

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ВОЗВРАТНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ В ДИГАПЛОИДНОЙ СЕЛЕКЦИИ КУКУРУЗЫ

Михайлов М. Э.

Институт генетики, физиологии и защиты растений  
MD2002, Молдова, Кишинев, ул. Лесная, 20;  
✉ mihailov-me@mail.ru

Дигаплоидные (ДН) линии, получаемые удвоением генома гаплоидов, широко применяются в селекции многих культур, так как позволяют в сжатые сроки переводить варианты генов в гомозиготное состояние. Однако в селекции кукурузы преимущества дигаплоидов используются еще не в полной мере. В настоящей работе дана оценка эффективности метода возвратных скрещиваний и получили дальнейшее развитие оригинальные авторские схемы, направленные на создание максимально продуктивной гомозиготной линии кукурузы на основе ДН-линий, полученных из межлинейного гибрида  $F_1$ . Исходный материал – линии кукурузы Rf7 и Ku123. Цикл селекции состоял в получении гаплоидов из выбранного генотипа (матроклинная гаплоидия с применением индуктора), последующем удвоении хромосом (с помощью колхицина или спонтанном) и размножении полученных дигаплоидов для получения нового набора ДН-линий. В первом цикле ДН-линии получали из гибрида  $F_1$  (Rf7 × Ku123), а в следующих циклах – из генотипов, полученных скрещиванием выбранной ДН-линии предыдущего цикла с  $F_1$ ,  $P_1$  или  $P_2$ . Выполнены три цикла селекции на продуктивность, в 2017 году проведено одновременное полевое испытание ДН-линий всех циклов. Селекционный прогресс оценивали по приросту продуктивности первого початка в сравнении с лучшим родителем Rf7 (103,9 г/растение в 2017 году). В результате первого цикла селекции на основе гибрида  $F_1$  получены 43 ДН-линии, продуктивность лучшей из них (rk-5) составила 112,5 г/раст. Три линии (rk-6, rk-5 и rk-22), отобранные для следующего цикла, затем были скрещены с  $F_1$  либо с родительской линией Rf7. Во втором цикле селекции получены серии из 41, 49 и 16 линий соответственно. Продуктивность лучших генотипов составила 121,2, 117,0 и 107,1 г/раст. Третий цикл включал популяции из 24 и 8 линий, полученных на основе возвратных скрещиваний с линиями Rf7 и Ku123 соответственно. Лучшие генотипы этих серий характеризовались продуктивностью 135,6 и 97,7 г/раст. В результате селекции получена линия rk-433, на 30,5% превосходящая по продуктивности лучшего родителя Rf7. Селекционный прогресс составил в среднем 10,2% за цикл. В дигаплоидной селекции кукурузы перспективно использование возвратных скрещиваний отобранных ДН-линий из разных циклов с исходным материалом или с  $F_1$ . При таком методе заметный прогресс возможен и при небольшом объеме циклов, включающих от 20 до 50 ДН-линий.

**Ключевые слова:** удвоенные гаплоиды, кукуруза, дигаплоидная селекция, благоприятные аллели, продуктивность, инбредные линии.

**Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities** Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

**Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The author thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work**

**Дополнительная информация / Additional information** Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-24-32>

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

**Автор одобрил рукопись / Author approved the manuscript**

**Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest**

## EFFICIENCY OF THE BACKCROSSING METHOD IN DIHAPLOID MAIZE BREEDING

Mikhailov M. E.

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection,  
20 Lesnaya St., Chisinau MD2002, Moldova  
✉ mihailov-me@mail.ru

The doubled haploid (DH) lines, obtained by doubling the haploid genome, are now widely used in breeding many crops, since they allow to transfer gene variants to the homozygous state in a short time. However, the advantages of doubled haploids are not fully utilized in maize breeding. The present work is devoted to the evaluation of the backcrossing method efficiency and to further development of the original schemes of creating highly productive homozygous maize lines on the basis of DH lines originating from an interline  $F_1$  hybrid. Rf7 and Ku123 maize lines were used as the initial material. The breeding cycle consisted of producing haploid plants in the selected genotype (matroclin haploidy using an inducer), subsequent chromosome doubling (colchicine-induced or spontaneous), followed by multiplication of the doubled haploids for obtaining a new set of DH lines. In the first cycle, the DH lines were obtained from the  $F_1$  hybrid (Rf7 × Ku123), while in the subsequent cycles they were obtained from the genotypes obtained by crossing a DH line selected from the previous cycle with  $F_1$ ,  $P_1$  or  $P_2$ . Three cycles of selection for productivity were performed, and in 2017 the DH lines obtained in all cycles were simultaneously tested in the field. The breeding progress was estimated by the increase in the first ear productivity compared to the best parent Rf7 (103.9 g per plant in 2017). The first selection cycle resulted in 43 DH lines obtained on the basis of the  $F_1$  hybrid. Productivity of the best line rk-5 amounted to 112.5 g per plant. Three lines (rk-6, rk-5 and rk-22) selected for the next cycle were further crossed with  $F_1$  or with the parental line Rf7. The second selection cycle yielded three series containing 41, 49 and 16 lines, while productivity of the best genotypes was 121.2, 117.0 and 107.1 g per plant, respectively. The third cycle included populations of 24 and 8 lines obtained through backcrosses with Rf7 and Ku123 lines, respectively. The best genotypes in these series had productivity of 135.6 and 97.7 g per plant. As a result of selection, the obtained rk-433 line had a productivity 30.5% higher than that of the best parent Rf7. The progress averaged 10.2% per cycle. In maize breeding using doubled haploids it is promising to use backcrosses of the selected DH lines with the initial material or with  $F_1$ . Thanks to such an approach, a noticeable progress can be reached with a small number of cycles including from 20 to 50 DH lines.

