
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 575.113.633.15

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ АВТОНОМНОГО ЭМБРИО- И ЭНДОСПЕРМОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

© 2023 г. Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев¹, Ю. В. Красова¹, М. И. Чумаков¹, *

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр
“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 16.03.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 24.04.2023 г.

Проведена сравнительная оценка мутаций генов гиногенеза и партеногенеза у различных линий кукурузы саратовской селекции. В частности секвенированы гены, контролирующие гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) и взаимодействие мембран гамет (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*) у гаплоиндуцирующих (ЗМС-8, ЗМС-П) линий, и гены, предположительно связанные с автономным развитием эндосперма (*Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104* и *Zm_Fie1*) у партеногенетических (АТ-1, АТ-3, АТ-4) и обычных (КМ, ГПЛ-1) линий кукурузы саратовской селекции. С помощью методов биоинформатики проведено сравнение и выявлены изменения в нуклеотидных последовательностях исследованных генов у разных линий кукурузы. На основании данных секвенирования сделан вывод о возможности использования генов *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2* и *Zm_Fie1* для генотипирования линий и гибридов кукурузы.

Ключевые слова: гены гиногенеза и партеногенеза кукурузы, взаимодействие мембран гамет, мутации, генотипирование.

DOI: 10.31857/S0016675823090084, **EDN:** WURIET

Кукуруза (*Zea mays* L.) — одна из наиболее распространенных сельскохозяйственных культур, производство которой во втором десятилетии XXI в. в мире выросло более чем в полтора раза, а в России с 1985 по 2018 гг. сбор зерна увеличился в девять раз [1]. Саратовскими селекционерами начиная с 60–80-х гг. XX в. по настоящее время была создана уникальная коллекция линий кукурузы, включающая эффективные линии-гаплоиндукторы [2–5] и партеногенетические линии с элементами апомиксиса [6–10], которые охарактеризованы фенотипически и цитогенетически. Однако генетическая природа мутаций, возникших у гаплоиндуцирующих (ГИ) и партеногенетических (ПГ) линий саратовской селекции, пока неясна. Для разработки технологий выведения ГИ и ПГ линий кукурузы с улучшенными хозяйственно полезными признаками необходимы знания о генах, контролирующих механизмы спонтанного развития зародыша и эндосперма без оплодотворения.

К настоящему времени установлены некоторые гены (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3* и *Zm_Dmp7*), которые причастны к образованию гаплоидных растений в потомстве линий-гаплоиндукторов кукурузы и явлению гаплоиндукции (гиногенеза) [11]. Работа американских селекционеров по селекции

линий-ГИ у кукурузы более 60 лет назад увенчалась существенным успехом — была получена линия Stock 6, индуцирующая образование матроклинных гаплоидов в потомстве в десятки–сотни раз чаще, чем все остальные линии [12]. В ходе последующей селекции кукурузы на базе линии Stock 6 саратовским селекционерам удалось повысить эффективность ГИ с 2 до 8–10% [2, 4]. Линия-ГИ ЗМС-8 (частота ГИ — 8%) [3] является прямым потомком линии Stock 6 [13]. Линия-ГИ ЗМС-П (частота ГИ — 10%) была получена из потомства самоопыленных гибридов линии-ГИ ЗМС-8 (материнский родитель) и линии-ГИ КМС (Коричневый маркер саратовский) — отцовский родитель [5], в Саратовском национальном исследовательском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского (СГУ). Всего в мире к 2016 г. насчитывалось более 50 линий-ГИ, выведенных с участием линии Stock 6 [13].

Саратовскими селекционерами была получена линия кукурузы АТ-1 [6] и ее производные — линии АТ-3, АТ-4, АТТМ [10], у которых автономный (без опыления) эмбрио- и эндоспермогенез (матроклинный партеногенез) наблюдались с повышенной (6–50% и более) частотой. По данным литературы для кукурузы на молекулярно-генетическом уровне изучены некоторые гены, кото-

рые могли быть задействованы в процессе переключения с полового на апомиктический способ размножения. В частности, установлены гены, кодирующие хроматинмодифицирующие белки (ХМБ) кукурузы (*Chr106*, *Dmt102*, *Dmt103*, *Dmt105*, *Hdt104*, *Hon101*), подавление экспрессии которых коррелирует с признаками апомиксиса у гибридов кукурузы и трипсакума [11, 14].

Другой группой генов, контролирующих у кукурузы развитие эндосперма, являются гены *Fie*, сходные с генами группы *Polycomb Repressive Complex 2* (*PRC2*), регулируемыми ранние этапы в развитии дрозофилы и арабидопсиса [15]. *PRC2*, представляющий собой комплекс из белков (*FIS1/MEDEA/FIS2/MSI1*), осуществляет метилирование хроматина и может подавлять транскрипцию целевых генов [15]. В отличие от арабидопсиса, имеющего единственный ген *Fie*, у кукурузы обнаружено два *Fie*-гена (*Zm_Fie1* и *Zm_Fie2*), один из которых (*Zm_Fie2*), вероятно, является репрессором развития эндосперма [16–18].

