

## КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ F1-ГИБРИДОВ ЯРОВОГО РАПСА НА ОСНОВЕ ЦМС

А.В. ВИШНЯКОВА<sup>1</sup>, Г.Ю. ГАУС<sup>1</sup>, А.А. АЛЕКСАНДРОВА<sup>1</sup>,  
Г.Ф. МОНАХОС<sup>2</sup>, С.Г. МОНАХОС<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;  
<sup>2</sup>ОО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»)

*Создание гетерозисных F1-гибридов ярового рапса является наиболее эффективным подходом к решению проблемы повышения продуктивности рапса, также обеспечивает более эффективный возврат средств в селекцию. Ускоренное создание гетерозисных гибридов обеспечивается комплексом современных биотехнологических и молекулярно-генетических методов. Для осуществления контроля гибридизации при промышленном производстве семян F1-гибридов и дополнительной защиты авторских прав селекционера используют цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС). Быстро определить тип ЦМС, выделить линии – восстановители и закрепители стерильности – позволяют молекулярно-генетические маркеры. В комбинации с производством удвоенных гаплоидов и использованием защищенного грунта для создания материнских линий интенсивность и скорость селекционного процесса можно увеличить в 2–3 раза.*

*В данной работе мы провели генотипирование образцов ярового рапса зарубежной селекции с использованием молекулярно-генетического маркера ORF138 на тип цитоплазмы Oigira и разделили коллекцию на две группы по наличию и отсутствию маркера. Фертильные линии удвоенных гаплоидов (ЛУГ), произведенные из образца с цитоплазмой Oigira, определили для использования в качестве восстановители фертильности, а ЛУГ из образца с иной цитоплазмой – в качестве закрепителя стерильности для создания материнских мужских стерильных линий на основе ЦМС Oigira.*

*Линии удвоенных гаплоидов оценили в полевом испытании по основным хозяйственно-ценным признакам, 30 отцовских линий восстановителей и 4 ранее созданных мужских стерильных линий были вовлечены в гибридизацию для создания гибридов и оценки комбинационная способности линий. В результате по комплексу признаков и свойств были выделено 3 фертильные линии Дж30, Дж26, Дж24 и Ки1мс для селекции гетерозисных гибридов на основе ЦМС Oigira и 5 перспективных гибридных комбинаций для станционного испытания.*

**Ключевые слова:** рапс яровой, линии удвоенных гаплоидов, ускоренная селекция, обшая комбинационная способность, продуктивность, ЦМС Oigira, молекулярный маркер.

### Введение

Создание гетерозисных F1-гибридов ярового рапса является наиболее эффективным подходом к решению проблемы повышения продуктивности рапса и основным направлением селекции во всем мире [18]. Brandt et al. сообщают, что урожайность семян F1-гибридов рапса примерно на 30% выше, чем урожайность сортов [12]. В России площади под яровым рапсом в 2023 г., по данным Ассоциации производителей и переработчиков рапса [10], составили 1582 тыс. га, что говорит о большой потребности в семенном материале данной культуры. В производстве востребованы гетерозисные гибриды зарубежной селекции, доля которых составляет более 50% [4], а также сорта российской селекции [5]. Ведущими научными учреждениями, выполняющими селекционные программы по рапсу в России, являются ФНЦ ФНИИМК

им. В.С. Пустовойта, Липецкий НИИ рапса (филиал ФНЦ ФНИИМК) и ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

Селекционные программы по созданию сортов рапса в России были начаты в 70-е гг. и успешно реализуются в настоящее время, в то время как программы по созданию гетерозисных F1-гибридов получили развитие только в последние годы [7]. Создание конкурентоспособных F1-гибридов связано с необходимостью внедрения современного инструментария: климатических камер, генетических платформ, молекулярно-генетических маркеров, биотехнологических методов создания исходного материала, что требует дополнительных инвестиций в селекцию [5]. При внедрении подобных инноваций скорость селекционного процесса возрастает за счет сокращения срока производства родительских линий и возможности целенаправленного подбора генотипов с использованием молекулярно-генетических маркеров.

Использование молекулярно-генетических маркеров при оценке исходного материала дает возможность быстро определить генотип растения, не прибегая к анализирующим скрещиваниям в течение нескольких лет [8], и определить потенциальные отцовские и материнские линии при создании гибрида на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Использование ЦМС позволяет проводить контролируемую гибридизацию отцовских и материнских линий, что упрощает процесс семеноводства и создает дополнительную защиту авторских прав селекционера [1].

Для сокращения срока создания родительских линий в гетерозисной селекции рапса широко используются гаплоидные технологии [9, 17]. Оценка селекционной ценности и отбор линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) являются важной селекционной задачей. При оценке селекционной ценности линий удвоенных гаплоидов используют следующие подходы: оценка ЛУГ по урожайности или продуктивности и содержанию масла в семенах и качеству масла [2], оценка комбинационной способности [9] и оценка по генетическим дистанциям (родству) [19]. Каждый из подходов имеет свои достоинства и недостатки, так как оценка только по хозяйственно-ценным признакам не дает представления о ценности линии как родителя F1-гибрида, но позволяет оценить семенную продуктивность линии, что важно при семеноводстве. Оценка комбинационной способности в полной диаллельной схеме скрещивания, несомненно, является наиболее информативной, но трудоемкой и невозможной, если нужно определить ценность материнских линий на основе ЦМС или большое число линий. Оценка селекционной ценности линий и их гибридных комбинаций на основе генетического родства, устанавливаемого с использованием молекулярных маркеров, равно как и геномная селекция рапса, на современном этапе развития селекции в России является пока нераспространенной.

В исследованиях использовался комплексный подход, заключающийся в определении типа цитоплазмы исходного материала, из которого получаем линии удвоенных гаплоидов в первичном отборе ЛУГ по хозяйственно-ценным признакам и дальнейшую оценку комбинационной способности при скрещивании двух групп генотипов. Такой подход позволяет определить потенциальные отцовские и материнские формы, произвести выбраковку линий с низкой семенной продуктивностью и определить ценность линии по комбинационной способности.