**Key words:** doubled haploids, maize, doubled haploid breeding, favorable alleles, grain yield, inbred lines.

**Для цитирования:** Михайлов М. Э. Эффективность метода возвратных скрещиваний в дигаплоидной селекции кукурузы. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):24-32. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-24-32

**For citation:** Mikhailov M. E. Efficiency of the backcrossing method in dihaploid maize breeding. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):24-32. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-24-32

ORCID:  
Михайлов М. Э. [orcid.org/0000-0003-1204-410X](https://orcid.org/0000-0003-1204-410X)  
УДК 633.15:631.527  
Поступила в редакцию: 15.10.2018  
Принята к публикации: 11.06.2019

## Введение

Дигаплоидные (DH) линии – это гомозиготные линии, получаемые удвоением генома гаплоидов. Гаплоиды получают из мужских или женских гамет исходного диплоидного растения. В отличие от многих других видов растений, у которых андроклинные гаплоиды получают из культуры пыльников, у кукурузы применяется большей частью матроклинный способ, когда зерна с гаплоидным зародышем развиваются из редуцированной яйцеклетки после опыления пыльцой специальной линии – гаплоидного индуктора. Геном гаплоидного организма затем удваивают и после размножения получают полностью гомозиготную дигаплоидную (DH) линию. Полученный результат равносителен результату многолетнего инбридинга. В генетическом отношении DH-линии подобны рекомбинантным инбредным линиям (RILs), но выгодно отличаются от них сжатыми сроками получения и отсутствием остаточной гетерозиготности, характерной для линий, получаемых инбридингом.

В массовом порядке DH-линии начали использовать сравнительно недавно, начиная с 1990-х годов. В последние десятилетия дигаплоиды широко используются в селекции наряду с RILs (Melchinger et al., 2013), а в селекции кукурузы их роль оценивается даже как революционная (Hu et al., 2016). По данным J. Murovec и B. Bohanec (2012), на основе дигаплоидных линий создано 290 сортов различных сельскохозяйственных культур, среди которых рис, пшеница, тритикале, ячмень, баклажан, дыня, перец.

Основное применение дигаплоиды кукурузы нашли в селекционных программах, в которых DH-линии выступают как замена RILs (например, Bordes et al., 2006). С помощью дигаплоидов можно быстро переводить варианты генов в состояние полной гомозиготности и таким образом экономить время. Согласно A. Barkley и F. G. Ghumley (2012), создание сорта пшеницы от закладки опыта до выхода на рынок занимает 8–12 лет обычными методами и 6–9 лет с помощью дигаплоидов.

Дигаплоиды, по сравнению с RILs, предоставляют новые возможности комбинирования генетического материала и позволяют использовать в практической селекции новые подходы.

T. Lübberstedt и U. K. Frei (2012) предлагали использовать дигаплоиды для интрогрессии сразу нескольких генов. Обычным методом насыщающего беккроссирования можно переносить лишь ограниченное число генов, но с применением DH-линий возможности этого метода усиливаются благодаря свойственному им расщеплению. Если, например, в  $F_2$ , полученном от скрещивания диплоидных генотипов, сочетание из 5 генов встречается с частотой 1/1024, то среди DH-линий – с частотой 1/32.

Этот подход следует признать перспективным, хотя о практической реализации его у нас сведений нет. Пока

что дигаплоиды использовали для интрогрессии единичных генов, например, гена устойчивости к гербициду у горчицы (Mithila, Hall, 2007) и гена устойчивости к желтой ржавчине у пшеницы (Bakhtiar et al., 2014). Дигаплоиды в этих случаях использовались лишь на завершающем этапе селекции для быстрой гомозиготизации отобранных вариантов – то есть в том же качестве, в каком используются RILs.

Наше внимание привлекла задача создания из гибрида гомозиготной линии, в которой было бы накоплено как можно большее число полученных от обоих родителей аллелей, оказывающих положительное влияние на проявление хозяйственно ценных признаков (далее – благоприятные аллели). В настоящее время в дигаплоидной селекции обычно ограничиваются одним циклом, получая из исходной популяции (гибрида, сорта, синтетика и пр.) популяцию DH-линий и выбирая из них лучшую. Гаметическое расщепление позволяет создавать вторичные популяции DH-линий (то есть новые циклы) от скрещивания лучшей DH-линии с исходным материалом, используя его, как донор благоприятных аллелей. В предыдущей нашей работе (Mikhailov, 2010) показано, как можно таким способом, цикл за циклом, накапливать в DH-линиях аллели с положительными аддитивными эффектами. Это, в сущности, и есть упомянутая выше интрогрессия групп генов, но проводимая вслепую, без генетических маркеров, с отбором только по фенотипу.

В данной работе представлены результаты трех циклов дигаплоидной селекции в бипарентальной [ред. двуродительской] популяции кукурузы с применением возвратных скрещиваний DH-линий с  $F_1$ , а также с родительскими формами ( $P_1$  и  $P_2$ ).

## Материалы и методы

Исходный материал для селекции – простой гибрид кукурузы  $Rf7 \times Ku123$ , который далее будем для краткости обозначать как  $F_1$ . Его урожайность составляет 60–80 ц/га в хорошие годы. Он примерно на четверть уступает по урожайности таким районированным в Молдове гибридам, как M291MB и M450MB, но выбран нами из-за высокой эффективности получения дигаплоидов. Линия  $Rf7$  отличается хорошей урожайностью (40–45 ц/га), у линии  $Ku123$  урожайность ниже (30 ц/га), но она отличается засухоустойчивостью.

Гаплоидные растения получали, применяя созданные в нашем институте индукторы MHI и LHI. При опылении индуктором в большинстве случаев происходит нормальное двойное оплодотворение, но некоторые зерна развиваются с триплоидным эндоспермом и гаплоидным зародышем, который содержит только хромосомы от материнской формы. Оба индуктора несут доминантный аллель *R1-nj*, который в сочетании с другими генами

антоциановой окраски вызывает пигментацию зародыша, что позволяет отличать гаплоиды от диплоидов на стадии сухих зерновок. Гаплоидные зародыши не окрашены, так как в них отсутствует аллель *R1-nj* (Nanda, Chase, 1966).

