

Научная статья

УДК 575.224.46:633.15:575.22

DOI: 10.30901/2658-6266-2023-1-o2



Создание дигаплоидных линий кукурузы *Zea mays* L. методом ресинтеза из тетраплоидной популяции

А. В. Ульянов¹, Д. С. Куцев¹, В. В. Васипов¹, Х. Р. Мамадова², М. Ю. Хакулова¹, С. Ф. Исрафилова¹,
М. Р. Фирсова¹, А. В. Карлов¹, Э. Б. Хатефов¹

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

²Азербайджанский научно-исследовательский институт земледелия, Баку, Азербайджан

Автор, ответственный за переписку: Эдуард Балилович Хатефов, haed1967@rambler.ru

Поиск новых, эффективных методов расширения генетического полиморфизма исходного селекционного материала остается одной из важных проблем селекции гибридной кукурузы. Мировая селекция коммерческих сортов и гибридов *Zea mays* L. ведется на диплоидных генотипах, тогда как тетраплоидные источники исходного материала кукурузы и её дикие сородичи слабо вовлекаются в селекционный процесс. Прямые гетероплоидные скрещивания между диплоидными и тетраплоидными генотипами приводят к формированию слабо фертильных либо полностью стерильных триплоидных гибридов, которые цитологически нестабильны в последующих репродукциях. Тетраплоидная кукуруза ($2n=40$), как и ее некоторые дикие сородичи с тетраплоидным геномом *Zea perennis* Hitchk. ($2n=40$) и *Tripsacum dactiloides* (L.) L. ($2n=72$), привлекательны для селекционеров как источники для улучшения хозяйственно ценных признаков. Привлекательность ресинтезированных диплоидных линий объясняется тем, что у тетраплоидов в результате неравного кроссинговера между гомологичными хромосомами, образующими поливалентные ассоциации хромосом, накапливается больше хромосомных перестроек, чем у диплоидных генотипов, хромосомы у которых образуют биваленты. Тетраплоидные синтетические популяции кукурузы и её тетраплоидные дикие сородичи обладают большим потенциалом изменчивости для улучшения диплоидной кукурузы. Авторами предложен прямой метод ресинтеза дигаплоидных линий с помощью гаплоиндукции и косвенный метод получения диплоидных линий путём гетероплоидного скрещивания и последующего расщепления гибридного потомства триплоидного гибрида. Метод ресинтеза диплоидного генома кукурузы из тетраплоидного служит идеальной моделью для изучения процессов кроссинговера между гомологичными хромосомами при их мультивалентных ассоциациях в мейозе; он перспективен для получения диплоидных линий с повышенной частотой рекомбинации между гомологичными хромосомами разных геномов, объединенных в один общий, а также может служить источником получения серии анеуплоидов.

Ключевые слова: хромосома, квадριвалент, бивалент, гаплоид, дигаплоид, редиплоид, полиплоид

Благодарности: Работа проводилась в рамках тематического плана ВИР по проекту № FGEM-2022-0009 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Для цитирования: Ульянов А.В., Куцев Д.С., Васипов В.В., Мамадова Х.Р., Хакулова М.Ю., Исрафилова С.Ф., Фирсова М.Р., Карлов А.В., Хатефов Э.Б. Создание дигаплоидных линий кукурузы *Zea mays* L. методом ресинтеза из тетраплоидной популяции. *Биотехнология и селекция растений*. 2023;6(1):19-31. DOI: 10.30901/2658-6266-2023-1-o2

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Ульянов А.В., Куцев Д.С., Васипов В.В., Мамадова Х.Р., Хакулова М.Ю., Исрафилова С.Ф., Фирсова М.Р., Карлов А.В., Хатефов Э.Б., 2023

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2023-1-o2

Creation of doubled haploid lines of maize *Zea mays* L. by resynthesis from a tetraploid population

Alexey V. Ulyanov¹, Denis S. Kutsev¹, Vladimir V. Vasipov¹, Khalima R. Mamadova², Milana Yu. Khakulova¹, Selminaz F. Israfilova¹, Milana R. Firsova¹, Andrey V. Karlov¹, Eduard B. Khatefov¹

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Russia

²Azerbaijan Sciences Research Institute of Agriculture, Baku, Azerbaijan

Corresponding author: Eduard B. Khatefov, haed1967@rambler.ru

The search for new, effective methods for broadening the genetic polymorphism of the original breeding material remains one of the important problems of hybrid maize breeding. Globally, breeding of commercial maize varieties and hybrids is carried out using diploid genotypes, whereas tetraploid sources of initial material and wild relatives of maize are poorly involved in the breeding process. The direct heteroploid crosses between diploid and tetraploid genotypes lead to the formation of weakly fertile or completely sterile triploid hybrids, which are cytologically unstable in subsequent generations. Tetraploid maize ($2n=40$), as well as some wild relatives with tetraploid genome, such as *Zea perennis* Hitchk. ($2n=40$) and *Tripsacum dactiloides* (L.) L. ($2n=72$), are attractive to breeders as sources for improving economically valuable traits. The attractiveness of rediploid lines is due to the fact that they originate from tetraploids, which accumulate more chromosome rearrangements as a result of unequal crossingover between homologous chromosomes forming polyvalent chromosomal associations, rather than diploid lines in which chromosomes form only bivalents. Synthetic tetraploid populations of maize and its tetraploid wild relatives have great potential of variability for improving diploid maize. The authors proposed a direct method for the resynthesis of doubled haploid lines using haploid induction and an indirect method for obtaining diploid lines by heteroploid crossing and subsequent segregation of a triploid hybrid in the progeny. The method of resynthesizing the tetraploid maize genome to diploid serves as an ideal model for studying the processes of crossing over in meiosis between multivalent associations of homologous chromosomes; it is promising for obtaining diploid lines with an increased frequency of recombination between the homologous chromosomes of different genomes, combined into a common one, and can serve as a source for obtaining aneuploid series.

Keywords: chromosome, quadrivalent, bivalent, haploid, doubled haploid, rediploid, polyploid

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the VIR thematic plan under project No. FGEM-2022-0009 “Structuring and unlocking the potential of hereditary variability of the global collection of cereal and grain crops of VIR for the development of an optimized gene bank and rational use in breeding and crop production”.

For citation: Ulyanov A.V., Kutsev D.S., Vasipov V.V., Mamadova Kh.R., Khakulova M.Yu., Israfilova S.F., Firsova M.R., Karlov A.V., Khatefov E.B. Creation of doubled haploid lines of maize *Zea mays* L. by resynthesis from a tetraploid population. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2023;6(1):19-31. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2023-1-o2

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Ulyanov A.V., Kutsev D.S., Vasipov V.V., Mamadova Kh.R., Khakulova M.Yu., Israfilova S.F., Firsova M.R., Karlov A.V., Khatefov E.B., 2023

Словарь использованных терминов

Редиплоид – диплоидная линия, полученная путем ресинтеза из полиплоидной формы

Дигаплоид – линия, полученная методом удвоения генома гаплоидного растения

Редигаплоид – линия, полученная путем ресинтеза гаплоидной формы из полиплоидной с последующим удвоением гаплоидного генома до диплоидного

Введение

Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из важнейших зерновых культур в мире. Доля кукурузы в мировом зерновом балансе составляет более 30%. В 2017 году мировой рынок кукурузы составил 1112 млн тонн зерна, при этом средний доход производителей этой культуры вырос на 3,4% за последние десять лет (Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 2020). На протяжении последних трёх лет в России наблюдается рост объемов производства кукурузы на зерно.