**Цель исследований:** оценить эффективность комплексного подхода создания гетерозисных F1-гибридов ярового рапса при молекулярно-генетической оценке исходной генетической коллекции для создания линий удвоенных гаплоидов и последующей оценке их селекционной ценности в полевом испытании, при проведении анализа хозяйственно-ценных признаков и общей комбинационной способности.

Для достижения цели необходимо оценить генотипы исходных растений на наличие цитоплазматических генов мужской стерильности и определить потенциальные

доноры генов – восстановителей и закрепителей – мужской стерильности. Следующим этапом является производство удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор и размножение удвоенных гаплоидов. Затем линии удвоенных гаплоидов оценивали в полевых испытаниях по хозяйственно-ценным признакам, после чего проводится анализ общей комбинационной способности и устанавливаются взаимосвязи между признаками.

### Материал и методы исследований

Растительный материал представлен генетической коллекцией образцов ярового рапса (*B. napus* L.) зарубежного происхождения от ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»: Вигг, СРХгг, Когг, Цегг, Клгг, Кагг, ИНВ300гг, ИНВ210гг, Джгг, Магг.

ДНК образцов выделяли СТАВ-методом [15] с заморозкой жидким азотом. Генотипирование коллекции образцов рапса на тип цитоплазмы *Ogura* проводили с использованием маркера ORF138. ПЦР проводили в объеме 10 мкл, в состав реакционной смеси входили: 1 мкл ДНК-матрицы; по 0,4 мкл каждого праймера; 1 мкл 10-кратного ПЦР-буфера с  $MgCl_2$ ; 0,4 мкл раствора нуклеотидов (dNTP); 0,1 мкл Taq-полимеразы; 6,8 мкл дистиллированной воды. Амплификацию проводили BioRad T100 Thermal Cycler («BioRad», США). Визуализацию результатов ПЦР осуществляли с помощью системы гель-документации «ChemiDoc XRS+» («BioRad», США) после разделения продуктов амплификации с добавлением красителя GelRed в 1,2%-ном агарозном геле в 0,5×TBE-буфере. Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярного размера «DNA Ladder 100+ bp» (ЗАО Евrogen, Россия).

Линии удвоенных гаплоидов из образцов рапса Джгг и Магг были произведены в культуре изолированных микроспор [3]. После пересадки в грунт растения выращивали в кассетах с объемом ячеек 80 см<sup>3</sup> в защищенном грунте, анализировали их плоидность на поточном цитометре Sysmex CyFlow Cube 8, после чего удвоенные гаплоиды пересаживали в 3-литровые горшки, в которых растения доводили до цветения и путем принудительного самоопыления получали семена.

Полевые испытания 78 фертильных линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) и их гибридных комбинаций проводили в 2022–2023 гг. на территории ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в г. Москве. Для оценки комбинационной способности были проведены скрещивания двух групп генотипов 30 ЛУГ из Джгг и мужскистерильных линий Ма1мс, Ма2мс, Ма3мс, Ки1мс. В результате было получено 117 гибридных комбинаций. В качестве стандартов в испытании использовали F1 Джаз и F1 Ахат.

Испытания линий удвоенных гаплоидов и гибридных комбинаций на их основе проводили в однорядковых делянках методом рендомизированных повторений в двукратной повторности. Посев семян производили в кассеты, наполненные торфяным субстратом, высадку рассады в поле осуществляли на 20-й день от появления всходов по схеме 15 × 50 см. Перед высадкой рассады производили внесение азофоски под фрезерование из расчета 200 кг/га. После высадки рассады проводили однократную обработку гербицидом Галера с нормой расхода 0,3 л, кг/га. Оценку хозяйственно-ценных признаков линий и гибридных комбинаций производили по методике госкомиссии по сортоиспытанию и охране селекционных достижений [6].

Статистический анализ данных проводили с использованием алгоритма однофакторного дисперсионного анализа. Фенотипическое разнообразие группы линий удвоенных гаплоидов определяли для основных хозяйственно-ценных признаков, используя такие параметры, как коэффициент вариации (cv) и размах

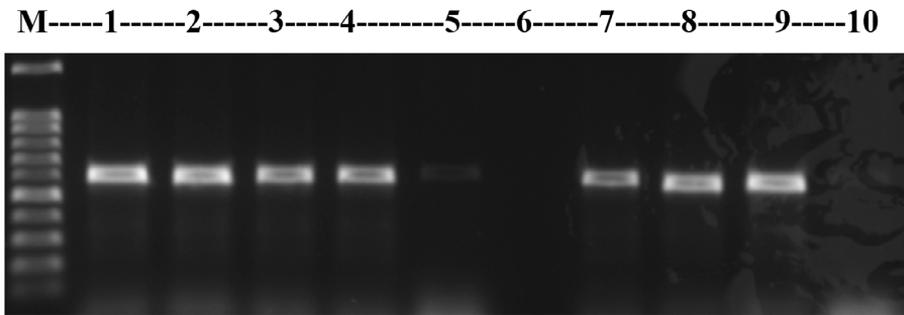
вариации ( $\lim_{\min}$ - $\lim_{\max}$ ). Для анализа взаимосвязей между признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ). Анализ общей комбинационной способности линий проводили по методу, отраженному в работе [11].

### Результаты и их обсуждение

Дифференциация генетической коллекции образцов ярового рапса была проведена с использованием молекулярного маркера ORF138 для идентификации системы ЦМС типа Oguга (рис. 1). Генотипы были подразделены на 2 группы с цитоплазмой Oguга и иным типом цитоплазмы. В дальнейшем генотипы с цитоплазмой Oguга были использованы для создания линий-восстановителей фертильности, а генотипы второй группы – как доноры признака закрепителя стерильности на генотипах с цитоплазмой Oguга.