Для удвоения генома гаплоидов применяли разные варианты колхициновой обработки. Чаще всего использовали метод С. Даймлинга (Deimling et al., 1997): у проростков длиной 3–4 см отщипывали кончики coleoptилей и погружали на 12 часов в 0,06% раствор колхицина с добавлением 0,5% DMSO, после чего проростки пересаживали в поле. Применяли и беспересадочный метод с обработкой проростков прямо в поле: раствор колхицина концентрации 0,030–0,012% подавали по нитке через прокол, проходящий ориентировочно через точку роста. В некоторых вариантах отмечалась высокая частота спонтанного удвоения хромосом, и в таких случаях обходились без колхицина.

Растения, выжившие после обработки, впоследствии самоопылялись. Это было возможно для тех растений, у которых в результате обработки произошло удвоение хромосом в клетках хотя бы небольшого сектора зародышевой метелки. Каждая семья, полученная от самоопыления обработанных колхицином растений, представляла собой ДН-линию. Как правило, они были малочисленны (многие представлены только одним зерном), поэтому в следующем сезоне их размножали. Каждый цикл получения ДН-линий, включал, таким образом, три этапа: 1) получение гаплоидов, 2) удвоение хромосом, 3) размножение.

Первичная популяция состояла из 43 ДН-линий, полученных непосредственно из гибрида  $F_1$  и получивших обозначения с *rk-1* по *rk-60*, а вся первичная популяция

обозначена как «серия *rk-0*». От трех линий этой серии получены три популяции второго цикла, и от двух линий второго цикла получены две популяции третьего цикла (схема на рис. 1).

Дигаплоидные линии испытывали по мере их получения. Самое полное испытание проведено в 2017 году, когда испытывались одновременно представители всех трех циклов. Испытание проводили в трех повторностях по 5 растений в каждой, при густоте стояния 3 раст./м<sup>2</sup>. Контрольные генотипы (*Rf7*, *rk-5*, *rk-6*, *rk-22*, *rk-138*, *rk-148* и  $F_2$ ) высевали в 6 повторностях. Продуктивность оценивали после сушки початков, при влажности зерна около 10%. Проводили отбор на продуктивность первого початка. Во-первых, агрономически предпочтительнее, когда продуктивность зависит в основном от первого початка. Вторые початки чаще теряются, при ручной уборке их часто пропускают, и тогда оценка урожайности может оказаться необъективной. Во-вторых, продуктивность второго початка сильно зависит от внешних условий.

Кроме дигаплоидных линий, в тех же условиях, но в отдельно расположенных блоках испытывались потомства от тест-скрещиваний с родительскими формами *Rf7* и *Ky123*.

Средние значения показателей продуктивности у дигаплоидных линий сравнивались с ожидаемыми по аддитивно-доминантной модели, в рамках которой значение признака определяется только внутрилокусными взаимодействиями (аддитивными и доминантными), а неаллельные взаимодействия отсутствуют (Mather, Jinks, 1985). Воспроизводимость результатов по годам оценивали по значениям коэффициента корреляции Пирсона.