Установлено, что разнообразие растений коррелирует с высокой степенью изменчивости общего размера генома, уровня плоидности и числа хромосом (Bennett, Leitch, 2003; Kellogg, Bennetzen, 2004). Размер генома *Z. mays* составляет 2,3 миллиарда пар оснований (Schnable et al., 2009). При этом не менее 85% всего генома приходится на долю различных мобильных элементов. В настоящее время генетическое разнообразие возделываемой кукурузы, представленной в производстве в основном инбредными линиями и их гибридами различной степени сложности, значительно меньше, чем было во времена широкого внедрения гибридов в производство. Снижение генетического разнообразия кукурузы как культуры неизбежно влечет за собой возрастание генетической уязвимости вида.

Исторически сложилось так, что подавляющее большинство линий первого цикла гибридной селекции было заложено на сортах ‘Lancaster’, ‘Iowa Dent’ и синтетической популяции Iowa Stiff Stock Synthetic (SSS), которые были широко распространены в начале прошлого века в «кукурузном поясе» США. Синтетическая популяция Iowa Stiff Stock Synthetic, ставшая основой для гетерозисной группы SSS, создана Джорджем Спрэггом в Университете штата Айова в 1930-х годах и состоит из 16 инбредных линий, выделенных из сорта ‘Reid’s Yellow Dent’ с последующими несколькими циклами возвратной селекции (Troyer, 1999). В процессе селекции линий второго и особенно третьего поколений были использованы лучшие гибриды от скрещиваний этих источников, что значительно сузило генетическое разнообразие получаемых популяций. Этот процесс усугублялся жёстким инбридингом, отбором по хозяйственно ценным признакам и подбором родительских линий с повышенной комбинационной способностью, что привело к резкому сужению генетического полиморфизма у коммерческих сортов

и гибридов кукурузы (Shcherbak, 1984).

Поиск эффективных методов, способствующих расширению генетического полиморфизма исходного селекционного материала, был, есть и остается актуальным для продолжения увеличения урожайности гибридной кукурузы в производственных посевах. В задачи селекционеров входит улучшение исходного селекционного материала по генам хозяйственно ценных признаков, накопленных в геноме исходного материала в результате предшествующей селекции, и сохранение комбинационной способности в отношении аллелей этих генов. Игнорирование этих генетических основ селекции может привести к снижению уровня гетерозиса гибридной кукурузы, что приведет к снижению темпов роста валовых сборов урожая.

Существует множество способов увеличения полиморфизма исходного селекционного материала, включая индуцированный мутагенез, отдалённую и близкородственную гибридизацию, автополиплоидию и аллополиплоидию, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки (te Beest et al., 2012). Метод создания полиплоидных рядов не нашёл широкого применения в случае кукурузы по причине снижения зерновой продуктивности полиплоидных аналогов вследствие нарушения процессов мейоза, вызывающих стерильность части пыльцевых зёрен и яйцеклеток (Shcherbak, Khatefov, 2000; Khatefov, 2012). Представители полиплоидных рядов *Z. mays*, как и её тетраплоидные дикие сородичи (*Zea perennis* Hitchk.), могут оказаться ценным исходным материалом для создания улучшенных диплоидных линий с целью вовлечения их в гибридную селекцию на уровне диплоидных генотипов. Не менее перспективны для редиплоидизации и аллополиплоиды, полученные с участием диких сородичей кукурузы.

Ресинтез диплоидных линий из тетраплоидного селекционного материала можно охарактеризовать как переход организма из полиплоидного состояния обратно в диплоидное после одного или нескольких циклов репродукции. Процесс редиплоидизации может происходить в природе спонтанно, либо быть индуцирован в результате селекционной проработки исходного материала. В зависимости от способа индуцирования редиплоидные линии могут иметь либо генотип, гомологичный исходному родительскому генотипу, либо гибридный. Редиплоидные линии с генотипом, идентичным родительскому, характеризуются сохранением исходного родительского генома. В таких линиях, изменения и перестройки происходят между гомологичными хромосомами с набором генов одного родителя. У редиплоидных линий гибридного происхождения обмена осуществляются между гомологичными хромосомами с различным набором аллелей одних и тех же генов, пришедших от обеих родительских форм.

Практическое получение диплоидных линий путем разложения тетраплоидных популяций было осуществлено Э.Б. Хатефовым в 2010 году (Khatefov, 2017). Метод ресинтеза диплоидной кукурузы из тетрапло-

идной популяции с использованием гаплоиндукторов, а именно получение дигаплоидов, впервые был предложен Э.Б. Хатефовым и О.А. Шацкой (Khatefov, Shatskaya, 2008), а первые коммерческие дигаплоидные линии, использованные в гибридной селекции, получены и испытаны Э.Б. Хатефовым с соавторами (Khatefov et al., 2019).

Традиционно, мировая селекция кукурузы ведется на диплоидном уровне, и генетический потенциал её тетраплоидных культурных и диких сородичей не может быть вовлечён в селекционные программы из-за барьера нескрещиваемости, либо полной или частичной стерильности триплоидного потомства. В этой связи основной задачей расширения генетического полиморфизма кукурузы является поиск возможных путей вовлечения всего генофонда тетраплоидной кукурузы и её диких сородичей в гибридную селекцию во избежание рисков генетической эрозии.

Цель исследований – поиск новых методов расширения генетического полиморфизма кукурузы путём вовлечения генетического потенциала тетраплоидных популяций и тетраплоидных диких сородичей в гибридную селекцию на диплоидном уровне.

Материал и методы

Исследования проведены в период 2008-2015 гг. в Институте сельского хозяйства Кабардино-Балкарского центра РАН (ИСХ КБНЦ РАН). Материалом для исследований служили тетраплоидная популяция МРПП22 (к-23427) и диплоидная инбредная линия кукурузы (к-23425), а также тетраплоидный и диплоидный гаплоиндукторы кукурузы ЗМК1 селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко. Оба индуктора представляют собой линии, поддерживаемые сестринскими скрещиваниями (сибсы). Для определения плоидности растений использовали диплоидный тестер (к-23425) и тетраплоидный тестер (к-23427). Посев, гибридизацию, размножение гибридного потомства осуществляли на селекционном участке Научно-производственного объединения НАРТАН, (НПО НАРТАН) расположенном в предгорной зоне Кабардино-Балкарской Республики. Гибридизацию и размножение разных генотипов кукурузы осуществляли в полевых условиях, с использованием пергаментных изоляторов; ранжирование гаплоидных и редиплоидных зерновок из гибридных зерен, завязавшихся на початке, проводили в лабораторных условиях. Перед цветением триплоидных растений кукурузы, метёлки и початки (мужские и женские соцветия) изолировали пергаментными изоляторами. Во время цветения, в утренние часы, с триплоидной метёлки собирали пыльцу и проводили опыление предварительно изолированного початка на том же триплоидном растении (самоопыление, инцухт); опылённый початок снова закрывали изолятором и снабжали этикеткой с указанием типа опыления и даты совершения процедуры. Для удвоения числа