Маркерные фрагменты цитоплазмы типа Oguга были обнаружены у генотипов Вигг, СРХгг, Когг, Цегг, ИНВ300гг, ИНВ210гг, Джгг (рис. 1). Генотипы Клгг, Кагг и Магг имели иной тип цитоплазмы.

Для производства популяций линий удвоенных гаплоидов были выбраны генотипы Джгг и Магг, различающиеся типами цитоплазмы в соответствии с данными молекулярно-генетического анализа. Генотипы отличались по отзывчивости микроспор к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор и частоте прорастания/регенерации эмбриоидов в проростки (табл. 1).



**Рис. 1.** Электрофореграмма результатов амплификации ДНК образцов рапса с праймерами Orf138-F1 и Orf138-R молекулярного маркера ЦМС типа Oguга: 1 – Вигг; 2 – СРХгг; 3 – Когг; 4 – Цегг; 5 – Клгг; 6 – Кагг; 7 – ИНВ300гг; 8 – ИНВ210гг; 9 – Джгг; 10 – Магг; М – маркер размеров

Таблица 1

#### Характеристика генотипов ярового рапса по частоте эмбриогенеза, прорастания/регенерации проростков и спонтанного удвоения числа хромосом и конечный выход линий удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор

Образец	Среднее число эмбриоидов, шт/100 бут.	Частота прорастания/регенерации эмбриоидов, %	Частота спонтанного удвоения хромосомного набора, %	Количество линий удвоенных гаплоидов, шт.
Джгг	1876±332	52,3	23	70
Магг	334±12	71,1	23,5	8

У образца Джгг было получено 70 фертильных удвоенных гаплоидов, что почти в 9 раз больше, чем у образца Магг. Это объясняется генотипспецифичностью и более высокой эмбриогенной отзывчивостью микроспор образца Джгг. Частота прорастания/регенерации эмбриоидов в проростки, частота спонтанного удвоения хромосомных наборов и завязываемость семян от самоопыления внесли меньший вклад в конечный выход линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) выбранных образцов.

Оценка проявления хозяйственно-ценных признаков, высоты растений, числа побегов первого порядка, длины стручка, продуктивности и массы 1000 семян выявила существенную разницу между изучаемыми линиями удвоенных гаплоидов как между популяциями, так и внутри популяций ЛУГ (табл. 2).

Средняя высота растения линий удвоенных гаплоидов, произведенных из Джгг, составляла 90 см, произведенных из F1 Магг – 71 см. Показатели линий достаточно сильно варьировали по средней высоте растения (табл. 2). Высоту существенно выше средней имели 30 ЛУГ, из них 11 линий превышали по высоте исходный образец Джгг; 3 ЛУГ из Магг имели высоту выше среднего, при этом линий выше Магг не было. Ориентироваться при выборе линии только на высоту растения нецелесообразно, так как отсутствуют сильные корреляции между высотой растения и другими хозяйственно-ценными признаками (табл. 3), а также устойчивость к полеганию ( $r = 0,3$ ). Высокой устойчивостью к полеганию отличались только 13% изученных линий удвоенных гаплоидов, которые не полегли при сильном ливне и продолжили расти вертикально ко времени уборки.

Среднее число побегов первого порядка у изучаемых ЛУГ варьировало от 4,5 до 9,0 шт/растение. Сильным ветвлением (больше 7 побегов на растении) отличались 28% изученных линий, слабым ветвлением (менее 5 побегов на растении) – 8% линий. Наблюдали корреляционную связь средней силы между числом побегов первого порядка и длиной стручка, слабые связи – между числом побегов первого порядка, продуктивностью и массой 1000 семян (табл. 3).

Таблица 2

**Характеристика проявления хозяйственно-ценных признаков популяций линий удвоенных гаплоидов, созданных на основе образцов Джгг и Магг**

Размах варьирования признаков		Наименование донорного образца/число ЛУГ, шт.	
		Джгг/70	Магг/8
Высота	Cv	14%	10%
	lim <sub>min</sub> -lim <sub>max</sub>	55–117	61–81
Число побегов первого порядка	Cv	16%	13%
	lim <sub>min</sub> -lim <sub>max</sub>	4,5–9,1	4,9–7,0
Длина стручка	Cv	12%	25%
	lim <sub>min</sub> -lim <sub>max</sub>	1,8–4,8	3,4–6,2
Продуктивность, семян с одного растения	Cv	84%	91%
	lim <sub>min</sub> -lim <sub>max</sub>	0,1–7,7	0,1–0,6
Масса 1000 семян	Cv	14%	36%
	lim <sub>min</sub> -lim <sub>max</sub>	3,1–5,7	1,1–5,6

**Линейные корреляционные связи  
между хозяйственно-ценными признаками ярового рапса**

Признак	Высота растения	Число побегов первого порядка	Продуктивность	Масса 1000 семян	Длина стручка
Число побегов первого порядка	-0,15*	–	–	–	–
Продуктивность	0,24*	0,29*	–	–	–
Масса 1000 семян	0,12	-0,32*	-0,13*	–	–
Длина стручка	-0,26*	0,41*	0,35*	-0,34*	–
Семян в стручке	-0,15*	0,25*	-0,41*	-0,41*	0,67*

\*Корреляция достоверна при уровне значимости  $P = 0,05$ .

Длина стручка у ЛУГ из Джгг варьировала от 1,8 до 4,8 см, у ЛУГ из Магг – от 3,4 до 6,2 см. Линии-удвоенные гаплоиды, полученные из Магг, отличались более длинными стручками, которые у отдельных генотипов достигали 5–6 см. Длина стручка достоверно связана с числом семян в стручке (табл. 3) и при этом имеет отрицательную линейную связь слабой силы с массой 1000 семян.