В связи с этим возникает несколько проблем: 1) охарактеризовать уже известные гены гиногенеза и партеногенеза у образцов кукурузы саратовской селекции, используя молекулярно-генетические подходы, и использовать эти знания для развития современных технологий селекции; 2) понять природу повышенной ГИ и спонтанного (без опыления) начала развития зародыша и эндосперма у партеногенетических линий кукурузы из саратовской коллекции; 3) разработать экспресс-систему контроля генов, связанных с изменениями в развитии зародыша и эндосперма кукурузы; 4) генотипировать полученные и вновь создаваемые формы кукурузы.

Цель исследования – анализ мутаций генов, контролирующих гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*), взаимодействие мембран гамет (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*) и партеногенез (гены ХМФ и *Zm_Fie*) у линий кукурузы саратовской селекции ЗМС-П, ЗМС-8, АТ-1, АТ-3, АТ-4 и контрольных линий Коричневый маркер (КМ) и ГПЛ-1 саратовской селекции.

Для выявления мутаций мы секвенировали транскрипты вышеуказанных генов у линий кукурузы. РНК выделяли из замороженных тканей (пыльца, завязи) [19], получали кДНК согласно инструкции производителя ревертазы (Евроген, Россия). Участки кДНК исследуемых генов амплифицировали с использованием специфических праймеров (подобраны с помощью ресурса Primer-Blast) для перекрывающихся фрагментов последовательностей и набора реактивов “Tersus Plus PCR kit” (Кат. № РК121, Евроген, Россия). Затем ПЦР-продукты очищали при помощи набора Cleanup Mini (Кат. № BC023S, Евроген, Россия) и секвенировали в компаниях Евроген и Синтол (Россия). Нуклеотидные последователь-

ности генов кукурузы различных линий сравнивали друг с другом и с нуклеотидными последовательностями генов референсной линии В73 методом множественного выравнивания с использованием программы ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Нуклеотидные последовательности секвенированных генов кукурузы (*Zm_Gex2*, *Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104*, *Zm_Gcs1*, *Zm_Fie1*) представлены нами в базе данных GenBank (номера MN617022.2, OL649773.1, MW195549.1, MW441336.1, MW222955.1, OK557951.1, MW414032.1, MG029204.1, MW222954.1).

В нуклеотидных последовательностях гена *Zm_Pla1* линий ЗМС-П и ЗМС-8 обнаружены 15 однонуклеотидных замен (ОНЗ) и одна четырехнуклеотидная вставка (НВ) (табл. 1), по сравнению с нуклеотидной последовательностью гена *Zm_Pla1* референсной линии В73 [19]. У линии кукурузы Stock 6 вставка четырех нуклеотидов в четвертом экзоне гена *Pla1*, кодирующего белок фосфолипазу А, сдвигает рамку считывания, что приводит к замене 20 аминокислот, а также появлению стоп-кодона и укорочению белка [20]. Ген *Pla1*, содержащий вставку, унаследовало множество линий-гаплоиндукторов – производных Stock 6 [13], в том числе линии саратовской селекции ЗМС-П и ЗМС-8 (табл. 1).

В гене *Zm_CenH3* линии ЗМС-8 нуклеотидных замен не обнаружено, а в гене *Zm_CenH3* линии ЗМС-П обнаружена одна однонуклеотидная замена по сравнению с линией В73. В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Gex2* линий ЗМС-П, ЗМС-8, КМ обнаружены 35, 43 и 37 ОНЗ, соответственно, и одна девятинуклеотидная вставка по сравнению с последовательностью референсной линии В73 (табл. 1).

В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Dmp7* линии кукурузы ЗМС-8 обнаружено шесть ОНЗ, а у линии кукурузы ЗМС-П – пять ОНЗ и одна делеция из трех нуклеотидов, по сравнению с референсной линией В73. В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Gcs1* линии КМ обнаружено три ОНЗ, а у линии ЗМС-П – четыре ОНЗ (табл. 1).

У гена *Zm_Hdt104* партеногенетической линии АТ-4 не обнаружено изменений, а у линии АТ-3 присутствуют шесть ОНЗ. В последовательности гена *Zm_Chr106* линии АТ-3 обнаружены шесть ОНЗ. У гена *Zm_Fie1* линии АТ-1 показаны десять ОНЗ, у линии АТ-3 – 3 ОНЗ и делеция из шести нуклеотидов, а у линии АТ-4 – 12 ОНЗ (табл. 1).

Таким образом, в нуклеотидных последовательностях генов *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2*, *Zm_Fie1* кукурузы наблюдается полиморфизм, который может быть использован в целях генотипирования линий и гибридов кукурузы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00101).