хромосом у гаплоидных растений использовали раствор колхицина согласно методу получения дигаплоидных линий кукурузы (Deimling et al., 1997; Khatefov, Asadova, 2019). Для определения плоидности растений и достоверного выявления дигаплоидов в расщепляющемся потомстве триплоидов использовали тесткроссы с диплоидным (2n, к-23425) и тетраплоидным (4n, к-23427) тестерами. Для этого разделяли пыльцу анализируемых растений на три равные части. Первую часть пыльцы использовали для инцухта, а вторую и третью части в тесткроссах с 2n- и 4n- тестерами кукурузы. Для цитологического анализа использовали меристематические клетки кончиков корешков. Хромосомы окрашивали по Фельгену (Pausheva, 1988) реактивом Шиффа при холодном гидролизе. Мацерацию тканей осуществляли пектиназой от *Aspergillus niger* van Tieghem 1867. Хромосомные числа образцов определяли с помощью световой микроскопии в проходящем свете. Для каждого образца кукурузы подсчитывали число хромосом на 15 метафазных пластинках под микроскопом Olympus CX43 (Olympus Optical Co., Ltd, Япония) в проходящем свете при 1600-кратном увеличении с масляной иммерсией. Фотографии метафазных пластинок получали с помощью фотокамеры Oplenic PSC-600-15C (B51) (Oplenic Corp., Hang Zhou, China) соединённой к микроскопу.

Результаты

Процесс получения дигаплоидных линий кукурузы из тетраплоидных популяций возможен прямым и косвенным методами (таблица).

Суть прямого метода заключается в получении дигаплоидных линий из тетраплоидных генотипов с участием диплоидных и тетраплоидных гаплоиндукторов. В результате применения этого метода селекционер создает ресинтезированные из тетраплоидного генома диплоидные (дигаплоидные) линии, генотип которых идентичен исходному источнику. Косвенный метод заключается в скрещивании тетраплоидного растения с любой диплоидной линией и формировании триплоидного потомства. Расщепляющееся по плоидности потомство самоопылённого триплоида используют далее для получения дигаплоидных линий, в кариотипах которых будут присутствовать хромосомы обеих родительских форм в различных комбинациях. Рассмотрим каждый метод по отдельности.

Прямой метод. При использовании прямого метода мы получали дигаплоидные линии с помощью диплоидного и тетраплоидного гаплоиндукторов кукурузы. Для этого на первом этапе скрестили тетраплоидное материнское растение с тетраплоидным гаплоиндуктором и получили на початке диплоидные зерновки. На втором этапе растения, выращенные из этих диплоидных зерновок, скрестили с диплоидным гаплоиндуктором и получили на початках гаплоидные зерновки. На третьем этапе все гаплоидные проростки, полученные из гаплоидных зер-

новок, обработали колхицином в соответствии с методикой получения дигаплоидных линий кукурузы (рис. 1), и в результате были получены первые такие линии мето-

дом ресинтеза из тетраплоидной популяции.

Таблица. Схема получения дигаплоидных линий кукурузы прямым и косвенным методами ресинтеза из тетраплоидных популяций по годам

Table. Flow chart of obtaining doubled haploid maize lines by direct and indirect methods of resynthesis from tetraploid populations, year-wise

Годы/ years	Метод/ Method	
	Прямой/ Direct	Косвенный/ Indirect
1	♀Тетраплоид (4n) × ♂Гаплоиндуктор (4n) ↓ Диплоид (2n)	♀Диплоид (2n) × ♂Тетраплоид (4n) ↓ Гибрид (3n)
2	Диплоид (2n) × ♂Гаплоиндуктор (2n) ↓ Гаплоид (1n)	Гибрид (3n) + инкухт ↓ Расщепление (4n + 3n + 2n + Xn)
3	Гаплоид (1n) + колхицинирование ↓ Дигаплоидная линия (2n)	Диплоид (2n) × ♂Гаплоиндуктор (2n) ↓ Гаплоид (1n)
4		Гаплоид (1n) + колхицинирование ↓ Дигаплоидная линия (2n)

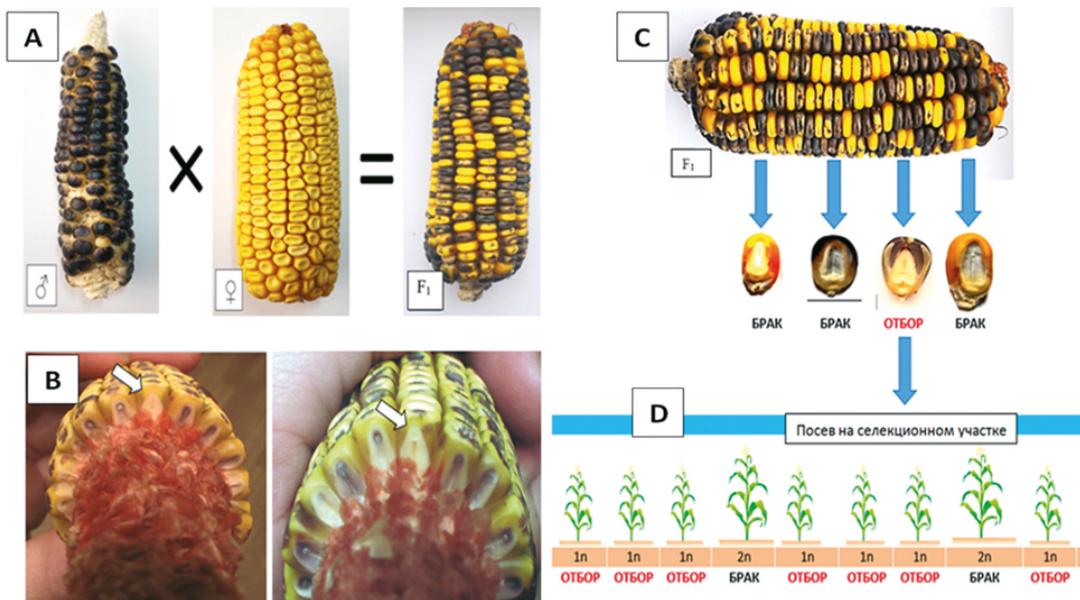


Рис. 1. Схема получения гаплоидных зерновок кукурузы с использованием гаплоиндукторов

Отбор гаплоидов ведется по наличию маркера антоциановой окраски на гибридных зерновках, полученных от скрещивания донора с гаплоиндуктором и его отсутствию на зародышах. А – схема гибридизации донора и гаплоиндуктора; В – гаплоидные зерновки с немаркированным зародышем на фоне гибридных диплоидных зерновок; С – разные типы маркерной окраски выбракованных гибридных диплоидных зерновок в сравнении с окраской отобранных гаплоидных зерновок; D – фенотипическая характеристика гаплоидных и диплоидных растений по габитусу и выбраковка высокорослых диплоидных растений

Fig. 1. Scheme of producing haploid maize kernels using haploid inducers

The selection of haploid kernels is based on the presence of anthocyanin pigmentation in hybrid kernels from a cross of a donor with a haploid inducer, and its absence in embryos. A – scheme of hybridization between a donor and a haploid inducer; B – haploid kernels with unmarked embryo against the background of hybrid diploid kernels; C – different marker pigmentation of culled hybrid diploid kernels compared to that of selected haploid ones; D – phenotypic characterization of haploid and diploid plants according to their habitus and culling of tall diploid plants

Для облегчения ранжирования гаплоидных и гибридных диплоидных зерновок использовали гаплоиндукторы с маркерным доминантным геном антоциановой окраски зерновки и зародыша *RI-nj* (Khadzhinov, Chumak, 1978).