Продуктивность изученных ЛУГ сильно варьирует (табл. 2). Это связано как с инбредной депрессией растений при переводе генов в гомозиготное состояние, так и с такими признаками, как осыпаемость семян, что приводит к потерям урожая при уборке. Не наблюдали осыпания семян при уборке в полной спелости у 24 ЛУГ, произведенных из Джгг. Линии, произведенные из F1 Магг, были более подвержены осыпанию семян при уборке.

Признак массы 1000 семян участвует в формировании продуктивности и имеет среднюю вариацию среди ЛУГ, произведенных из F1 Джгг, и сильную вариацию среди линий, произведенных из F1 Магг (табл. 2). Отрицательные корреляционные связи слабой силы (табл. 2) наблюдали между массой 1000 семян и признаками числа побегов первого порядка, длины стручка и количества семян в стручке.

Оценку общей комбинационной способности (ОКС) проводили при скрещивании двух групп генотипов. В скрещивании участвовало 30 отцовских ЛУГ, полученных из Джгг, и 4 материнские мужскостерильные линии: Ки1мс, Ма1мс, Ма2мс, Ма3мс (табл. 4).

Эффект общей комбинационной способности ЛУГ значительно варьировал по признакам высоты растения, продуктивности растения и количества семян в стручке (табл. 4). Высокий положительный эффект ОКС по признаку «Высота растения» был достигнут у линий Дж18, Дж22, Дж24, Дж28, Дж9. Высокий отрицательный эффект ОКС показали линии Дж29, Дж27, Дж1, Дж12, Дж19, которые рекомендуется использовать в качестве отцовских при необходимости создания низкорослых F1-гибридов. Высоким эффектом ОКС по продуктивности отличались 16 линий: Дж25, Дж24, Дж21, Дж17, Дж13, Дж30, Дж26, Дж23, Дж20, Дж10, Дж14, Дж18, Дж9, Дж28, Дж5, Дж29. Данные линии рекомендуется использовать в качестве отцовских при селекции на повышение продуктивности. Линии, оказавшие низкий эффект ОКС по продуктивности Дж16, Дж1, Дж12, предпочтительно исключить из дальнейшего селекционного процесса. Высокий эффект ОКС по признаку «Количество семян в стручке» оказали отцовская линия Дж20 и материнская линия Ки1мс. Низкий эффект ОКС по данному признаку характерен для линий Дж22, Дж15, Дж8, Дж16.

**Общая комбинационная способность родительских линий  
по основным хозяйственно-ценным признакам**

Название линии	Эффект ОКС по признаку					
	число побегов первого порядка, шт.	высота растения, см	масса 1000 семян, г	продуктивность, г/раст.	длина стручка, см	число семян в стручке, шт.
Дж1	-0,61	-7,06	0,10	-2,36	0,30	1,17
Дж2	-1,02	-3,90	-0,11	-0,86	0,23	-0,61
Дж4	-0,14	-3,25	0,00	-0,03	0,18	-0,37
Дж5	0,20	-1,85	-0,08	0,08	0,17	0,21
Дж6	-0,23	-2,51	0,16	-1,58	0,15	0,48
Дж8	0,44	3,20	0,29	-1,67	0,15	-4,15
Дж9	-0,13	7,45	0,02	0,31	0,13	1,06
Дж10	0,41	4,59	0,00	0,63	0,12	1,96
Дж11	-0,05	2,37	-0,01	-1,12	0,12	0,73
Дж12	0,01	-8,01	-0,32	-2,37	0,11	1,47
Дж13	0,24	2,56	0,13	1,55	0,07	-0,59
Дж14	0,41	-3,21	0,22	0,56	0,06	-1,09
Дж15	0,67	-0,37	0,18	-0,03	0,05	-2,73
Дж16	0,45	-3,23	0,03	-2,21	0,05	-5,06
Дж17	0,00	1,84	-0,04	1,62	0,03	1,70
Дж18	-0,60	9,73	0,01	0,38	0,03	0,54
Дж19	0,68	-11,37	-0,22	-1,38	0,03	1,52
Дж20	-0,17	-1,63	-0,29	0,92	-0,01	3,61
Дж21	0,17	-0,41	-0,30	1,93	-0,04	-0,43
Дж22	-0,16	7,40	-0,09	-0,29	-0,04	-2,27
Дж23	0,30	-0,78	-0,13	1,08	-0,05	-0,66
Дж24	-0,49	7,97	0,09	1,94	-0,06	0,01
Дж25	0,15	3,91	0,12	2,66	-0,07	-0,05
Дж26	0,18	-2,25	0,21	1,20	-0,14	0,48

Дж27	0,12	-5,80	0,10	-0,58	-0,14	1,51
Дж28	-0,57	8,33	0,04	0,24	-0,24	0,59
Дж29	-0,01	-5,73	-0,13	0,03	-0,25	1,41
Дж30	-0,05	3,74	0,13	1,50	-0,25	1,56
Дж31	0,45	0,73	-0,28	-1,23	-0,28	-0,94
Дж32	-0,63	0,40	0,29	-0,05	-0,31	-1,33
Ки1мс	0,05	1,47	-0,35	2,02	0,14	2,02
Ма1мс	0,19	0,66	0,05	-1,80	0,05	-0,13
Ма2мс	-0,10	-0,71	0,10	-0,36	-0,17	-1,79
Ма3мс	-0,15	-1,55	0,22	0,13	-0,03	-0,17

Корреляционные связи между эффектом ОКС и проявлением признака ЛУГ выявлены для признаков «Высота растений» (сильная положительная корреляционная связь,  $r = 0,9$ ) и «Число побегов первого порядка» (положительная корреляционная связь средней силы,  $r = 0,5$ ). По признакам «Высота растения» и «Число побегов первого порядка» возможен отбор линий с высокой комбинационной способностью при испытании линий на хозяйственно-ценные признаки.