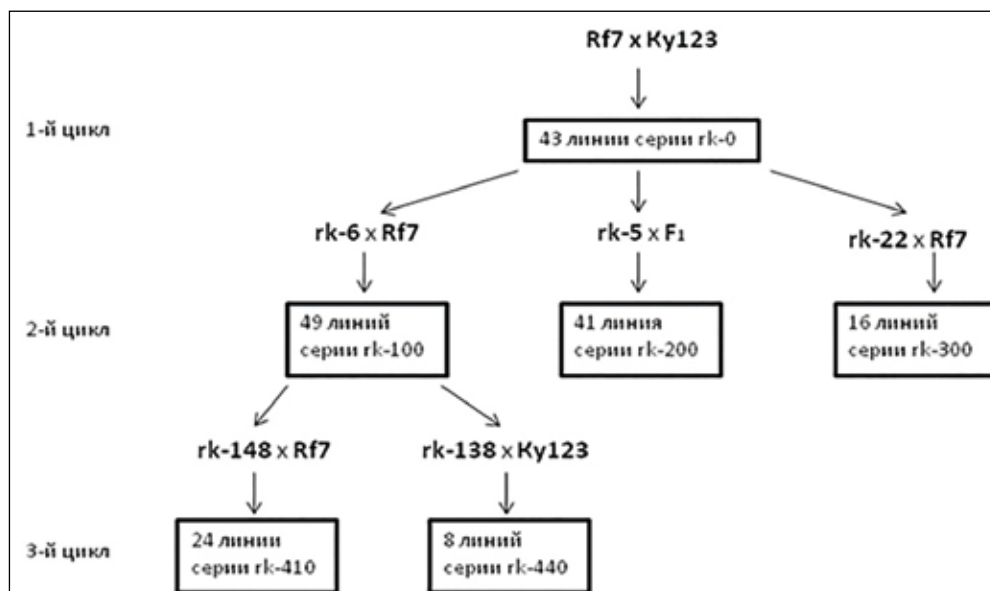


Рис. 1. Схема селекционного процесса, использованного в работе

Fig. 1. Diagram of the selection process used in the work

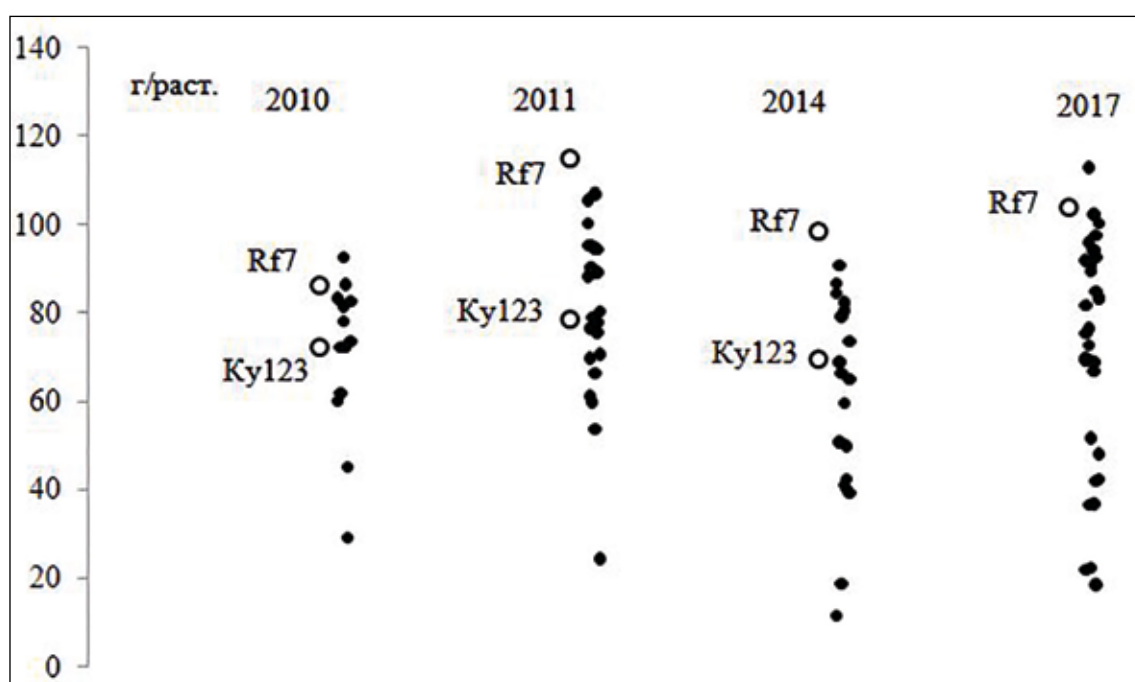
## Результаты

**Первый цикл.** Дигампоидные линии первого цикла, полученные непосредственно из  $F_1$ , испытывали по мере их создания в период с 2010 по 2017 год. На рисунке 2 представлено графическое распределение этих линий по продуктивности первого початка в разные годы изучения.

В первом цикле ДН-линии распределились не вокруг среднего родительского значения, как ожидалось по аддитивно-доминантной модели, а вокруг худшего родителя Ky123. Около половины линий имели продуктивность

ниже, чем Ky123, тогда как отдельные линии достигали или превышали по продуктивности уровень лучшего родителя Rf7. Для 2017 года реконструирована ожидаемая продуктивность первого початка у линии Ky123, которая составила 75 г/раст.

Распределение ДН-линий по продуктивности явно несимметрично, в распределениях хорошо заметны растянутые «нижние хвосты» (рис. 2). Асимметричность распределения и сдвиг его в нижнюю сторону свидетельствует о неаллельных взаимодействиях комплементарного типа, когда эффект суммы генов больше суммы эффектов.



**Рис. 2.** Значения продуктивности первого початка у линий серии rk-0. Линии на диаграмме обозначены точками, по оси ординат отложены значения их продуктивности. Крупными точками обозначены исходные родительские формы Rf7 и Ky123

**Fig. 2.** The first ear grain yield in DH lines of the rk-0 series. Lines marked by dots in the diagram; grain yield values are plotted on the y-axis. Large dots indicate the original parental lines Rf7 and Ku123

Воспроизводимость результатов по годам довольно неплохая: корреляции между значениями признака в разные годы изучения составляют  $r = 0,74 \div 0,76$  (рассчитаны при сравнении данных 2011–2017 гг. и 2014–2017 гг., где оценено много общих линий). Лучшей ДН-линией первого цикла признана rk-5, так как по результатам испытаний в 2010 и 2017 гг. она превысила по продуктивности линию Rf7. Остальные линии ни разу не превысили по продуктивности первого початка линию Rf7, за исключением rk-6, для которой превышение наблюдалось только в 2010 году.

**Второй цикл.** Согласно схеме, обоснованной нами

ранее (Михайлов, 2010), второй цикл следовало бы заложить от скрещивания лучшей линии первого цикла rk-5 с  $F_1$ , что и было впоследствии сделано. Но вначале было решено отступить от схемы и выбрать линию не по продуктивности, а по комбинационной способности и скрестить ее с одним из родителей. Это решение было вызвано тем, что в нашем распоряжении оказалась информация о продуктивности потомств от тест-скрещиваний ДН-линий с родителями, использование которой в схеме не предусмотрено, но которая позволяет сделать заключения о распределении благоприятных (плюс) аллелей между родителями.

При испытаниях потомств от тест-скрещиваний обнаружилась высокая продуктивность гибрида  $rk-6 \times Rf7$ , почти равная продуктивности  $F_1$  ( $Rf7 \times Ky123$ ): 150,2 г/раст. по сравнению с 156,2 г/раст. у  $F_1$  в 2009 г., 131,6 по сравнению с 147,0 в 2010 г. и 188,9 по сравнению с 192,8 в 2011 г. Таким образом, комбинативная способность линии  $rk-6$  почти сравнялась с комбинативной способностью линии  $Ky123$ . Второй цикл был заложен от скрещивания этой линии с  $Rf7$ , а не с  $F_1$ . Из гибрида  $rk-6 \times Rf7$  было произведено 49 ДН-линий, получивших обозначения с  $rk-101$  и выше, а весь набор был обозначен как «серия  $rk-100$ » (рис. 1).