При отсутствии у селекционера тетраплоидного гаплоиндуктора можно использовать гетероплоидное

скрещивание, заменив тетраплоидный гаплоиндуктор на диплоидный, однако выделить гаплоидные зерновки среди гибридных триплоидных шуплых зерновок без эндосперма затруднительно (рис. 2), в отличие от диплоидных и тетраплоидных, которые хорошо идентифицируются по верхней части перикарпа зерновки.

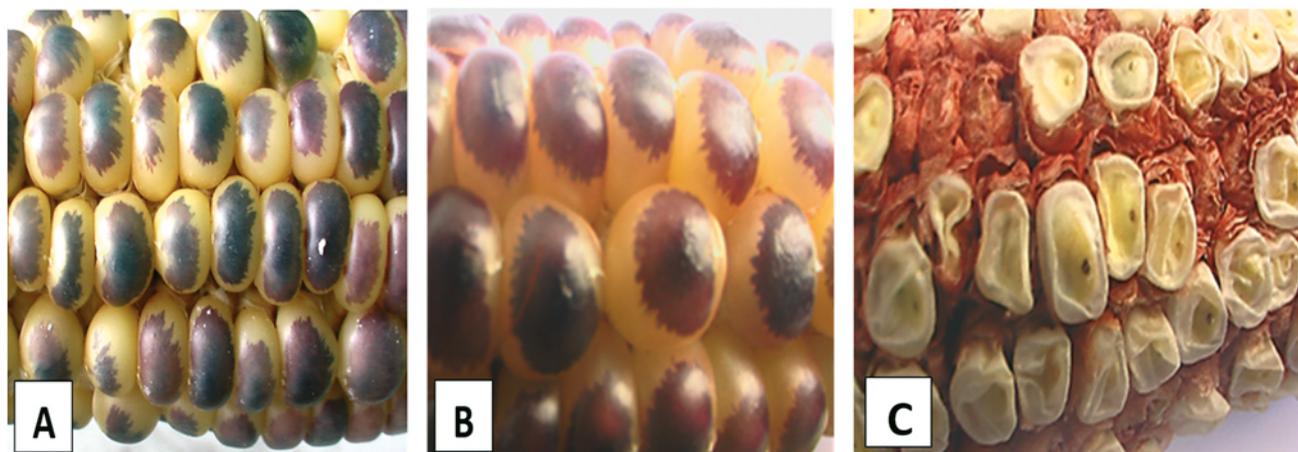


Рис. 2. Фенотипическое проявление маркерного гена *RI-nj* на верхней части перикарпа зерновки у диплоидного (А), тетраплоидного (В) и триплоидного (С) доноров

Fig. 2. Phenotypic manifestation of the *RI-nj* dominant marker gene on the upper pericarp of a kernel in a diploid (A), tetraploid (B), and triploid (C) donor

Для успешного проведения скрещиваний кукурузы были подобраны гаплоиндукторы одной группы спелости с материнской формой. При этом тетраплоидный гаплоиндуктор использовали только в качестве отцовской формы, а диплоидный донор в качестве материнской. В первый год делянки с отцовскими и материнскими формами были высеяны рядом друг с другом и между ними были проведены скрещивания в период массового цветения растений. После опыления материнского растения пыльцой гаплоиндуктора, початки изолировали и оставили до созревания. После созревания все гибридные початки были убраны с поля и просушены до 14% влажности зерна. Затем все гибридные завязавшиеся зерновки были просмотрены с торца початка с отбором предполагаемых диплоидов. Отбирали диплоидные зерновки с гетерозиготным генотипом, которые идентифицировали по наличию окрашенного перикарпа на верхушке («шапочка») и отсутствию антоциановой окраски на щитке (отсутствию окраски у зародыша) (см. рис. 1). На следующий год был проведен посев в поле всех отобранных с гибридных початков диплоидных (редидиплоидных) зёрен. Рядом были расположены делянки с диплоидным гаплоиндуктором для второго этапа гибридизации, а также диплоидный и тетраплоидный тестеры. При достижении у редидиплоидных растений кукурузы фазы цветения, они были предварительно изолированы пергаментными изоляторами до выхода рылец. После наступления фазы цветения

мужских и женских соцветий, с утра собирали в пергаментный изолятор пыльцу с гаплоиндуктора и проводили опыление рылец на початке редидиплоидного растения. Сразу после опыления початка изолятор снабжали этикеткой, указывая дату опыления и формулу гибрида. После созревания зерновок и уборки урожая, все гибридные початки просматривали и отбирали зерновки с наличием маркерного признака на верхней части перикарпа и с неокрашенным зародышем (см. рис. 1). Отобранные зерновки были отнесены к предполагаемым гаплоидным зерновкам для последующего проращивания и обработки колхицином. Гаплоидные растения характеризуются карликовым ростом, узкими листьями, маленьким размером метелки и початка, полной или частичной стерильностью мужских соцветий. Рыльца гаплоидных растений кукурузы способны принимать пыльцу любой ploидности и завязывать полноценные зерновки разной ploидности на гаплоидном початке. Для перевода гаплоидов в диплоидное состояние, то есть для увеличения числа хромосом вдвое, проводят процедуру колхицинирования, в результате которой образуются фертильные растения нормального размера.

Для удвоения числа хромосом колхицином у гаплоидов нами был использован метод Даймлинга (Deimling et al., 1997). У проростков длиной 3–4 см были удалены кончики шилец (гипокотиль) и первичного корешка (рис. 3). Укороченные проростки погружали на 12 часов

в 0,06% раствор колхицина с добавлением 0,5% раствора диметилсульфоксида (DMSO). После этого проростки промывали холодной проточной водой в течение двух часов и высаживали в поле. Для удобства обычно применяют другой метод обработки проростков: прямо в поле

раствор колхицина в концентрации 0,03–0,012% вводят инсулиновым шприцем в точку роста (зону апекса) растения, находящегося в фазе 3–4 листьев, дважды в сутки в утреннее и вечернее время.