Семенная продуктивность растений – один из ключевых признаков для выбора перспективных гибридных комбинаций и их стационарного испытания. В таблице 5 представлена средняя продуктивность 117 гибридных комбинаций ярового рапса, произведенных на основе гибридизации фертильных ЛУГ и мужскистерильных линий Ки1мс, Ма3мс, Ма2мс, Ма1мс. Средняя продуктивность стандартов F1 Джаз и F1 Ахат составила 17,7 и 18,7 г/растение соответственно.

Продуктивность гибридных комбинаций варьировала от 4,5 г/раст. у Ма1мс×Дж16 до 18,7 г/раст. у Ки1мс×Дж21 (табл. 5). Гибридных комбинаций, значимо превышающих по продуктивности F1 Джаз и F1 Ахат, не было. Продуктивностью на уровне стандарта F1 Джаз обладала 41 гибридная комбинация, на уровне F1 Ахат – 63 гибридные комбинации.

У лучших гибридных комбинаций и стандартов в биохимической лаборатории были оценены масличность семян, содержание эруковой кислоты и содержание глюкозинолатов (табл. 6).

В наших условиях содержание масла в семенах у стандартов F1 Джаз и F1 Ахат составляло 36,3 и 45,1% соответственно. Масличность испытываемых гибридных комбинаций варьировала от 36,8 до 39,0%, что ниже, чем у F1 Ахата, но на уровне F1 Джаз. Содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов у всех гибридных комбинаций и стандартов находилось в пределах допустимых значений для рапса пищевого назначения типа «00».

Надежность маркера Orf138 для определения цитоплазмы типа *Ogura* у разных видов *Brassica*, включая рапс, показана в работах ряда исследователей [8, 14, 16]. В наших исследованиях данный маркер позволил дифференцировать коллекцию образцов ярового рапса по типу цитоплазмы *Ogura* и подразделить их на группы.

Таблица 5

## Семенная продуктивность гибридных комбинаций ярового рапса, г/растение

Материнские линии Отцовские линии	Ки1мс	Ма3мс	Ма2мс	Ма1мс
Дж25	14,4	13,3	14,9	11,5
Дж24	17,4	–	7,8	13,3
Дж21	18,7	13,4	8,2	10,9
Дж17	12,3	13,5	12,8	11,4
Дж13	15,2	12,6	9,7	12,2
Дж30	14,6	5,9	–	16,6
Дж26	14,2	15,0	12,8	6,4
Дж23	15,3	14,5	9,4	8,6
Дж20	11,9	11,9	13,1	10,3
Дж10	12,3	11,9	10,8	11,1
Дж14	16,4	8,6	11,3	9,5
Дж18	12,4	13,2	12,7	6,8
Дж9	12,6	11,9	11,9	8,4
Дж28	17,6	12,9	8,0	6,0
Дж5	14,3	10,7	11,4	7,4
Дж29	15,5	7,9	11,2	9,1
Дж15	15,5	–	9,6	7,4
Дж4	12,0	13,2	11,3	6,8
Дж32	11,9	7,2	11,7	12,6
Дж22	15,0	8,5	10,8	8,1
Дж27	9,4	12,8	11,0	8,0
Дж2	6,8	14,0	11,9	7,4
Дж11	14,7	6,4	11,1	6,9
Дж31	12,2	6,5	8,0	11,9
Дж19	7,4	8,6	10,3	11,6
Дж6	8,9	9,8	11,5	7,0
Дж8	10,4	10,9	7,6	7,9
Дж16	11,5	9,4	9,2	4,5
Дж1	6,7	14,4	8,1	4,9
Дж12	9,5	9,4	7,2	8,0

Примечание. НСР = 6,7 г/раст.

**Характеристика лучших гибридных комбинаций и стандартов  
F1 Джаз и F1 Ахат по семенной продуктивности, содержанию масла в семенах,  
содержанию эруковой кислоты и глюкозинолатов**

Гибридная комбинация	Продуктивность, г/раст.	Содержание масла в семенах, %	Содержание эруковой кислоты, %	Содержание глюкозинолатов, мкм/г
Ки1мс×Дж21	18,7 а	37,0 а	0,174	8,15
Ки1мс×Дж28	17,6 а	39,0 ab	0,426	6,98
Ки1мс×Дж24	17,4 а	36,8 а	0,338	11,55
Ма1мс×Дж30	16,6 а	37,0 а	0,508	5,79
Ки1мс×Дж14	16,4 а	37,0 а	0,286	9,37
F1 Ахат	17,7 а	45,1 b	0,362	8,18
F1 Джаз	18,8 а	36,3 а	0,405	7,33

**Примечание.** Значения в столбце, отмеченные одинаковыми строчными буквами (а, b), согласно t-критерию Стьюдента не имеют существенного различия на 5%-ном уровне значимости ( $P \leq 0.05$ ).

Количество произведенных линий удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор зависит в первую очередь от генотипа растения донора микроспор [13], такую же тенденцию наблюдали в наших исследованиях. Эмбриогенная компетентность микроспор у Джгг ( $1876 \pm 332$  эмбриоидов/100 бутонов) была почти в 6 раз выше, чем у Магг ( $334 \pm 12$  эмбриоидов/100 бутонов). При этом частота прорастания/регенерации эмбриоидов в проростки была выше у Магг (71% против 52% у Джгг), в результате чего было произведено 8 фертильных ЛУГ из Магг и 70 фертильных ЛУГ из Джгг.

