* 2011;51:1498-1506.
- Qiu F., Liang Y., Li Y., Liu Y., Wang L., Zheng Y. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination in vivo upon haploid induction in maize. *Curr. Plant Biol.* 2014;1: 83-90.
- Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*. 2010;464:615-618.
- Ravi M., Shibata F., Ramahi J.S., Nagaki K., Chen C., Murata M. Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002121. DOI 10.1371/journal.pgen.1002121.
- Rimberia F.K., Adaniya S., Etoh T., Ishimine Y. Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants. *Euphytica*. 2006;149:53-59. DOI 10.1007/s10681-005-9051-x.
- 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;50:275-283.
- Rotarencu V.A., Kirtoca I.H., Jacota A.G. Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop.* 2007;81:11.
- Rotarencu V., State D., Fuia S. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop.* 2010;84:1-7.
- Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S., Houben A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:E498-E505.
- Sarkar K.R., Coe E.H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics*. 1966;54(2):453-64.
- Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders. Illinois, 2005;1-7.
- Sprague G. Hetero-fertilization in maize. *Science*. 1929;69(1794): 526-527.
- Sprague G. The nature and extent of hetero-fertilization in maize. *Genetics*. 1932;17(3):358-368.
- Tek A.L., Stupar R.M., Nagaki K. Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding. *Turk. J. Agric. For.* 2015;39(4):557-562. DOI 10.3906/tar-1405-137.
- Tian X., Qin Y., Chen B., Liu C., Wang L., Li X., Dong X., Liu L., Chen S. Hetero-fertilization together with failed egg-sperm cell fusion supports single fertilization involved in *in vivo* haploid induction in maize. *J. Exp. Bot.* 2018;69(20):4689-4701.
- Wang B., Zhu L., Zhao B., Zhao Y., Xie Y., Zheng Z., Li Y., Sun J., Wang H. Development of a Haploid-Inducer Mediated Genome Editing system for accelerating maize breeding. *Mol. Plant*. 2019; 12:597-602.
- Wedzony M., Röber F., Geiger H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: XVIIth Int. Congress on Sex Plant Reproduction. Maria Curie-Skłodowska Univ. Press, 2002;173.
- Xu X., Li L., Dong X., Jin W., Melchinger A.E., Chen S. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of a maternal haploid in maize. *J. Exp. Bot.* 2013;64(4): 1083-1096.
- Yan G., Liu H., Wang H. Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1786. DOI 10.3389/fpls.2017.01786.
- Zhao X., Xu X., Xie H., Chen S., Jin W. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiol.* 2013;163(2):721-731. DOI 10.1104/pp.113.223982.
- Zhong Y., Liu C., Qi X., Jiao Y., Wang D., Wang Y., Liu Z., Chen C., Chen B., Tian X., Li J., Chen M., Dong X., Xu X., Li L., Li W., Liu W., Jiu W., Lai J., Chen S. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. *Nat. Plants*. 2019;5:575-580.

ORCID ID

E.B. Khatefov orcid.org/0000-0001-5713-2328

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0481-2022-0001 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.05.2022. После доработки 09.09.2022. Принята к публикации 09.09.2022.