Следующая серия,  $rk-200$ , насчитывающая 41 линию, была получена от скрещивания  $rk-5 \times F_1$ . Линия  $rk-5$  выбрана по собственной продуктивности. Предполагалось, что в ней накоплено больше всего благоприятных аллелей от обоих родителей, и число их можно увеличить, перенеся их из  $F_1$  как из оптимального донора. В качестве примера проследим генотип произвольного локуса  $A$ . Линия  $rk-5$  может иметь генотип  $AA$  или  $aa$ . Если линия имеет генотип  $AA$ , то скрещивая ее с  $F_1$ , получаем  $AA \times Aa = AA + Aa$ . Растения с генотипом  $AA$  (половина растений в потомстве) дадут затем начало гаплоидам, несущим аллель  $A$ , и далее ДН-линиям

с генотипом  $AA$ . Из другой половины растений с генотипом  $Aa$  будут получены гаплоиды, несущие аллели  $A$  и  $a$  и затем ДН-линии  $AA$  и  $aa$  в соотношении 1:1. Следовательно,  $\frac{3}{4}$  от числа ДН-линий второго цикла будут иметь генотип  $AA$  и  $\frac{1}{4} - aa$ . И наоборот, если у линии  $rk-5$  генотип  $aa$ , то  $\frac{3}{4}$  линий второго цикла будут с генотипом  $aa$  и  $\frac{1}{4}$  с генотипом  $AA$ . Таким образом, выполнение второго цикла в таком варианте приведет к обновлению генома линии-предшественника (в данном случае  $rk-5$ ) в среднем на четверть.

Третья серия,  $rk-300$  (включавшая 15 линий) была получена из гибрида от скрещивания  $rk-22 \times Rf7$  и представляла собой дублирующий вариант серии  $rk-100$ .

Результаты одновременного испытания линий в 2017 году приведены в таблице и на рисунке 3. Удачными оказались два варианта их трех:  $rk-100$  и  $rk-200$ .

Серия  $rk-100$  испытывалась дважды, в 2013 и 2017 гг., и результаты воспроизвелись удовлетворительно, с корреляцией  $r = 0,69$ . Серии  $rk-200$  и  $rk-300$  тоже испытывались в течение двух лет, один из которых, 2015 г., был засушливым и потому нетипичным. Результаты, полученные в 2015 г., очень слабо коррелировали с данными 2017 года ( $r = 0,36$ ), поэтому для двух последних серий лучше принимать во внимание только результаты 2017 года.

**Таблица. Результаты одновременного испытания ДН-линий в 2017 г.**

**Table. Results of DH lines simultaneous test in 2017**

Цикл Cycle	Серия Series	Число ДН-линий Number of DH lines		Продуктивность, г/раст. Grain yield, g/plant			
		общее total	превосходящих по продуктивности Rf7 With productivity above that of Rf7	средняя mean	медиана median	max	min
1	rk-0	31	1(3)	71,1 (76,5)	76,2 (86,6)	112,5 (112,8)	18,2 (20,6)
2	rk-100	43	6(11)	85,0 (91,9)	84,4 (93,1)	121,2 (128,6)	31,7 (34,6)
	rk-200	40	9(13)	87,1 (93,3)	90,6 (67,4)	117,0 (124,4)	48,6 (50,3)
	rk-300	15	1(1)	81,8 (83,2)	82,2 (83,3)	107,1 (108,1)	39,6 (39,6)
3	rk-410	24	4(4)	90,8 (91,0)	93,0 (93,4)	135,6 (135,6)	46,1 (46,1)
	rk-440	8	0(0)	59,2 (66,0)	49,0 (68,6)	97,7 (97,7)	22,8 (27,2)
Контроль Controls	Rf7			103,9 (104,4)			
	F <sub>2</sub>			138,8 (155,5)			

**Примечание.** Данные без скобок относятся к первому початку, данные в скобках – к общей продуктивности

**Note:** The data without brackets refer to the first ear; the total grain yield is given in brackets



Если судить по данным 2017 года, то средняя продуктивность в двух успешных сериях выросла примерно на 1/5 по сравнению с первым циклом, независимо от того, учитывалась ли продуктивность вторых початков или нет. Ряд линий превосходили по продуктивности лучшего родителя Rf7. Если учитывать продуктивность только первого початка, то в серии rk-100 таких линий было 11 из 50 в 2013 году и 6 из 43 в 2017, из них четыре линии превосходили лучшего родителя по продуктивности в оба года изучения. В 2017 году в серии rk-200 таких линий было 9 из 40.

Распределение ДН-линий по продуктивности, судя по

диаграммам, стало более симметричным, «нижние хвосты» стали менее выраженными, за счет чего сократилась абсолютная вариация. Сдвиг центра распределения в нижнюю сторону относительно ожидаемого по аддитивно-доминантной модели уменьшился. Если для серии rk-0 он равнялся 18,1 в 2017 году, то для серий rk-100 и rk-200 – 12,4 и 13,8. Значения ожидаемых средних составили: для серии rk-0:  $MP = \frac{Rf7 + Ky123}{2} = 89,2$ , для серии rk-100:  $\frac{Rf7 + rk6}{2} = 97,4$ , для серии rk-200:  $\frac{rk5 + MP}{2} = 100,9$ . Таким образом неаллельная компонента во втором цикле сохранилась, хотя и уменьшилась.