Полевые испытания линий удвоенных гаплоидов ярового рапса по хозяйственно-ценным признакам проводили Бочкарева и др. [2]. В результате испытаний исследователями из 200 ЛУГ было выбрано 9 для включения в дальнейший селекционный процесс с целью создания сортов и гибридов [2], при этом оценку комбинационной способности линий не проводили. Исследователи [9, 19] предпочитают проводить оценку комбинационной способности линий в полной диаллельной схеме скрещиваний, что оправдано при создании двухлинейных гибридов и дает больше информации о вкладе генетических эффектов линий. При создании трехлинейных гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности, на наш взгляд, более целесообразной является оценка комбинационной способности линий при скрещивании двух групп генотипов. В результате комплексной оценки линий по хозяйственно-ценным признакам и комбинационной способности нами были выделены 3 отцовские линии и 1 материнская мужскостерильная линия для включения в дальнейший селекционный процесс при создании гетерозисных гибридов на базе ЦМС.

Исследователи применяют разные подходы к отбору перспективных образцов: российские авторы [2, 9] используют урожайность как основной показатель для отбора ценных образцов; Xing et al. [19] ориентируются на продуктивность, Wolko et al. [18] – на связанные с урожайностью признакам массы 1000 семян, длины стручков,

количества стручков на растении. Нами для отбора перспективных образцов использовался показатель продуктивности. Оценка по продуктивности одного растения не позволяет в полной мере охарактеризовать ценность гибридной комбинации, но делает возможным сократить объем стационарного испытания. Для дальнейшего стационарного испытания нами было отобрано только 4,3% изученных гибридных комбинаций.

## Выводы

Реализованный комплексный подход к созданию и изучению генетической коллекции с использованием молекулярно-генетических маркеров, ДН-технологий, защищенного грунта для ускоренного размножения и создания стерильных аналогов линий удвоенных гаплоидов, отбор линий с высокой семенной продуктивностью по результатам полевых испытаний на малых делянках и оценка комбинационной способности лучших ЛУГ позволили в период с 2021 по 2023 гг. произвести 78 линий удвоенных гаплоидов ярового рапса, выделить селекционно-ценные, с высокой комбинационной способностью, экономически ценные признаки, а также выделить 5 перспективных гибридных комбинаций для расширенного стационарного сортоиспытания.

Показано, что использование одного тесно сцепленного с интересующим фенотипом молекулярного маркера на тип цитоплазмы *Ogura* достаточно, чтобы разделить коллекцию исходного селекционного материала на группы, в которых образцы с цитоплазмой *Ogura* использовали как доноры гена-восстановителя фертильности, а генотипы с иным типом цитоплазмы – как доноры закрепления стерильности типа *Ogura*.

Количество произведенных линий удвоенных гаплоидов (ЛУГ) в культуре изолированных микроспор зависело в первую очередь от генотипспецифичной эмбрионной компетентности микроспор: у высокоотзывчивого генотипа Джгг (1876±332 эмбриоидов/100 бутонов) было получено 70 ЛУГ, у среднеотзывчивого генотипа Магг (334±12 эмбриоидов/100 бутонов) – 8 ЛУГ.

Выбраковка линий с низкой семенной продуктивностью и высокой осыпаемостью семян при полевом испытании позволила существенно снизить число ЛУГ, вовлеченных в скрещивания для оценки комбинационной способности. После полевой оценки линий удвоенных гаплоидов для дальнейшей гибридизации было допущено только 40% изученных ЛУГ.

Тесные корреляционные связи между признаками линий и эффектом ОКС удалось установить для признаков «Высота растения» ( $r = 0,9$ ) и «Число побегов первого порядка» ( $r = 0,5$ ), что делает необходимым проведение гибридизации для оценки эффектов общей комбинационной способности по признакам «Продуктивность», «Масса 1000 семян», «Длина стручка».

Комплексом положительного эффекта ОКС по признакам продуктивности, массы 1000 семян, длины стручка, количества семян в стручке обладали линии Дж30, Дж26, Дж24. Кроме того, линия Дж26 оказала небольшой отрицательный эффект ОКС по высоте растения (–2,25 см), небольшой положительный эффект ОКС – по ветвистости (0,2 шт/раст.), что делает ее ценной в селекции для создания гетерозисных гибридов. Среди материнских линий по эффекту комбинационной способности по всем признакам выделилась только линия Ки1мс.

Линия Дж26 характеризуется высокой продуктивностью (6,1 г/раст.) и высокой массой 1000 семян (5,17 г). Высота линии составляла 83 см. Линии Дж30 и Дж24 имеют среднюю продуктивность на уровне 1 г с растения, массу 1000 семян 3,6 и 4,5 г соответственно, средняя высота растений достигает 88 и 103 см соответственно.

Для дальнейшего включения в селекционный процесс рекомендуются линии удвоенных гаплоидов Дж30, Дж26, Дж24 и линия Ки1мс.

В результате конкурсного испытания выделены 5 гибридных комбинаций. Их продуктивность находится на уровне стандартов F1 Джаз и F1 Ахат, масличность – выше стандарта F1 Джаз, низким является содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов, что позволяет отнести их к гибридам типа «00». Данные гибриды рекомендованы для стационарного испытания с перспективой передачи на государственное сортоиспытание.

*Благодарность.* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2022–745 от 13 мая 2022 г., заключенного по гранту МК-3440.2022.5.