Таблица 1. Анализ мутаций у генов автономного эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы саратовской селекции

Ген	Линии кукурузы						
	ЗМС-П	ЗМС-8	КМ	ГПЛ-1	АТ-1	АТ-3	АТ-4
<i>Gex2</i>	35 ОНЗ, 1 НВ (9 Н)	43 ОНЗ, 2 НВ	37 ОНЗ	—	—	—	—
<i>Gcs1</i>	4 ОНЗ	—	3 ОНЗ	1 ОНЗ	—	—	—
<i>Pla1</i>	15 ОНЗ, 1 НВ (4 Н)	15 ОНЗ, 1 НВ (4 Н)	—	—	—	—	—
<i>Dmp7</i>	5 ОНЗ, 1 делеция ЗН	6 ОНЗ	—	—	—	—	—
<i>CenH3</i>	1 ОНЗ	Нет ОНЗ	—	—	—	—	—
<i>Chr106</i>	—	—	—	—	—	6 ОНЗ	—
<i>Hdt104</i>	—	—	—	—	—	6 ОНЗ	Нет мутаций
<i>Fie1</i>	—	—	—	—	10 ОНЗ	3 ОНЗ, делеция 6Н	12 ОНЗ

Примечание. ОНЗ — однонуклеотидная замена, Н — нуклеотид, НВ — нуклеотидная вставка, (—) — не определяли.

Авторы признательны Р.В. Долгополову за участие в работе по выравниванию нуклеотидных последовательностей генов *Zm_Dmp7* и *Zm_CenH3*, а также Ю.В. Смолькиной, О.В. Гуторовой за предоставленные семена и пыльцу кукурузы.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чумаков М.И., Гусев Ю.С., Богатырева Н.В., Соколов А.Ю. Оценка рисков распространения генетически модифицированной кукурузы с пылью при выращивании с нетрансформированными сортами (обзор) // С-хоз. биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 426–445. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.426rus>
2. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов кукурузы // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. С. 735–738.
3. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // Reprod. Biol. and Plant Breeding. XIII EUCARPIA Congr. L 1992. P. 221–222.
4. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. АН СССР. 1997. Т. 353. С. 405–407.
5. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2016. Т. 18. № 2. С. 341–344.
6. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
7. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn // Maize Genet. Cooperation Newsletter. 1997. V. 71. P. 74–75.
8. Апанасова Н.В., Тумовец В.В. Цитозембриологическое изучение проявления апомиксиса у кукурузы линии АТ-3 после опыления // Бюлл. ботан. сада Саратовского гос. ун-та. 2003. № 2. С. 194–197.
9. Kolesova A.Y., Tyrnov V.S. Embryological peculiarities of tetraploid parthenogenetic maize forms // Maize Genet. Cooperation Newsletter. 2012. V. 85. P. 65–66.
10. Апанасова Н.В., Гуторова О.В., Юдакова О.И., Смолькина Ю.В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2017. Т. 19. № 2 (2). С. 216–219.
11. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397. <https://doi.org/10.31857/S001667582204004X>
12. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // Am. Naturalist. 1959. V. 59. P. 381–382. <https://doi.org/10.1086/282098>
13. Hu H., Schrag T.A., Peis R. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // Genetics. 2016. V. 202. P. 1267–1276. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184234>
14. Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes // The Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3249–3267. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072181>
15. Mozgova I., Kohler C., Hennig L. Keeping the gate closed: Functions of the polycomb repressive complex PRC2 in development // The Plant J. 2015. V. 83. P. 121–132. <https://doi.org/10.1111/tpj.12828>
16. Danilevskaya O.N., Hermon P., Hantke S. et al. Duplicated *fie* genes in maize: Expression pattern and imprinting suggest distinct functions // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 425–438. <https://doi.org/10.1105/tpc.006759>

17. Hermon P., Srilunchang K., Zou J. et al. Activation of the imprinted *Polycomb* group *Fie1* gene in maize endosperm requires demethylation of the maternal allele // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 64. P. 387–395. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9160-0>
18. Li S., Zhou B., Peng X. et al. *OsFie2* plays an essential role in the regulation of rice vegetative and reproductive development // *New Phytol.* 2014. V. 201. P. 66–79. <https://doi.org/10.1111/nph.12472>
19. Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуморова О.В., Чумаков М.И. Анализ генов *Hap2/Gcs1*, *Gex2* у линий кукурузы саратовской селекции // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 3. С. 327–335. <https://doi.org/10.31857/S0016675823030098>
20. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J.* 2017. <https://doi.org/10.15252/embj.201796603>

Analysis of Mutations of the Maize Genes of Autonomous Embryo-, Endospermogenesis

E. M. Moiseeva^a, V. V. Fadeev^a, Yu. V. Krasova^a, and M. I. Chumakov^a, *

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center “Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The gynogenesis and parthenogenesis genes in Saratov maize lines was evaluated. In particular, the (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*, *Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) genes in haploid-inducing (ZMS-8, ZMSP) and (*Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104* and *Zm_Fie1*) genes in parthenogenetic (AT-1, AT-3, AT-4) and ordinary (KM, GPL-1) maize lines were sequenced. Using bioinformatic methods, gene sequences were compared in different maize lines and changes in nucleotide sequences were revealed. We suppose that it is possible to use *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2*, and *Zm_Fie1* genes for maize line genotyping.

Keywords: maize gynogenesis and parthenogenesis genes, mutations, genotyping.