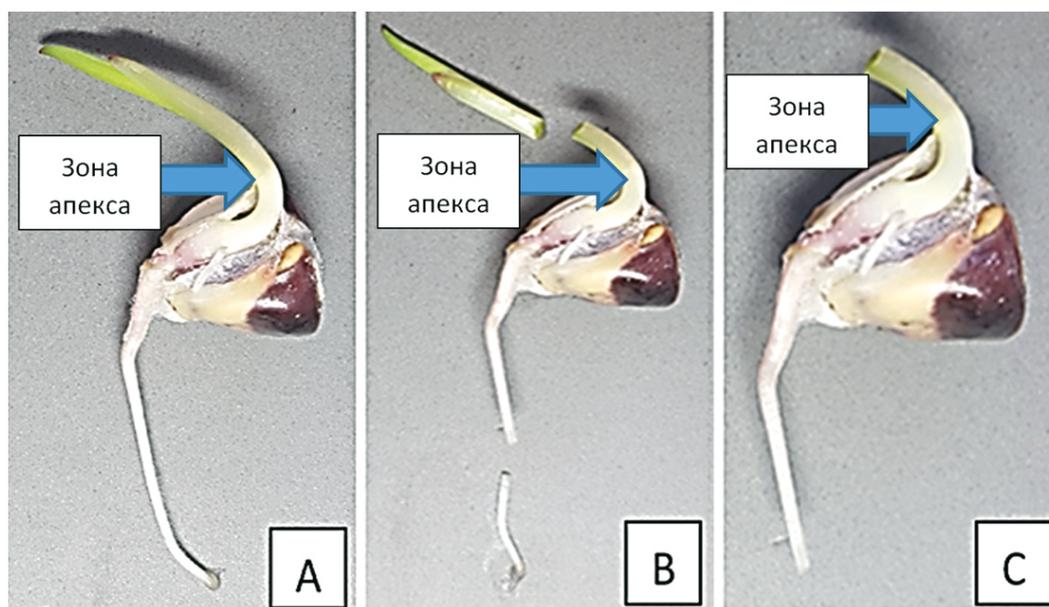


Рис. 3. Подготовка гаплоидных проростков кукурузы к колхицинированию по методу Даймлинга и соавторов (Deimling et al., 1997)

Fig. 3. Preparation of haploid maize seedlings for colchicine treatment according to the method of Deimling et al. (1997)

Рядом с делянками колхицинированных гаплоидных растений высевали тетраплоидный и диплоидный тестеры. Линии кукурузы, полученные в результате обработки гаплоидных проростков колхицином, были фертильными и во время цветения хорошо пылили. Все початки фертильных растений были самоопылены, а часть пыльцы была перенесена на рыльца початков диплоидного и тетраплоидного тестеров, высаженных по соседству. Пloidность полученных растений определяли цитологически, путем подсчета числа хромосом на метафазных пластинках в делящихся клетках корешков проростков кукурузы (рис. 9), либо методом тесткроссов в гетероплоидных скрещиваниях (рис. 6).

Анализ ploидности тестируемых линий проводили после созревания и сушки початков от тесткроссов. Для этого все початки располагали по группам в соответствии со схемой проведенных скрещиваний и просматривали выполненность зерновок на початках. Критерии оценки ploидности были следующими: если на диплоидном тестерном початке завязались полноценные зерновки, а на тетраплоидном плохо выполненные, то пыльцевой

донор относили к дигаплоидной линии (редигаплоид). Если на диплоидном тестерном початке формировались плохо выполненные зерновки, а на тетраплоидном нормальные, то в этом случае источник пыльцы, колхицинированное гаплоидное растение, имело тетраплоидный геном и его относили к автотетраплоидной линии. В том случае, если на початках обоих тестеров завязывались разнокачественные по выполненности зерновки, то пыльцевой донор относили к триплоидным или анеуплоидным растениям и выбраковывали (рис. 4).

Результаты проведенных тест-скрещиваний показали, что дигаплоидные линии, выделенные прямым методом из тетраплоидных популяций, свободно скрещиваются с диплоидными тестерами с образованием гибридных зерновок и с тетраплоидными с образованием триплоидных зерновок, что является характерной особенностью второго скрещивания. Этот метод может быть использован для предварительного анализа большого числа растений в поле с последующим подтверждением результата определения ploидности тестируемых линий путем прямого подсчета числа их хромосом.

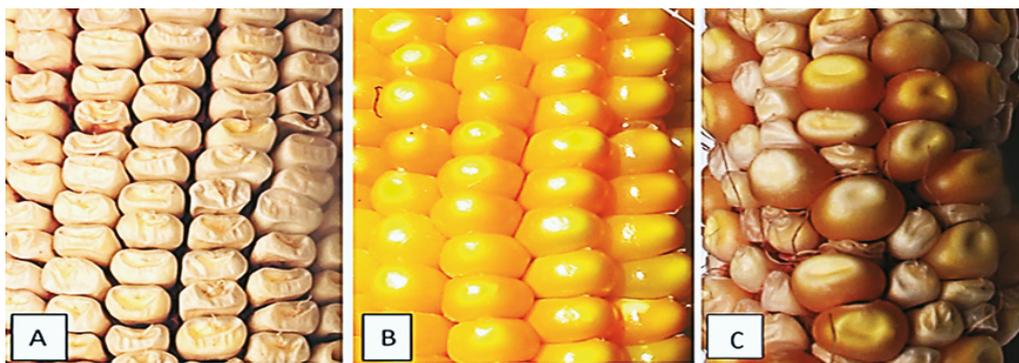


Рис. 4. Зерновки триплоидной (А), диплоидной (В) и гетероплоидной (С) кукурузы сформировавшиеся на початках тестеров

Fig. 4. Triploid (A), diploid (B), and heteroploid (C) maize kernels formed on the cobs of testers

Косвенный метод получения редиплоидных линий заключается в скрещивании донора с тетраплоидным гаплоиндуктором в качестве второго родителя в гибридной комбинации, при этом в качестве донора используют любой диплоидный образец, не являющийся гаплоиндуктором. В результате такого скрещивания на початке формируются гибридные зерновки с триплоидным зародышем, независимо от того, выступает ли диплоидная линия в качестве материнского или отцовского родителя (рис. 5). В данном исследовании в качестве материнской формы был использован диплоидный сорт кукурузы, а в качестве отцовской – тетраплоидный (см. рис. 6). Все сформированные на початке гибридные зерновки имели триплоидный зародыш и редуцированный эндосперм, что характерно для такого скрещивания, поскольку эндосперм

в таком случае будет иметь два набора хромосом отцовского родителя вместо одного, что обусловлено механизмом двойного оплодотворения у растений. В ранних работах по исследованию развития эндосперма у кукурузы в гетероплоидных скрещиваниях было показано, что эндосперм, в котором нарушено соотношение численности родительских хромосом – 2 (материнские):1 (отцовские), претерпевает аномальное развитие, либо он абортивен (Lin, 1984).

Выраженность редукции эндосперма, помимо соотношения численности родительских хромосом, зависит от генотипа обоих родителей, и в гетероплоидных скрещиваниях бывают редкие случаи почти полной выполненности триплоидных зерновок.