### Библиографический список

1. Анисимова И.Н., Дубовская А.Г. Системы ЦМС у рапса и их использование в селекции отечественных гибридов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181, № 3. – С. 171–180. – DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-171-180.
2. Бочкарева Э.Б., Горлова Л.А., Сердюк В.В., Стрельников Е.А. Селекционная ценность дигаплоидных линий рапса ярового (*Brassica napus* L.) // Масличные культуры. – 2019. – № 4 (180). – С. 18–22. – DOI: 10.25230/2412-608X-2019-4-180-18-22.
3. Вишнякова А.В., Александрова А.А., Монахов С.Г. Факторы прямого прорастания микроспорогенных эмбриоидов *Brassica Napus* L // Известия ТСХА. – 2022. – № 6. – С. 43–53. – DOI: 10.26897/0021-342X-2022-6-43-53. – EDN BIFBSL.
4. Гончаров С.В., Долгих Л.А. Переформатирование рынка семян рапса в СНГ за последние 30 лет // Актуальные проблемы агрономии современной России и пути их решения. – 2018. – С. 113–120.
5. Гончаров С.В., Горлова Л.А. Масличные культуры: новые вызовы и тенденции их развития // Масличные культуры. – 2018. – № 2 (174). – С. 96–100. – DOI: 10.25230/2412-608X-2018-2-174-96-100.
6. Головачев В.И. Методика сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – Москва: Калининская областная типография управления издательств типографии и книжной торговли Калининского облисполкома, 1983. – 184 с.
7. Горлова Л.А., Бочкарева Э.Б., Стрельников Е.А., Сердюк В.В. Использование классических и современных методов в селекции рапса (*Brassica napus*) во ВНИИМК // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 180, № 4. – С. 126–131. – DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-126-131.
8. Домблидес Е.А., Домблидес А.С., Заячковская Т.В., Бондарева Л.Л. Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (*Brassicaceae* Burnett) с помощью ДНК маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 5. – С. 529–537. <https://doi.org/10.18699/VJ15.069>.
9. Карпачев В.В., Пастухов И.О. Оценка комбинационной способности андроклиных линий ярового рапса в диаллельных скрещиваниях // Масличные культуры. – 2017. – № 1 (169). – С. 40–42.
10. РАСРАПС: Ассоциация производителей и переработчиков рапса. – URL: <https://rosraps.ru/ru/> (дата обращения: 12.10.2023).
11. Савченко В.К. Многоцелевой метод количественной оценки комбинационной способности в селекции на гетерозис // Генетика. – 1978. – Т. 5. – С. 793.
12. Brandt S.A., Malhi S.S., Ulrich D., Lafond G.P., Kutcher H.R., Johnston A.M. Seeding rate, fertilizer level and disease management effects on hybrid versus open pollinated canola (*Brassica napus* L.) // Canadian Journal of Plant Science. – 2007. – Т. 87, № 2. – С. 255–266. – DOI: 10.4141/P05-223.

13. Corral-Martínez P., Camacho-Fernandez C., Mir R., Seguí J.M. Simarro Doubled haploid production in high-and low-response genotypes of rapeseed (*Brassica napus*) through isolated microspore culture // Doubled haploid technology. – Humana: New York, NY, 2021. – C. 129–144.

14. Grelon M., Budar F., Bonhomme S., Pelletier G. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids // Molecular and General Genetics MGG. – 1994. – T. 243. – C. 540–547.

15. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic acids research. – 1980. – T. 8, № 19. – C. 4321–4326.

16. Singh S., Bhatia R., Kumar R., Behera T.K., Kumari K., Pramanik A., Ghemera H., Sharma K., Bhattacharya R.C., Dey S.S. Elucidating mitochondrial DNA markers of Ogura-based CMS lines in Indian cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) and their floral abnormalities due to diversity in cytonuclear interactions // Frontiers in Plant Science. – 2021. – T. 12. – C. 631489. – DOI: 10.3389/fpls.2021.631489.

17. Rahman M., de Jiménez M.M. Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus*: A review // J. Plant Sci. Mol. Breed. – 2016. – T. 5, № 1. – DOI: 10.7243/2050-2389-5-1.

18. Wolko J., Dobrzycka A., Bocianowski J., Bartkowiak-Broda I. Estimation of heterosis for yield-related traits for single cross and three-way cross hybrids of oil-seed rape (*Brassica napus* L.) // Euphytica. – 2019. – T. 215, № 10. – C. 156. – DOI: 10.1007/s10681-019-2482-6.

19. Xing N., Fan C., Zhou Y. Parental selection of hybrid breeding based on maternal and paternal inheritance of traits in rapeseed (*Brassica napus* L.) // PLoS One. – 2014. – T. 9, № 7. – C. e103165. – DOI: 10.1371/journal.pone.0103165.

## INTEGRATED APPROACH FOR ACCELERATED BREEDING OF SPRING RAPESEED F1-HYBRIDS BASED ON CMS

A.V. VISHNYAKOVA<sup>1</sup>, G.U. GAUS<sup>1</sup>, A.A. ALEKSANDROVA<sup>1</sup>,  
G.F. MONAKHOS<sup>2</sup>, S.G. MONAKHOS<sup>1</sup>,

(<sup>1</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,

<sup>2</sup>B reeding station named after N.N. Timofeev)

*The breeding of F1-hybrids of spring rapeseed is the most effective approach to solving the problem of increasing rapeseed yield, as well as provides a more effective return on investment in breeding. Accelerated breeding of heterosis hybrids is provided by a complex of modern biotechnological and molecular-genetic methods. Cytoplasmic male sterility (CMS) is used to control hybridization in the industrial production of F1-hybrid seeds and for additional copyright protection. Molecular-genetic markers allow rapid determination of the type of CMS and differentiation between the lines of fertility restorers and sterility maintainers. By combining double haploid production and indoor planting for the development of maternal lines, the intensity of the breeding process can be increased by 2–3 times.*

*In this research, we have genotyped a germplasm collection of foreign spring rape using the molecular marker ORF138 for the Ogura cytoplasm and divided the collection into two groups according to the presence or absence of the marker. Subsequently, doubled haploid lines (DHL) produced from a sample with Ogura cytoplasm were used as fertility restorer lines, and DHL*

from hybrids with a non-Ogura cytoplasm were used to develop female male sterile lines based on Ogura-CMC.

The doubled haploid lines were evaluated in the field for the main economically valuable traits, and 30 fertility restorer lines and four male-sterile lines were hybridized to assess their combining ability. As a result, four DH lines J30, J26, J24 and Ki1ms were selected for future breeding of heterosis hybrids based on Ogura-CMC and five promising spring rapeseed hybrids were identified according to the complex of traits and properties.