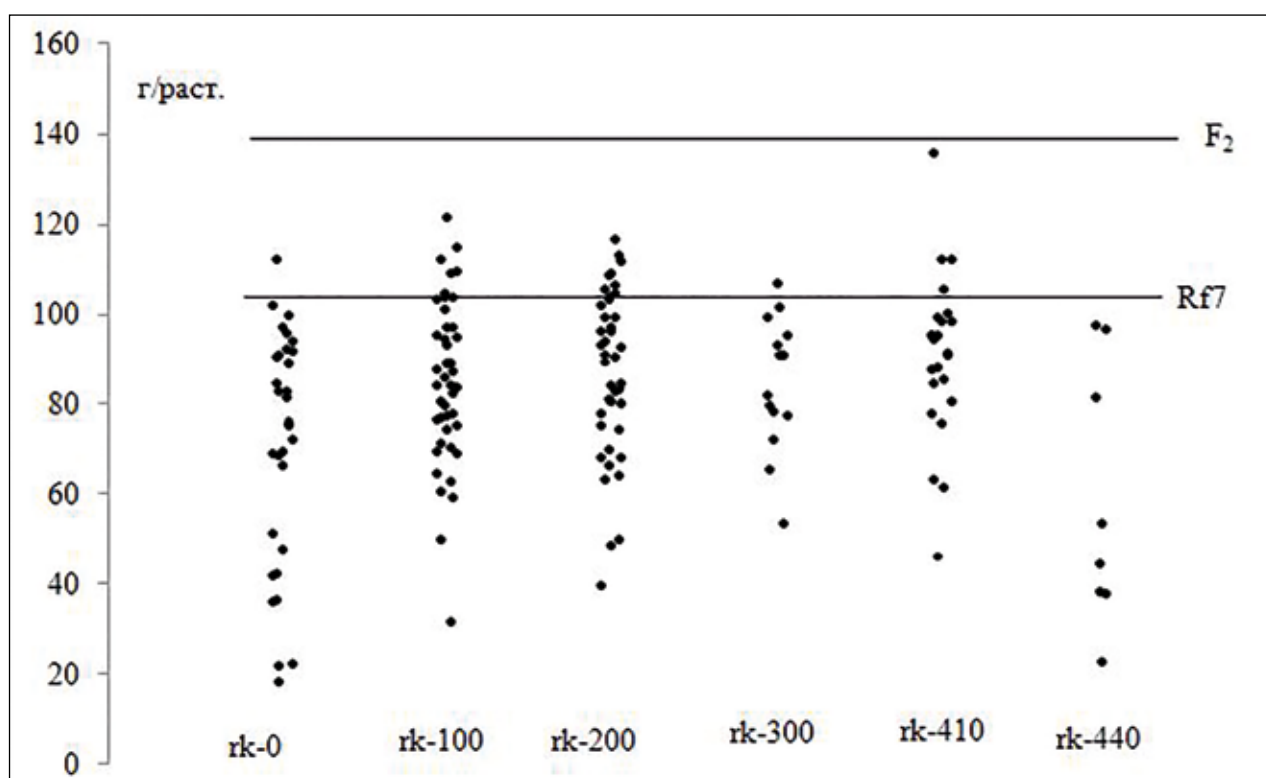


Рис. 3. Продуктивность первого початка во всех сериях в 2017 году

Fig. 3. The first ear grain yield for all series in 2017

В серии rk-300 отмечен меньший прогресс. Средняя продуктивность линий по сравнению с первым циклом выросла на 15,1%, а если учитывать продуктивность вторых початков – то на 8,8%. В 2017 году среди 15 ДН-линий только rk-305 превосходила по продуктивности линию Rf7.

Селекционный прогресс можно оценивать и по лучшей линии в цикле. Тогда по продуктивности первого початка прогресс составит 7,8% и 4,1% для серий rk-100 и rk-200, соответственно, а по общей продуктивности – 14,0% и 10,3%. Для серии rk-300 ни по одному из этих

показателей прогресса не наблюдалось.

Выбрать лучшую линию во втором цикле затруднительно, из-за влияния внешних условий и эффекта величины выборки. Поэтому самые перспективные линии испытывали дополнительно. По совокупности всех испытаний лучшей линией в серии rk-100 оказалась rk-142, которая, к сожалению, не была представлена в 2017 году. В 2016 году эта линия по продуктивности первого початка почти вплотную приблизилась  $F_2$  ( $Rf7 \times Ky123$ ), хотя заметно уступила  $F_2$  по общей продуктивности. Переход за уровень  $F_2$  означает состояние, когда использова-

ние ДН-линии выгоднее, чем пересев семян от  $F_1$ , и которое можно назвать частичным закреплением гетерозиса. Поэтому на рисунке 3 обозначен, наряду с уровнем линии Rf7, и уровень  $F_2$  (Rf7 × Ky123).

**Третий цикл.** Решение о проведении третьего цикла основывалось на результатах испытания серии rk-100 в 2013 году. Предшественник этой серии, rk-6, был отобран не по продуктивности, а по комбинационной способности. Результаты 2013 года показали, что этот прием может быть удачным, поэтому было решено повторить его в двух вариантах: 1) получить серию дигаплоидов из максимально продуктивного тест-скрещивания с Rf7; 2) получить серию дигаплоидов из максимально продуктивного тест-скрещивания с Ky123.

По продуктивности был отобран материал от двух комбинаций текст-скрещиваний, на основе которых затем получили серии из 24 и 8 линий. Эти серии получили обозначения rk-410 и rk-440. Небольшой объем серий вызван тем, что в этом случае было решено обойтись без колхидина, полагаясь на спонтанное удвоение. Обе серии испытаны в 2017 году, в общем посеве.

Серия rk-410 оказалась лучшей как по средней продуктивности входящих в нее линий, так и по продуктивности лучшей линии. Средняя продуктивность линий серии rk-410 составила 90,8 г/раст., что на 6,8% выше средней продуктивности линий серии-предшественника rk-100 (85,0 г/раст.) (см. таблицу). Значение продуктивности первого початка лучшей линии этой серии (rk-433) оказалось на 11,9% выше, чем у лучшей линии второго цикла rk-117 и вплотную приблизилось к значе-

нию  $F_2$  (Rf7 × Ky123), хотя из-за отсутствия вторых початков показатели общей продуктивности были ниже, чем у  $F_2$ . К сожалению, не было возможности сравнить эту линию с rk-142. Другим преимуществом этой серии является почти полное отсутствие вторых початков в составляющих ее линиях. Неаллельные взаимодействия уменьшились: сдвиг центра распределения вниз относительно ожидаемого среднего  $\frac{Rf7+rk148}{2} = 95,7$  составляет уже 4,9, что значительно ниже, чем в предыдущих сериях.

Другая серия – rk-440 – оказалась явно неудачной. Ни одна линия не превысила по продуктивности уровень Rf7, а среднее значение продуктивности оказалась даже ниже, чем в первом цикле.

**Общий итог** подведем по данным одновременного испытания линий в 2017 году. Началась селекция с двух линий, Rf7 и Ky123, лучшая из которых, Rf7, имеет продуктивность 103,9 г/раст. Это значение считаем стартовым. Конечное значение продуктивности (135,6 г/растение у линии rk-433) превысило его на 30,5%, что можно считать селекционным прогрессом за три цикла или в среднем 10,2% за цикл. На рисунке 4 изображен схематически селекционный путь от Rf7 до rk-433 через два промежуточных этапа (серии rk-0 и rk-100). Промежуточные приросты продуктивности выражены двояко: по лучшей линии в цикле и по средним значениям в цикле. Вторая величина более устойчивая и точная, но зато первая величина важнее практически, так как цель дигаплоидной селекции – получить хорошую линию, а не хорошую серию.

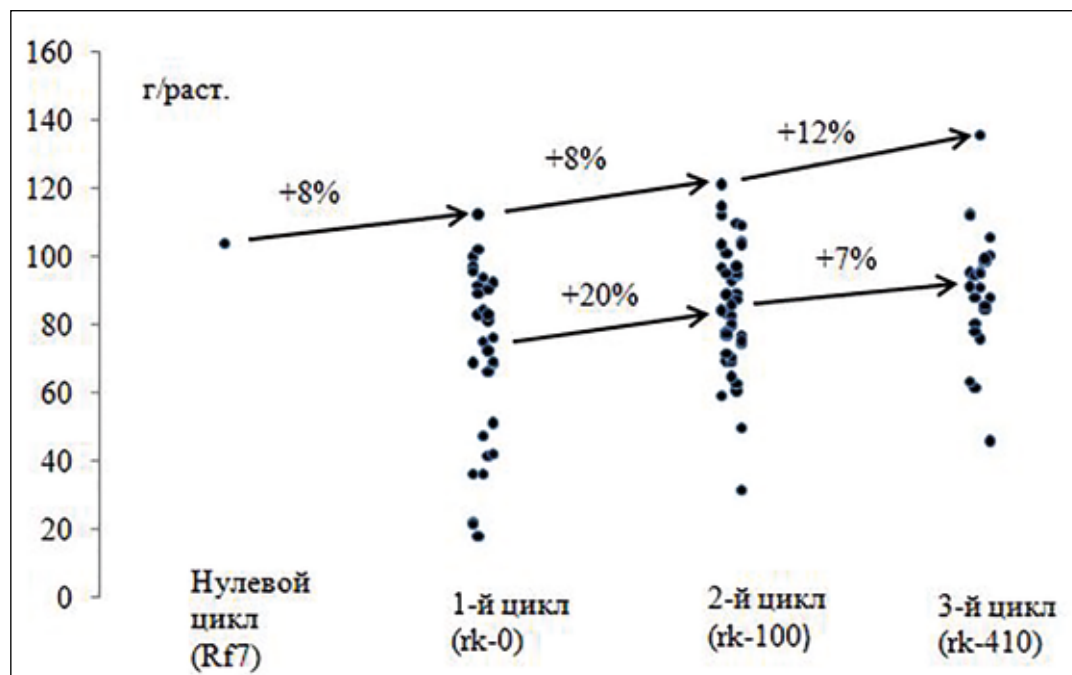


Рис. 4. Прогресс в трех циклах селекции по данным одновременного испытания линий в 2017 г.

Fig. 4. Yield improvement achieved in three selection cycles according to the simultaneous test data of 2017

## Обсуждение

Достигнутый результат (увеличение продуктивности в среднем на 10,2% за цикл) выглядит неплохо на фоне других результатов, полученных у кукурузы методом рекуррентной селекции. Например, J. Bordes et al. (2006) сравнивали два способа рекуррентной селекции: обычный и с включением дигаплоидных стадий. В обоих случаях получен селекционный прогресс по комбинационной способности около 7% за цикл. Z.-B. Peng et al. (2007) испытывали 3 варианта рекуррентной селекции и достигли уровня селекционного прогресса за цикл 5–6% *per se* и 3–5% по комбинационной способности. В исследованиях M. M. El-Rouby et al. (2017) селекционный прогресс за цикл составил 9% *per se*, а в работе S. Jenweerawat et al. (2009) – 15% по комбинационной способности.

Наши результаты показывают, что в дигаплоидной селекции можно с успехом применять такие приемы, которые в обычной рекуррентной селекции были бы рискованными. Если в рекуррентной селекции улучшенный генотип скрестить с исходным материалом с целью возврата утраченных в ходе селекции благоприятных аллелей, то это приведет не к прогрессу, а к регрессу.

Если в рекуррентной селекции ведется «мягкий» отбор, для того, чтобы избежать потери благоприятных аллелей и не потерять генетическое разнообразие, то свойственное дигаплоидам расщепление 1 : 1 позволит применять противоположную стратегию: вести предельно жесткий отбор, а утраченные благоприятные аллели возвращать в геном через скрещивания с генотипами, полученными на предыдущих стадиях селекции или при скрещиваниях с исходным материалом. При таких скрещиваниях будет восстанавливаться и генетическое разнообразие в популяции ДН-линий.

Наш результат также показывает, что эффективнее вести ступенчатую селекцию, пусть и с небольшим числом вариантов на каждом этапе, чем искать наилучший вариант в многочисленном первом цикле (как, например, в работе O. Odiyo et al. (2014), где дигаплоидная селекция ограничилась одним циклом, в котором было получено 806 ДН-линий). Можно приблизительно оценить для нашего случая, насколько вероятно найти в цикле гk-0 линию с такой же продуктивностью, как гk-433, если бы мы решили сделать этот цикл более многочисленным. Отклонение продуктивности гk-433 от среднего гk-0 составляет 3,38σ. Для нормального распределения вероятность такого события 1/2800, то есть надо получить около 3000 ДН-линий, чтобы найти линию с такой же продуктивностью, как гk-433. В то же время трехступенчатая селекция потребовала испытания всего 116 линий: 43 в серии гk-0, 49 в серии гk-100 и 24 в серии гk-410.

Остается открытым вопрос о лучшем способе выбора линии-предшественника для закладки следующего цик-

ла. В нашем эксперименте этот выбор производился пять раз. Один раз (при получении серии гk-200) предшественник выбирался по собственной продуктивности, и выбор оказался удачным. В остальных четырех случаях, когда предшественник выбирался по комбинационной способности, два раза выбор оказывался удачным и два раза неудачным. Выбор по комбинационной способности, как видим, не всегда эффективен, но об эффективности альтернативного способа выбора – по собственной продуктивности – нельзя сказать ничего определенного, пока мы располагаем только одним примером.

Следует ожидать, что при достаточно большом числе благоприятных аллелей, накопленных в геноме дигаплоидных линий, скрещивание с исходным материалом будет уже менее эффективным: теряться плюс-аллелей будет больше, чем приобретаться. В этих случаях дальнейший прогресс возможен, если после скрещивания с исходным материалом проводить скрещивания с лучшей линией предыдущего цикла, используя ее в качестве донора для возврата утраченных плюс-аллелей. В предыдущей нашей работе такие скрещивания названы восстановительными (Mikhailov, 2010).

Уровень селекционного прогресса при использовании описанного метода в селекции кукурузы предсказать сложно. Теоретически таким путем можно повысить продуктивность ДН-линий и до уровня  $F_1$ , так как, согласно современным представлениям, за продуктивность  $F_1$  отвечают в основном доминантные взаимодействия, а не сверхдоминантные (Kaeppler, 2012; Fievet et al., 2018). На практике это зависит от того, какое число благоприятных аллелей требуется накопить в геноме кукурузы для достижения такого результата. Выяснить это можно лишь экспериментально, в процессе дальнейшей дигаплоидной селекции.

## Выводы

1. В дигаплоидной селекции кукурузы можно применять метод возвратных скрещиваний, когда материалом для очередного цикла является потомство от скрещивания лучшей дигаплоидной линии предыдущего цикла с исходным материалом ( $F_1$ ,  $P_1$  или  $P_2$ ).
2. При таком методе очередной цикл селекции надо выполнять не менее чем в двух параллельных вариантах от разных линий-предшественников, так как при одном варианте выбор предшественника может оказаться неудачным.
3. Для эффективной дигаплоидной селекции кукурузы с использованием такого метода достаточно получать в цикле 20–50 дигаплоидных линий.



## References/Литература

- Bakhtiar F, Afshari F, Najafian G, Mohammadi M (2014) Backcross-breeding and doubled-haploid facilitated introgression of stripe rust resistance in bread wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (14): 1675–1685. DOI: 10.1080/03235408.2013.854612
- Barkley A, Chumley FG (2012) A Doubled haploid laboratory for Kansas wheat breeding: An economic analysis of biotechnology adoption. *International Food and Agribusiness Management Review* 15 (2): 99–120.
- Bordes J, Charmet G, de Vaulx RD et al. (2006) Doubled haploid versus  $S_1$  family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1063–1072. DOI 10.1007/s00122-006-0208-3
- Deimling S, Röber F, Geiger HH (1997) Methodik und genetik der *in-vivo* haploiden induction bei mais. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 38: 203–204.
- El-Rouby MM, El-Sheikh MH and Awad Allah SM (2017) Increasing the efficiency of recurrent selection for yield in maize. *Alexandria Science Exchange Journal* 38 (2): 193–202.
- Fiévet JB, Nidelet T, Dillmann C, de Vienne D (2018) Heterosis is a systemic property emerging from non-linear genotype-phenotype relationships: evidence from *in vitro* genetics and computer simulations. *Front. Genet.* 9: 159. DOI: 10.3389/fgene.2018.00159
- Hu H, Schrag T, Peis R et al. (2016) The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics* 202: 1267–1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234
- Jenweerawat S, Aekatasawan C Laosuwan P, Hallauer AR (2009) Interpopulation hybrid development in maize using modified reciprocal recurrent selection. *Thai Journal of Agricultural Science* 42 (3): 139–148.
- Kaeppler S (2012) Heterosis: many genes, many mechanisms – and the search for an undiscovered unifying theory. *ISRN Botany* 2012 (Article ID 682824): 1–12. DOI: 10.5402/2012/682824
- Lübberstedt T, Frei UK (2012) Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programs. *Plant Breed.* 131: 449–452. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2011.01948.x
- Mather K, Jinks JL (1985) *Biometrical Genetics*. Moscow: Mir. 463 p. [in Russian] (Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика. М.: Мир, 1985. 463 с.).
- Melchinger AE, Schipparck W, Würscum T et al. (2013) Rapid and accurate identification of *in-vivo* induced haploid seeds based on oil content in maize. *Sci. Rep.* 3: 1–5. DOI: 10.1038/srep02129
- Mikhailov ME (2010) A new possibility of dihaploid lines use: enriching-restoring breeding scheme. *Rus. J. Genet.* 46 (6): 758–764 [in Russian] (Михайлов М.Э. О новой возможности использования дигаплоидных линий: схема обогачительно-восстановительной селекции // Генетика. 2010. Т. 46, № 6. С. 853–860). DOI: 10.1134/S1022795410060177
- Mithila J, Hall JC (2007) Production of an auxinic herbicide-resistant microspore-derived doubled haploid wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) plant. *Crop Prot.* 26 (3): 357–362. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.07.017
- Murovec J, Bohanec B (2012) Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: IY Abdurakhmonov (ed.). *Plant breeding*. Rijeka, Croatia: Intech. p. 87–106. DOI: 10.5772/29982. Available from: <https://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monohaploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6: 213–215.
- Odiyo O, Njoroge K, Chemining'wa G, Beyenec Y (2014) Performance and adaptability of doubled haploid maize testcross hybrids under drought stress and non-stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* 4 (8): 150–158. DOI: 10.14303/irjas.2014.055
- Peng Z-B, Li MS., Liu X-Z, Li J-C (2007) Comparisons of three recurrent selection methods in the improvement of maize populations. *Agricultural Sciences in China* 6 (6): 657–664. DOI: 10.1016/S1671-2927(07)60097-2