Рис. 5. Зерновки с триплоидным (3n) зародышем, сформировавшиеся в результате гетероплоидного скрещивания 2n×4n кукурузы

Fig. 5. Kernels with a triploid (3n) embryo resulting from crosses between diploid (2n) and tetraploid (4n) maize

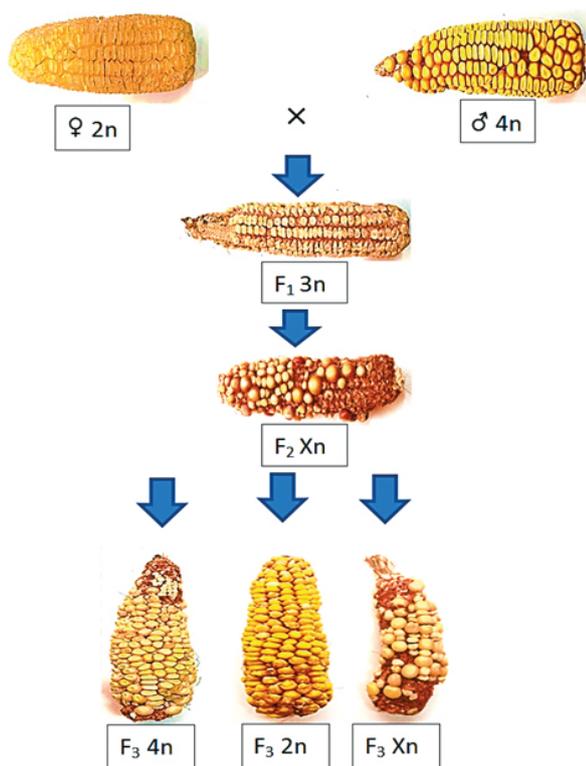


Рис. 6. Схема гетероплоидных скрещиваний для получения гаплоидных зерновок кукурузы косвенным методом

Fig. 6. Scheme of heteroploid crossings for producing haploid maize kernels by means of indirect method

Триплоидные гибридные зерновки высеяли в поле, где они успешно проросли несмотря на недоразвитие эндосперма, и в период цветения дали мощные триплоидные растения. Пыльца триплоидного растения кукурузы слабо фертильна и на самоопыленном початке завязывает зерновки различной плоидности, различающиеся по выполненности и размеру (рис. 7).

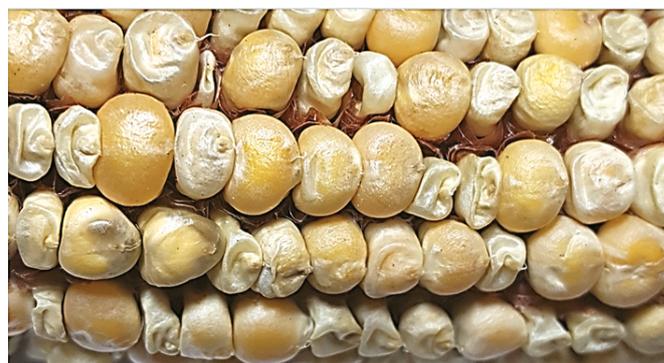


Рис. 7. Самоопыленный початок триплоидного растения кукурузы с зерновками различной плоидности

Fig. 7. A cob from self-pollination of a triploid maize plant with kernels of different ploidy

После созревания початки были убраны и высушены, после чего была осуществлена разборка и сортировка завязавшихся зерновок, которые были рассортированы по размеру на предполагаемые тетраплоидные, триплоидные, диплоидные и анеуплоидные (рис. 8).



Рис. 8. Распределение сформировавшихся на самоопылённом триплоидном початке зерновок по размеру на предполагаемые тетраплоидные (4n), диплоидные (2n), триплоидные (3n) и анеуплоидные (Xn±1) зерновки

Fig. 8. Size distribution of kernels in a self-pollinated triploid cob into putative tetraploid (4n), diploid (2n), triploid (3n) and aneuploid (Xn±1) kernels

Подсчет числа хромосом в кончиках корешков проростков позволил точно установить плоидность полученных растений (см. рис. 9). Такой способ установления хромосомных чисел растений кукурузы высокоэффективен,

но при работе с большой выборкой этот метод становится довольно трудоёмким, поскольку сопряжён с проблемой последующего сохранения проростка, его укоренения и получения потомства.

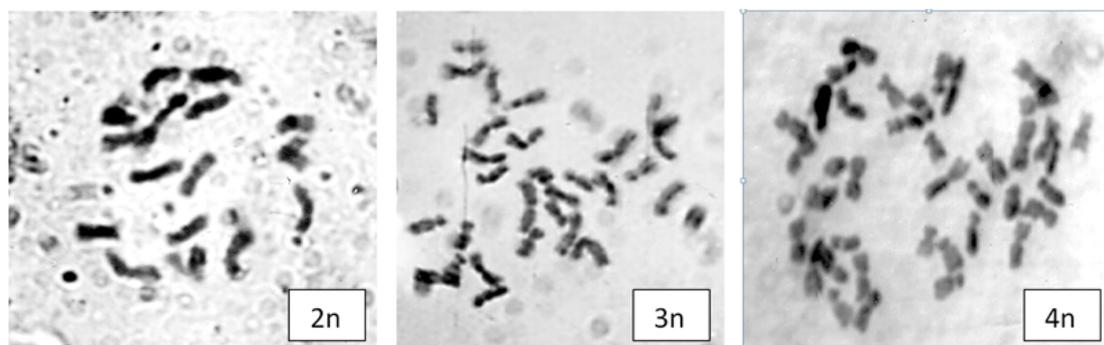


Рис. 9. Метафазные пластинки диплоидной (2n), триплоидной (3n) и тетраплоидной (4n) кукурузы, окрашенные реактивом Шиффа по Фёльгену

Fig. 9. Metaphase plates of diploid (2n), triploid (3n), and tetraploid (4n) maize stained with Schiff's reagent according to Feulgen method

Альтернативным способом первичного определения плоидности отобранных зерновок является метод тесткроссов. В посеве были использованы только предполагаемые редиплоидные зерновки, рядом с которыми высевали диплоидный и тетраплоидный тестеры одной группы спелости. Перед цветением материнских форм их початки изолировали пергаментными изоляторами. Перед цветением отцовских растений – предполагаемых редиплоидов – с раннего утра мужские соцветия были изолированы пергаментными изоляторами для сбора пыльцы. Собранную пыльцу распределяли между собственным початком (инцухт) и початками диплоидного и тетраплоидного тестеров (тесткросс). Все самоопылённые и гибридные (от тесткроссов) початки изолировали пергаментными изоляторами. После созревания початков они были собраны и просушены до 14% влажности зерна, после чего каждый початок был проверен на качество завязавшихся зерновок. В первую очередь зерновки проверяли на однородность по форме и размеру и, если зерновки на початке не были однородными, то самоопылённое растение относили к триплоидным и выбраковывали. Если на самоопылённом початке зерновки были типичными по форме и размеру, то растение и початок считали диплоидным или тетраплоидным. Для точного определения, является ли растение диплоидным или тетраплоидным, переходили к анализу початков, полученных с его участием в тесткроссах. Все гибридные комбинации с диплоидными и тетраплоидными тестерами располагали параллельно на столе и просматривали парами. Если на початках диплоидного тестера обнаруживали триплоидные щуплые зерновки, а на тетраплоидном

полноценные нормальные, то отцовское растение считали тетраплоидным. В случае, если на диплоидном початке завязались ровные нормальные зерновки, а на тетраплоидном триплоидные, то отцовское растение считали диплоидным (редиплоидным) (см. рис. 4). Полученные косвенным методом редиплоидные линии являются гетерозиготными носителями аллелей генов от обоих родителей и фенотипически значительно различаются между собой.

После установления истинности диплоидного генотипа у редиплоидных линий кукурузы методом тесткроссов вся дальнейшая работа селекционера сводится к накоплению в редиплоидной линии гомозиготных аллелей методом инцухта. Для сокращения времени полевой работы, направленной на выравнивание линии, мы рекомендуем использовать на этом этапе метод гаплоиндукции с применением диплоидного гаплоиндуктора и стандартной методики дигаплоидизации выделенных гаплоидных зерновок. Это позволит сократить время на получение 100% гомозиготных редиплоидных линий до 1-2-х лет.

Обсуждение

Использование механизма расширения генетического полиморфизма посредством редиплоидизации тетраплоидных генотипов перспективно для гибридной селекции кукурузы в качестве способа создания ценного исходного материала. Он также может быть использован при изучении межхромосомных перестроек в полиплоидном геноме, а также как один из способов получения анеуплоидов. Возникновение полиплоидов в процессе эволюции сопря-

жено с быстрой и значительной перестройкой генома, которая включает существенные изменения числа хромосом и их структуры, например вследствие транслокаций и делеций. Полиплоидия приводит к активации и перемещению транспозонов, а также связана с эпигенетическими эффектами, такими как модификация структуры хроматина вследствие изменения характера его метилирования. Эффекты перестройки хромосом, происходящие в результате «геномного шока» (De Storme, Mason, 2014) у вновь образовавшихся полиплоидных растений, часто приводят к выраженным изменениям экспрессии генов, что проявляется на уровне фенотипа, а также к летальности и стерильности. Процесс диплоидизации с одной стороны приводит к восстановлению фертильности, с другой – позволяет сохранить в геноме дубликации генов (Panchy et al., 2016), которые на начальном этапе не оказывают прямого влияния на продуктивность, что создаёт условия для сохранения вновь возникающих мутаций и для увеличения числа комбинаций аллелей. Такой прогресс изменчивости генома растений способствует увеличению гетерозиготности и сопровождается частичным гетерозисным эффектом с последующим повышением фертильности. Редиплоидизация тетраплоидов также приводит к появлению более продуктивных диплоидных потомков. Кроме того, у тетраплоидных гибридов, полученных от скрещивания контрастных по аллелям генов и по проявлению признаков тетраплоидных родительских форм, частота обменов гомологичными участками хромосом гораздо выше, чем при скрещивании диплоидных линий (Yao et al., 2020). Поэтому вероятность получения кроссоверных хромосом с разнообразными сочетаниями аллелей селекционно-важных генов у тетраплоидных гибридов выше, чем у диплоидных аналогов.

Результаты изучения полученных редиплоидных линий кукурузы подтвердили их хозяйственную ценность и полезность для гибридной селекции (Khatеfov et al., 2019). В дальнейшем при изучении селекционной ценности 26 редиплоидных линий, выделенных из тетраплоидной популяции и скрещенных с 17 стерильными тестерами С- и М- типов ЦМС, были выявлены 34 гибридные комбинации с урожайностью на уровне или выше стандартных гибридов. Из них 24 гибрида были отнесены к раннеспелой, шесть гибридов к среднеспелой и четыре к позднеспелой группе спелости по FAO (URL: <https://www.fao.org>). Из 26 редиплоидных линий удалось выделить гибридную комбинацию (Rf 7с × КБ 595-10-5) × 6199-2, показавшую урожайность зерна 13,58 т/га, что выше стандарта на три значения $НСР_{05} = 0,52$ т/га (Khatеfov et al., 2019).

Выводы

Использование метода редиплоидизации тетраплоидных популяций кукурузы прямым и косвенным методами способствует получению дигаплоидных (редиплоидных) линий кукурузы из тетраплоидных генотипов за 3-4

года селекционной работы. Полученные этим способом дигаплоидные (редигаплоидные и редиплоидные) линии могут быть генетически близкими к исходным тетраплоидным родительским генотипам, из которых они были выделены. С помощью этого метода селекционер может получить диплоидные линии как из культурных полиплоидных видов рода *Zea*, так и из диких тетраплоидных сороричей, что даёт возможность проводить скрещивания с диплоидной кукурузой и вовлекать их генетический потенциал в селекцию диплоидной кукурузы.

Литература/References

- Bennett M.D., Leitch I.J. Plant DNA C-values database (release 2.0, Jan. 2003). Available from: www.rbghkew.org.uk/cval/homepage.html [accessed Jan. 10, 2023].
- De Storme N., Mason A. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*. 2014;1:10-33. DOI: 10.1016/j.cpb.2014.09.002
- Deimling S., Röber F., Geiger H.H. Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Vorträge für Pflanzenzüchtung*. 1997;38:203-204 [in German].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): [website]. URL: <https://www.fao.org> [accessed Jan. 10, 2023].
- Kellogg E.A., Bennetzen J.L. The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *American Journal of Botany*. 2004;91(10):1709-1725. DOI: [jstor.org/stable/4123862](https://doi.org/10.1007/s12220-004-9110-1)
- Khadzhinov M.I., Chumak M.V. Creation of new markers for the isolation of maize haploids (Sozdaniye novykh markerov dlya vydeleniya gaploidov kukuruzy). In: *Apomyxis and Cytoembriology of Plants (Apomiksis i tsitoembriologiya rasteniy)*. Saratov: Saratov University Publisher; 1978. Iss. 4. p.117-118. [in Russian] (Хаджинов М.И., Чумак М.В. Создание новых маркеров для выделения гаплоидов кукурузы. В кн.: *Апомиксис и цитозембриология растений*. Саратов: Изд-во Саратовского университета; 1978. Вып. 4. С.117-118).
- Khatеfov E.B. Seed productivity of tetraploid maize and ways to increase it in the conditions of Kabardino-Balkaria (Semennaya produktivnost tetraploidnoy kukuruzy i puti yeye povysheniya v usloviyakh Kabardino-Balkarii) [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2012. [in Russian] (Хатевов Э.Б. Семенная продуктивность тетраплоидной кукурузы и пути ее повышения в условиях Кабардино-Балкарии: дис. ... д-ра биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2012).
- Khatеfov E.B. Method of creating redyploid lines from tetraploid populations of maize. In: *N. I. Vavilov's Ideas in the Modern World: Abstracts of the IV Vavilov International Conference; 2017 November 20-24; St. Petersburg, Russia*. St. Petersburg: VIR; 2017. p.326-327. [in Russian] (Хатевов Э.Б. Метод создания редиплоидных линий из тетраплоидных популяций кукурузы. В кн.: *Идеи Н.И. Вавилова в современном мире: Тезисы докладов IV Вавиловской международной конференции; 20-24 ноября 2017 г.; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: ВИР; 2017. С.326-327).
- Khatеfov E.B., Asadova G.M. Development of dihaploid maize lines: (guidelines) E.E. Radchenko (ed.). St. Petersburg: VIR; 2020. [in Russian] (Хатевов Э.Б., Асадова Г.М. Создание дигаплоидных линий кукурузы: методические указания / под ред. Е.Е. Радченко. Санкт-Петербург: ВИР; 2020). DOI: 10.30901/978-5-907145-56-6
- Khatеfov E.B., Shatskaya O.A. The use of haploinducers in heteroploid crossings for broadening the genetic base of maize. In: *Genetic Resources of Cultivated Plants in XXI Century: Current status, problems, prospects, perspectives: Abstracts of the II Vavilov International Conference; 2007 November 26-30; St. Petersburg, Russia*. St. Petersburg: VIR; 2007. p.367-369. [in Russian] (Хатевов Э.Б., Шацкая О.А. Применение гаплоиндукторов в гетероплоидных скрещиваниях для расширения разнообразия генетической основы кукурузы. В кн.:

- Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: Материалы II Вавиловской международной конференции; 26-30 ноября 2007; Санкт-Петербург, Россия. Санкт-Петербург: ВИР; 2007. С.367-369).*
- Khatefov E.B., Shomakhov B.R., Kushkhova R.S., Kudayev R.A., Khashirova Z.T., Gyaurgiyev A.Kh. Combining ability and response to CMS in reverse diploid maize lines developed at VIR. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):15-23. [in Russian] (Хатефов Э.Б., Шомахов Б.Р., Кушхова Р.С., Кудаев Р.А., Хашширова 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: 10.30901/2658-6266-2019-4-02
- Lin B.-Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics*. 1984;107(1):103-115. DOI: 10.1093/genetics/107.1.103
- Ministry of Agriculture of the Russian Federation. FGBU Center for Agroanalytics. Digest of key publications in the media. 2020. Iss. 14. [in Russian] (Минсельхоз РФ. ФГБУ «Центр агроаналитики». Дайджест ключевых публикаций в СМИ. 2020. Вып. 14). URL: https://specagro.ru/sites/default/files/2020-09/daydzhest-zernovye_no14.pdf [дата обращения 10.01.2023]
- Pausheva Z.P. Plant cytology practical training. Moscow: Agropromizdat, 1988. [in Russian] (Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Агропромиздат; 1988).
- Panchy N., Lehti-Shiu M., Shiu S.H. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology*. 2016;171(4):2294-2316. DOI: 10.1104/pp.16.00523
- Shcherbak V.S. Widening of genetic pool of initial stock for corn breeding. *Maize breeding: Collection of scientific works of the Krasnodar Research Institute of Agriculture (Sbornik nauchnykh trudov Krasnodarskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta sel'skogo khozyaistva)*. 1984;27:104-117. [in Russian] (Щербак В.С. Расширение генетической основы исходного материала в селекции кукурузы. *Селекция кукурузы: сборник научных трудов КНИИСХ*. 1984;27:104-117).
- Shcherbak V.S., Khatefov E.B. A study of seed productivity of tetraploid maize (Issledovaniye plodovitosti tetraploidnoy kukuruzy). In: *Collection of scientific works dedicated to the 100th anniversary of V.A. Nevinskykh (Sbornik nauchnykh trudov, posvyashchennyi 100-letiyu V.A. Nevinskykh)*. Krasnodar; 2000. p.180-186. [in Russian] (Щербак В.С., Хатефов Э.Б. Изучение плодovitости тетраплоидной кукурузы. В кн.: *Сборник научных трудов, посвященный 100-летию В.А. Невинных*. Краснодар; 2000. С.180-186).
- Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T.A., Minx P., Reily A.D., Courtney L., Kruchowski S.S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S.M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R.M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson S.M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla J., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner M., Narechania A., Ren J.M., Deragon J.M., Estill J.C., Fu Y., Jeddleloh J.A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D.R., Liu S., Liu Z., Nagel D.H., McCann M.C., SanMiguel P., Myers A.M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B.W., Ponnala L., Schneider K.L., Schwartz D.C., Sharma A., Soderlund C., Springer N.M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T.K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J.L., Dawe R.K., Jiang J., Jiang N., Presting G.G., Wessler S.R., Aluru S., Martienssen R.A., Clifton S.W., McCombie W.R., Wing R.A., Wilson R.K.. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. 2009;326(5956):1112-1115. DOI: 10.1126/science.1178534
- te Beest M., Le Roux J.J., Richardson D.M., Brysting A.K., Suda J., Kubesová M., Pysek P. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*. 2012;109(1):19-45. DOI: 10.1093/aob/mcr277
- Troyer A.F. Background of U.S. hybrid corn. *Crop Science*. 1999;39:601-626. DOI: 10.2135/cropsci1999.0011183X003900020001xa
- Yao H., Srivastava S., Swyers N., Han F., Doerge R.W., Birchler J.A. Inbreeding depression in genotypically matched diploid and tetraploid maize. *Frontiers in Genetics*. 2020;11:564928. DOI: 10.3389/fgene.2020.564928

Информация об авторах

Алексей Владимирович Ульянов, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, krasnixin56@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0005-3960-8288>

Денис Сергеевич Куцев, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, kathakam@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-3659-1523>

Владимир Вячеславович Васипов, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, vl.vasipov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3829-7714>

Халима Рафизовна Мамадова, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией современной селекции и молекулярной биологии, Азербайджанский научно-исследовательский институт земледелия Министерства сельского хозяйства Азербайджанской Республики, Азербайджан, г. Баку, пос. Пиршаги, Совхоз № 2, 0helime@gmail.com

Милана Юрьевна Хакулова, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, khakulova98mil@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-4001-820x>

Сельминаз Фирудиновна Исрафилова, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Дагестанская опытная станция – филиал ВИР, 368612 Россия, Республика Дагестан, Дербентский район, с. Вавилово, selyaisrafilova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6570-4418>

Милана Руслановна Фирсова, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, milagonikova001@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6995-9015>

Андрей Владиславович Карлов, аспирант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, dra29399@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9193-9862>

Эдуард Балилович Хатефов, ведущий научный сотрудник, отдел генетических ресурсов крупяных культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, haed1967@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5713-2328>

Information about the authors

Alexey V. Ulyanov, postgraduate student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, krasnixin56@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0005-3960-8288>

Denis S. Kutsev, postgraduate student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, katham@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-3659-1523>

Vladimir V. Vasipov, postgraduate student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, vl.vasipov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3829-7714>

Khalima R. Mamadova, Senior research associate, Head, Laboratory of Modern Selection and Molecular Biology, Azerbaijan Sciences Research Institute of Agriculture, Ministry of Agriculture of Azerbaijan Republic, State Farm No.2, Pirshagi Settlement, Baku, Azerbaijan. 0lhelime@gmail.com

Milana Yu. Khakulova, postgraduate student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, khakulova98mil@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-4001-820x>

Selminaz F. Israfilova, Junior researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Dagestan Experimental Station of VIR, Vavilovo Village, Derbentsky District, Republic of Dagestan, 368612 Russia, selyaisrafilova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6570-4418>

Milana R. Firsova, postgraduate student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, milagonikova001@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-6995-9015>

Karlov Andrey V. Karlov, postgraduate student, Federal Research Center of N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, dra29399@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9193-9862>

Eduard B. Khatefov, Leading researcher, Department of Groats Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, haed1967@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5713-2328>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 11.01.2023; одобрена после рецензирования 04.03.2023; принята к публикации 25.03.2023.

The article was submitted on 11.01.2023; approved after reviewing on 04.03.2023; accepted for publication on 25.03.2023.