**Key words:** spring rapeseed, doubled haploid line, accelerated breeding, general combining ability, seed productivity, CMS Ogura, molecular marker

## References

1. Anisimova I.N., Dubovskaya A.G. CMS systems in rapeseed and their use in the breeding of domestic hybrids. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 2020;181(3):171–180. (In Russ.) <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-171-180>
2. Bochkaryova E.B., Gorlova L.A., Serdyuk V.V., Strelnikov E.A. Breeding value of dihaploid lines of spring rape (*Brassica napus* L.). *Oil Crops*. 2019;4 (180):18–22. (In Russ.) <https://doi.org/10.25230/2412-608X-2019-4-180-18-22>
3. Vishnyakova A.V., Aleksandrova A.A., Monakhos S.G. Factors of direct germination of microspore derived embryos of *Brassica napus* L. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2022;1(6):43–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-6-43-53>
4. Goncharov S.V., Dolgikh L.A. Reformatting the CIS rapeseed seed market over the last 30 years. *Aktual'nye problemy agronomii sovremennoy Rossii i puti ikh resheniya*. 2018:113–120. (In Russ.)
5. Goncharov S.V., Gorlova L.A. Oil crops: new challenges and trends in their development. *Oil Crops*. 2018;2(174):96–100. (In Russ.) <https://doi.org/10.25230/2412-608KH-2018-2-174-96-100>
6. Golovachev V.I. Methods of varietal testing of agricultural crops. Moscow: Kalininskaya oblastnaya tipografiya upravleniya izdatel'stv tipografii i knizhnoy trgovli Kalininskogo oblispolkoma, 1983:184. (In Russ.)
7. Gorlova L.A., Bochkaryova E.B., Strelnikov E.A., Serdyuk V.V. The use of classical and modern methods in rapeseed (*Brassica napus*) breeding at VNIIMK. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2020;180(4):126–131. (In Russ.) <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-4-126-131>
8. Domblides E.A., Domblides A.S., Zayachkovskaya T.V., Bondareva L.L. Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (*Brassicaceae* Burnett) with DNA markers. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(5):529–537. (In Russ.) <https://doi.org/10.18699/VJ15.069>
9. Karpachev V.V., Pastukhov I.O. Estimation of combining ability of androcline lines of spring rape in diallel crosses. *Oil Crops*. 2017;1(169):40–42. (In Russ.)
10. RASRAPs: Association of Rapeseed Producers and Processors. (In Russ.) URL: <https://rosraps.ru/ru/> (Access date: 12.10.2023)
11. Savchenko V.K. Multipurpose method of quantitative evaluation of combining ability in selection for heterosis. *Russian Journal of Genetics*. 1978;5:793. (In Russ.)
12. Brandt S.A. et al. Seeding rate, fertilizer level and disease management effects on hybrid versus open pollinated canola (*Brassica napus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. 2007;87(2):255–266. <https://doi.org/10.4141/P05-223>
13. Corral-Martínez P., Camacho-Fernández C., Mir R., Seguí-Simarro J.M. Doubled haploid production in high- and low-response genotypes of rapeseed (*Brassica*

napus) through isolated microspore culture. *Doubled haploid technology*. Humana, New York, NY, 2021:129–144.

14. *Grelon M., Budar F., Bonhomme S., Pelletier G.* Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. *Molecular and General Genetics MGG*. 1994;243:540–547.

15. *Murray M.G., Thompson W.F.* Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(19):4321–4326.

16. *Singh S., Bhatia R., Kumar R., Behera T.K., Kumari K., Pramanik A., Ghemera H., Sharma K., Bhattacharya R.C., Dey S.S.* Elucidating mitochondrial DNA markers of Ogura-based CMS lines in Indian cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) and their floral abnormalities due to diversity in cytonuclear interactions. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:631489. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.631489>

17. *Rahman M., de Jiménez M.M.* Behind the scenes of microspore-based double haploid development in Brassica napus: A review. *J. Plant Sci. Mol. Breed.* 2016;5(1). <https://doi.org/10.7243/2050-2389-5-1>

18. *Wolko J., Dobrzycka A., Bocianowski J., Bartkowiak-Broda I.* Estimation of heterosis for yield-related traits for single cross and three-way cross hybrids of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Euphytica*. 2019;215(10):156. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2482-6>

19. *Xing N., Fan C., Zhou Y.* Parental selection of hybrid breeding based on maternal and paternal inheritance of traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). *PLoS One*. 2014; 9(7): e103165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103165>

**Вишнякова Анастасия Васильевна**, канд. с.-х. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: 8 (499) 976–41–71; e-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru

**Гаус Григорий Юрьевич**, магистрант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: 8 (964)599–21–95; e-mail: grisha.gaus@mail.ru

**Александрова Анастасия Алексеевна**, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: 8 (910)466–03–09; e-mail: a.alexandrova@rgau-msha.ru

**Монахос Григорий Федорович**, канд. с.-х. наук, генеральный директор ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, ул. Пасечная, 5; тел.: 8 (499) 977–11–74; e-mail: breedst@mail.ru

**Монахос Сократ Григорьевич**, д-р с.-х. наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: 8 (499) 976–41–71; e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru

**Anastasiya V. Vishnyakova, CSc(Ag)**, Associate Professor, Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: +7 (499) 976–41–71; E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru)

**Grigoriy Yu. Gaus**, MSc student, Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: +7 (964) 599–21–95; E-mail: grisha.gaus@mail.ru)

**Anastasiya A. Aleksandrova**, post-graduate student, Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: +7 (910) 466–03–09; E-mail: a.alexandrova@rgau-msha.ru)

**Grigoriy F. Monakhos**, CSc (Ag), Chief Executive Officer of the LLC “Breeding station named by N.N. Timofeev” (5, Pasechnaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: +7 (499) 977–11–74; E-mail: breedst@mail.ru)

**Sokrat G. Monakhos**, DSc (Ag), Professor, Head of the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: +7 (499) 976–41–71; E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru)