

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *HAP2/GCS1*, *GEX2* У ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ САРАТОВСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

© 2023 г. Е. М. Моисеева¹, Ю. С. Гусев^{1, 2}, О. В. Гуторова², М. И. Чумаков^{1, *}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 20.07.2022 г.

Принята к публикации 25.07.2022 г.

Исследование явления гаплоиндукции представляет научный и практический интерес в связи с разработкой эффективных методов получения гаплоидов, необходимых, в частности, для ускоренного создания гомозиготных линий. Обсуждается связь индукции образования гаплоидов у линии кукурузы саратовской селекции Зародышевый маркер саратовский пурпурный (ЗМСП) с генами *HAP2/GCS1* и *GEX2*, контролирующими адгезию и слияние мембран гамет у кукурузы. С помощью метода ПЦР-РВ установлено, что гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* экспрессируются не только в спермиях, но и в женских генеративных структурах кукурузы, но гаплоиндуцирующая способность кукурузы не коррелирует с уровнем их экспрессии. Было показано, что ген *GEX2* у гаплоиндуцирующей линии ЗМСП имеет 27 однонуклеотидных замен, вставку размером в девять нуклеотидов и одну двухнуклеотидную замену и соответственно десять аминокислотных замен и две вставки в белке *GEX2*, по сравнению с референсной линией В73. Эти замены, возможно, оказывают воздействие на конформацию белка и процесс взаимодействия мембран гамет. Более эволюционно консервативный белок *HAP2/GCS1*, обеспечивающий слияние мембран гамет кукурузы, у линии кукурузы ЗМСП имеет только одну аминокислотную замену, по сравнению с линиями Коричневый маркер и В73.

Ключевые слова: кукуруза, *Zea mays*, гены гиногенеза, экспрессия.

DOI: 10.31857/S0016675823030098, **EDN:** IPZWVS

У высших растений развитие семян начинается с двойного оплодотворения, открытого С.Г. Навашиным в 1898 г. [1]. После попадания пыльцы кукурузы на рыльце вегетативная клетка пыльцевого зерна образует пыльцевую трубку, с помощью которой два спермия доставляются к зародышевому мешку. Один спермий ($1n$) сливается с яйцеклеткой ($1n$), второй ($1n$) — с центральной клеткой ($2n$). Из оплодотворенной яйцеклетки развивается диплоидный зародыш. Центральная клетка с двумя полярными ядрами ($2n$) в результате слияния со вторым спермием ($1n$) образует триплоидный эндосперм ($3n$) [2].

При нарушении двойного оплодотворения у покрытосеменных растений может формироваться партеногенетический гаплоидный зародыш ($1n$) из неоплодотворенной или оплодотворенной дефектными спермиями яйцеклетки (гиногенез). У современных сортов кукурузы независимое от оплодотворения развитие зародыша (гиногенез или матроклинный партеногенез, как частный

случай) встречается крайне редко (0.1–0.01%) [3]. Однако 60 и более лет назад были выведены линии кукурузы с повышенной способностью к индукции гаплоидов (гаплоиндукторы). К ним относятся линии РЕМ [4], Stock 6 [3] и линии, полученные с использованием Stock 6: ЗМС, ЗМС-8, КМС (Саратов, Россия) [5]; Краснодарский маркер (Краснодар, Россия) [6]; МН1 (Молдова) [7, 8] и некоторые другие [9, 10]. Было предположено, что способность саратовских линий ЗМС и КМС к индукции гаплоидов может быть обусловлена нарушением функции спермиев, которые не могут достичь яйцеклетки и/или слиться с ней [5, 11–13]. Однако причины и механизм повышенной гаплоиндуцирующей способности у саратовских линий-гаплоиндукторов кукурузы по сравнению с Stock 6 неясны.

С использованием линии Stock 6 были также получены партеногенетическая линия АТ-1 (Саратов) и ее производная линия АТ-3 с высокой частотой партеногенеза (с наследуемой матроклин-

ной гаплоидией) [14–16]. Кроме партеногенеза у линии АТ-3 наблюдаются полиэмбриония и начало эндоспермогенеза без опыления, но эти линии не являются гаплоиндукторами [16].

Механизмы формирования гаплоидов кукурузы могут быть разными: партеногенетическое развитие зародыша из неоплодотворенной яйцеклетки, апогамия (партеногенетическое развитие зародыша из яйцеклеткоподобных синергид или антипод), гиногенез (явление, при котором после оплодотворения ядро спермия не сливается с ядром яйцеклетки, а затем дегенерирует, и в развитии зародыша участвует только ядро яйцеклетки), андрогенез. За последние 5–7 лет были изучены некоторые молекулярно-генетические аспекты формирования гаплоидов кукурузы [10].

Один из механизмов образования матроклиных гаплоидов у кукурузы был открыт в 2017 г., когда три научные группы независимо опубликовали пионерские данные по расшифровке спонтанной мутации в одном из генов у линии Stock 6 [17–19]. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок фосфолипазу А, получила разные обозначения (в порядке появления публикаций): MATRILINEAL (*MTL*) [17], NOT LIKE DAD (*NLD*) [18], *PLA1* [19]. Вставка четырех нуклеотидов в четвертый экзон гена, кодирующего фосфолипазу А у линии Stock 6, сдвинула рамку считывания, изменив 20 аминокислот [19]. Если такую вставку произвести в ген, кодирующий фосфолипазу у обычной линии (негаплоиндуктора), то это приводит к появлению фенотипа аналогичного фенотипу Stock 6 и дает до 2% гаплоидов в потомстве [19].

Эта спонтанная мутация у линии Stock 6 была унаследована линиями, полученными с ее участием [9]. Фермент фосфолипаза А участвует в биодеградации фосфолипидов и в синтезе линоленовой кислоты. Однако авторы, открывшие ген индукции матроклиных гаплоидов [17–19], не уточнили его роль в гаплоиндукции. Возможно, что эта мутация в результате неправильного функционирования фермента приводит к изменениям липидного состава мембраны и следовательно к изменениям ее свойств, что, возможно, приводит к потере способности мембраны спермия взаимодействовать и сливаться с мембраной яйцеклетки и центральной клетки [20]. Можно предположить, что мутации по генам, кодирующим белки, которые участвуют во взаимодействии (адгезии) и слиянии мембран спермия с яйцеклеткой и центральной клеткой, тоже могут привести к нарушениям двойного оплодотворения.

Одной из причин нарушения двойного оплодотворения могут быть нарушения во взаимодействии между мембранами гамет. Первые данные о гене (*HAP2/GCS1* (*HAPLESS2/Generative Cell Specific 1*)), контролирующем взаимодействие мембран гамет у

Arabidopsis thaliana, были опубликованы независимо исследователями из Японии [21] (электронная публикация 25 декабря 2005 г.) и США [22]. Белок HAP2(GCS1) необходим для слияния мембран спермия и яйцеклетки, центральной клетки у *A. thaliana* [23]. Положительный заряд в С-концевой области необходим для функционирования белка HAP2(GCS1) во время слияния гамет [24]. Была показана значительная (69%) гомология между геном *HAP2/GCS1 A. thaliana* и последовательностью ZM_BFb0162K03 (1921 нм) у кукурузы, которая содержит консервативную область, полностью идентичную соответствующим областям у *A. thaliana* и лилии (*Lilium longiflorum*) [25]. Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в кукурузе неспецифична для спермиев, поскольку мРНК была обнаружена в образцах, выделенных из завязей, корней и листьев [25], а также из семян, початков и незрелых метелок [26, 27]. Роль белка HAP2/GCS1 в способности индуцировать гаплоиды еще не доказана.

Эксперименты по картированию с мутантами показали, что ген *GEX2* (*gamete expressed 2*, At5g49150) контролирует раннее взаимодействие (адгезию) гамет у *A. thaliana* [28]. Белок EC1, секретируемый женскими гаметами, запускает активацию белков HAP2/GCS1 и GEX2 и их экспонирование на поверхности мембраны спермиев (см. обзоры [20, 23]). Мембранный белок GEX2 необходим для начала взаимодействия спермия (прикрепления, адгезии) с мембраной яйцеклетки и центральной клетки *A. thaliana* [23]. У мутантов по гену *GEX2* нарушается способность к адгезии и, как следствие, к слиянию мембран спермиев с яйцеклеткой и центральной клеткой, что приводит к образованию семян, содержащих либо гаплоидный зародыш, либо неправильно формирующийся эндосперм. Предполагается, что у саратовских линий кукурузы однократное оплодотворение является результатом функциональных дефектов у спермиев, которые приводят к образованию гаплоидных зародышей [11].

Известны также некоторые другие гены, при мутации в которых растения приобретают способность к гаплоиндукции. Установлено, что у *A. thaliana* появление гаплоидов в потомстве связано, в том числе, с мутацией в белке гистона H3, специфичном для центромеры — CENH3. Эта мутация приводит к хромосомной несовместимости и потере части или полного набора отцовских хромосом в первых делениях зиготы (анеуплоидия) [29]. У линий-гаплоиндукторов кукурузы, полученных при скрещиваниях с линией Stock 6, также наблюдалась частичная или полная элиминация хромосом [30–32]. Напомним, что линия Stock 6 и ее производные при использовании их в скрещивании в качестве отцовского родителя (индуцированный гиногенез) индуцируют гаплоиды в количестве 2–3% [33]. В отличие от *A. thaliana*, у которого при

мутации в гене *CENH3* возникает анеуплоидия и гаплоидия, у кукурузы элиминируются хромосомы мужского родителя после оплодотворения на ранних стадиях развития зародыша, приводя к гаплоидии (до 3.6%) [32].

Мембранный домен белка DUF679, кодируемый геном *DMP9*, экспрессируется в мембранах женских и мужских гамет *A. thaliana* и регулирует их контакт [34]. У *A. thaliana* нокаут этого гена нарушает оплодотворение яйцеклетки в большей степени, чем оплодотворение центральной клетки [35]. Роль гена *DMP* в индукции гаплоидов кукурузы была показана с помощью геномного редактирования (CRISPR-Cas9) в экспериментах по нокауту генов [36].

Ген *PSASGR-BBML* относится к семейству *APETALA2/(AP2/ERF)*, экспрессируется в яйцеклетке до оплодотворения и его роль в индукции партеногенеза была показана для проса [37], кукурузы и риса [38].

Таким образом, установлено несколько генов, которые контролируют появление матроклиных гаплоидов у кукурузы: *PLA1*, *DMP*, *CENH3*, *BBML*. В представленной статье мы обсуждаем индукцию образования гаплоидов, предположительно связанную с нарушением взаимодействия гамет, в частности с генами, контролирующими адгезию и слияния мембран гамет (*HAP2/GCS1*, *GEX2*) у гаплоиндуцирующих линий кукурузы саратовской селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

В настоящей работе были использованы линии кукурузы саратовской селекции (Зародышевый маркер саратовский пурпурный (ЗМСП) и ГПЛ-1) и линия Коричневый маркер (КМ). У линии ЗМСП, отобранной из потомства самоопыляемых гибридов материнской линии Зародышевый маркер саратовский (ЗМС-8) [39] и отцовской линии-гаплоиндуктора Коричневый маркер саратовский (КМС, Саратов), частота гаплоиндукции достигает 10% [40]. Линии ЗМС-8 и КМС с частотой гаплоиндукции до 6–8% [39] являются прямыми потомками линии-гаплоиндуктора Stock 6 [9]. В качестве контроля использовали негаплоиндуцирующие линии КМ и ГПЛ-1. Линия КМ, созданная С.С. Чейзом (Chase) [41], была получена из Национального зернового центра им. Лукьяненко (Краснодар, Россия). Диплоидная линия ГПЛ-1 была получена на кафедре генетики Саратовского государственного университета (Саратов, Россия) путем обработки колхицином гаплоидного растения кукурузы линии Кинельская 113 (Федеральный центр сельскохозяйственных исследований Юго-Восточного региона, Саратов, Россия [11]).

Все линии были выращены на полях Российского научно-исследовательского, проектно-тех-

нологического института сорго и кукурузы (Институт Россорго; Саратов, Россия) в 2020 г. и на опытном участке Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Саратовского научного центра Российской академии наук (Саратов) в 2021 г.

Початки кукурузы были изолированы с помощью пергаментных пакетов до того, как появились пестичные нити (конец июля–начало августа). Для получения зародышей предварительно изолированные початки опыляли вручную пыльцой других растений кукурузы и собирали початки через семь дней после опыления (7 ДПО). Часть образцов этой же линии была собрана через семь дней после появления рылец (7 ДППР) из предварительно изолированных початков без опыления. Все собранные початки были помещены в контейнеры со льдом, доставлены в лабораторию и заморожены при температуре -20°C .

Экспрессия генов GEX2, HAP2/GCS1 в тканях кукурузы

Тотальную РНК выделяли из 100 мг предварительно замороженных (-20°C) завязей, извлеченных из початков (7 ДППР или 7 ДПО), с использованием набора для экстракции РНК (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Из 100 мг предварительно замороженных (-20°C) пылевых зерен РНК выделяли с использованием метода SDS/βME [42] с модификациями: пылевые зерна измельчали в предварительно замороженной (-20°C) ступке, а фенол исключали из смеси хлороформ : изоамиловый спирт : фенол.

Для синтеза кДНК проводили обратную транскрипцию мРНК с помощью обратной транскриптазы (номер по каталогу EP0442; Thermo Fisher Scientific, США) и с oligo (dT) праймерами (Евроген, Россия). Концентрацию кДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Сингапур) с использованием набора для анализа RNA BR assay (Q32850; Thermo Fisher Scientific, США). Для всех образцов концентрация кДНК доведена до 2 нг путем разбавления более высокой концентрации. ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили на ПЦР-анализаторе Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора реагентов для ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green и пассивного референсного красителя ROX (номер по каталогу M-435; Синтол, Россия).

Для оценки экспрессии гена *GEX2* методом ПЦР были подобраны праймеры с помощью ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) таким образом, чтобы один из праймеров располагался в ме-

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагментов генов *GEX2* и *HAP2/GCSI* для дальнейшего секвенирования

Праймеры для гена <i>HAP2/GCSI</i>	Праймеры для гена <i>GEX2</i>
GCCCGCTCGACTCTTCTT/ TGAAGGTACACGGCGGTTAG	CGCAAATGGGTCTGGTTTGG/ ACTTGCAGATGTCAGCCGAA
GACACGCAAATGTGAACCAG/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	AGCTGCCTCCATGTCCATTTC/ GGTTCTTCGCACACCGTTTC
GCCCGCTCGACTCTTCTT/ CTGATGTAGTTGAGGGCGTAGA	GAAACGGTGTGCGAAGAACC/ TCACAGCGATGGACAAGGTC
GCACGTTAACGACACAAAG/ AACTTGTACCCTGATGTTGAACC	GCTAGAAGTCCTGGAGGGGA/ ACTCGATCTGCTTGACACAA
GCATGATCTTGAAGAACCAA/ AACTTGTACCCTGATGTTGAACC	CGTTGGATACTCCCCTGCTA/ CTATTGTTTACGGCCCCAGA
AAGGAAAAGCTAATACGGCTCA/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	TTTGCCAGTTGCGATCAATA/ CCACACCGAAACAGTGTCAT
CCATGTTTTTGAATTGGAAC/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	GTTTCAGCCCTGTCGTCGT/ AGAGCCGTTGGGGTAGGAG
AAGAAATCCCCCTGTCATCA/ GGCTCACCCTACCAGCACT	GGGTATTTACCCATTGCCATC/ ACGACGACAGGGCTGAAC
GGTGAGCCACAAAACCTTGG/ CATCCTTGTCTGTCGAGTTCAC	TCACCTGGGTTGGGGGTTAT/ CGGTGACGTAGCTGCTGTT
ACCGGAGGCACAAGAAAG/ CCCACGGTACACCAACTTCA	CTGGCTACTTCAGGGTCTCG/ GGGTCCATCTGGTTCTCTCA
TCAGAGGAGTCCAGGGAATA/ GGTGATGGTGGTCGTGGT	

сте соединения двух экзонов, что обеспечивает амплификацию только с матрицы кДНК.

В работе использовали праймеры: для гена *GEX2* – TGTTCGGTGTGGGAGGATG/TGAC-CCGTGAAGTGGAGAAG, для гена *GCSI* – TCG-GTTCAAATGGCTACAAA/TAGCAGCACCAACA-TGACGA, для гена *UBCE* – ACAAACCCCTCTC-CCTCCTGT/GGTAGATGCGACCCTCATGT.

Для каждой точки данных ПЦР выполнялась в четырех технических повторах для одной кДНК. Было проведено два или три независимых биологических эксперимента. В качестве эндогенного контроля использовали ген, кодирующий убиквитин-конъюгирующий фермент (*UBCE*) [43]. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [44] с нормализацией к экспрессии целевого гена у линии ЗМСП (7 ДПО). Мы считали, что значения не различаются, если разница между вариантами была <1.3 раза, как предполагается в работе [45].

Секвенирование РНК

Для секвенирования кДНК выделяли РНК из пыльцы линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП и КМ, как описано выше. Для получения ПЦР-продуктов для последующего секвенирования генов *GEX2*

и *HAP2/GCSI* использовали праймеры, приведенные в табл. 1.

Поскольку последовательности транскриптов гена *HAP2/GCSI*, аннотированные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100274016>), имели отличия в основном в начальном фрагменте, мы выбрали также пары праймеров для идентификации всех транскриптов поначальному фрагменту (табл. 1).

Для ПЦР и секвенирования региона гена *PLAI*, в который произошла вставка 4 пн у линии Stock 6, использовали праймеры ATGTTCCAGTC-GCTCCACAG/ATATCGTAGGGCGCACATCT.

ПЦР-продукты экстрагировали из агарозного геля, очищали с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в компании Евроген. Сравнение нуклеотидных последовательностей транскриптов разных линий проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Предварительно, с использованием программы Blast проводили выравнивание прочтений с прямыми и обратными праймерами. Учитывали также качество сигнала и вероятность ошибки на хроматограмме с помощью программы Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Собранные транскрипты

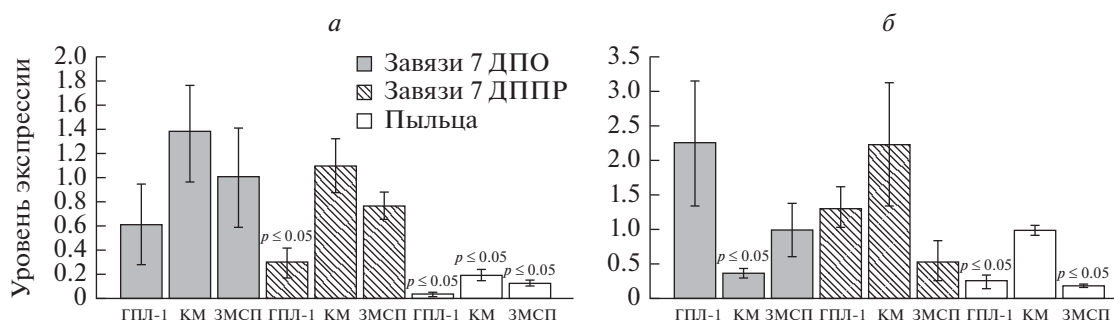


Рис. 1. Экспрессия генов *GEX2* (а) и *HAP2/GCS1* (б) в пыльце и завязях (без опыления – 7 дней после появления рылец (7 ДППР)) и 7 дней после опыления (7 ДПО) линий ГПЛ-1, КМ и ЗМСП. ПЦР-РВ проводилась в четырех технических повторях для одного образца кДНК и в трех биологических повторях для каждого варианта. В качестве эндогенного контроля использовали ген *UBCE* (см. Материалы и методы). Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [44] с нормализацией к экспрессии целевого гена в линии ЗМСП. * Значимые различия между образцом и калибратором (завязи ЗМСП, 7 ДПО) обозначены как $p \leq 0.05$.

генов *GEX2* линий ЗМСП и КМ (3646 пн) были представлены нами в базу данных GenBank (MN617022.2, OL649773.1 и MW195549.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Линия кукурузы Stock 6 дает максимальную частоту гаплоидов 3.2% [3], в то время как гаплоиндуцирующие линии саратовской селекции на основе Stock 6 дают более высокие частоты появления гаплоидов в их потомстве $\approx 8\%$ (ЗМС-8) [13] и даже до 10% (ЗМСП) [40]. Наши результаты секвенирования показали, что линии-гаплоиндукторы саратовской селекции ЗМС-8 и ЗМСП имеют те же вставки четырех нуклеотидов (данные не показаны) в ген *PLA1*, кодирующий фосфолипазу А, что и у линии Stock 6 [19]. Однако не известно связаны ли повышенные частоты гаплоиндукции у гаплоиндуцирующих линий саратовской селекции ЗМС-8 и ЗМСП с функцией каких-либо из ранее обнаруженных генов генома. Мы исследовали экспрессию генов *GEX2*, *HAP2/GCS1* в пыльце и неоплодотворенных завязях из неопыленных початков через семь дней после появления рылец (7 ДППР) и в завязях через 7 дней после опыления (7 ДПО) у гаплоиндуцирующей (ЗМСП) и двух негаплоиндуцирующих линий (ГПЛ-1, КМ). А также секвенировали гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* линий ЗМСП и КМ.

GEX2

Ген *GEX2* экспрессируется в зрелой пыльце, бутонах и открытых цветках *A. thaliana* [28]. В пестиках его экспрессия выражена в гораздо меньшей степени, чем в пыльниках [46]. Ген *GEX2* кукурузы высоко и специфично экспрессируется в спермиях, как показано с помощью секвенирования РНК [26, 27]. Однако данных об экспрессии *GEX2* в других тканях кукурузы нет. В настоящем

исследовании мы впервые наблюдали экспрессию гена *GEX2* в завязях кукурузы до и после оплодотворения (рис. 1, а).

Гаплоиндуцирующая линия ЗМСП не отличалась по экспрессии гена *GEX2* в исследованных тканях (завязях до и после опыления и пыльце) от контрольной линии КМ, но демонстрировала повышенную экспрессию в неопыленных завязях (7 ДППР) и в пыльце, в сравнении с другой контрольной линией ГПЛ-1 (рис. 1, а). В целом можно отметить, что исследованные линии кукурузы отличаются по экспрессии генов *GEX2*, но уровень экспрессии не коррелирует со способностью линии ЗМСП к гаплоиндукции, поскольку может значительно различаться у контрольных линий (КМ, ГПЛ-1), которые не обладают способностью к гаплоиндукции.

Мы также секвенировали транскрипт гена *GEX2* с целью выявления мутаций. У трех линий было обнаружено 59 однонуклеотидных замен (ОНЗ) в последовательностях гена *GEX2*. В частности, нуклеотидная последовательность гена *GEX2* у линии ЗМСП имела делецию одного нуклеотида в положении 506 н, а также 27 и 34 ОНЗ по сравнению с В73 и КМ соответственно (не показано). У линии ЗМСП была также обнаружена вставка из девяти нуклеотидов и одна двухнуклеотидная замена по сравнению с линией В73. Следует отметить, что линии ЗМСП и КМ имели одинаковую вставку из девяти нуклеотидов в положениях 3096–3104 н по сравнению с В73 (не показано).

Мы исследовали влияние ОНЗ, делеций и вставок в гене *GEX2* на аминокислотную последовательность белка GEX2 и обнаружили 15 несоответствий между аминокислотными последовательностями белков GEX2 у линий КМ и ЗМСП (рис. 2).

Кроме того, в аминокислотной последовательности белка GEX2 у линии ЗМСП, по сравнению с последовательностью белка В73, обнаружено 10

GEX2-B73	WTVSFVPLRAGKFAALIGEPRFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWTFADRRVVAGYRA	180
GEX2-KM	WTVSFVPLRAGKFAALIGEPRFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWTFADRRVVAGYRA	180
GEX2-3МСП	WTVSFVPLRAGKFAALIGEPRFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWTFADRRVVAGYRA	180

GEX2-B73	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPVINTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDSFMNPVLESSK	540
GEX2-KM	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPVINTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDSFMNPVLESSK	540
GEX2-3МСП	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPVINTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDSFMNPVLESSK	540

GEX2-B73	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTTSFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVLFDKQLP	600
GEX2-KM	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTTSFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVLFDKQLP	600
GEX2-3МСП	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTTSFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVLFDKQLP	600

GEX2-B73	CPFEVTVHADEYFSDVKNDTVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSSPHLGSLVLF	660
GEX2-KM	CPFEVTVHADEYFSDVKNDTVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSSPHLGSLVLF	660
GEX2-3МСП	CPFEVTVHADEYFSDVKNDTVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSSPHLGSLVLF	660

GEX2-B73	GQTYRYTPFGGFFGNDSSFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSLPEKLHVTEDTIS	720
GEX2-KM	GQTYRYTPFGGFFGNDSSFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSLPEKLHVTEDTIS	720
GEX2-3МСП	GQTYRYTPFGGFFGNDSSFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSLPEKLHVTEDTIS	720

GEX2-B73	PLFGGFPFGMKMVSDTTENISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSRGKDLVL	780
GEX2-KM	PLFGGFPFGMKMVSDTTENISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSRGKDLVL	780
GEX2-3МСП	PLFGGFPFGMKMVSDTTENISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSRGKDLVL	780

GEX2-B73	SILLSGNESWEGYRIFDKNRDTFEFSIVDPDYNFPGKKSSFFLVLSLEVLEGLTLVTLP	900
GEX2-KM	SILLSGNESWEGYRIFDKNRDTFEFSIVDPDYNFPGKKSSFFLVLSLEVLEGLTLVTLP	900
GEX2-3МСП	SILLSGNESWEGYRIFDKNRDTFEFSIVDPDYNFPGKKSSFFLVLSLEVLEGLTLVTLP	900

GEX2-B73	HGTTLSIAVNDQANHGCYPDCSERMTMPLSTAKTIRLVPPPREVVAGALGVHSSRRAIL	1017
GEX2-KM	HGTTLSIAVNDQANHGCYPDCSERMTMPLSTAKTIRLVPPPREVVAGALGVHSSRRAIL	1020
GEX2-3МСП	HGTTLSIAVNDQANHGCYPDCSERMTMPLSTAKTIRLVPPPREVVAGALGVHSSRRAIL	1020

GEX2-B73	FRWLAAAGIVVMLCQGCVLCCFLKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQTAPFRONMCAS	1077
GEX2-KM	FRWLAAAGIVVMLCQGCVLCCFLKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQTAPFRONMCAS	1080
GEX2-3МСП	FRWLAAAGIVVMLCQGCVLCCFLKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQTAPFRONMCAS	1080

GEX2-B73	QREDVGYSPATATASQLGASRSSLRQSPRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	1137
GEX2-KM	QREDVGYSPATATASQLGASRSSLRQSPRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	1140
GEX2-3МСП	QREDVGYSPATATASQLGASRSSLRQSPRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	1140

Рис. 2. Фрагменты белков GEX2 у линий B73, KM и 3МСП с измененными аминокислотными последовательностями. Парные совпадающие аминокислоты отмечены серым цветом, а замены и делеции аминокислот отмечены белыми буквами на черном фоне. Выравнивание последовательностей белков было выполнено с помощью ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

аминокислотных замен и две вставки (рис. 2). Можно предположить, что изменения аминокислотной последовательности в белке GEX2 у линии 3МСП могут влиять на его конформацию и функцию во время адгезии мембран гамет и быть связаны с индукцией гаплоидов.

Белок GEX2 необходим для прикрепления (адгезии) спермия как к яйцеклетке, так и к центральной клетке [23]. Однако рецептор для белка GEX2 спермия в мембранах яйцеклетки и центральной клетки неизвестен. Ранее было предположено, что у саратовских линий кукурузы может быть нарушена функция спермиев, которые не могут прикрепиться к мембране яйцеклетки [11].

Мы обнаружили ряд аминокислотных замен у белка GEX2 линий 3МСП и KM (рис. 2). Чтобы определить могут ли эти аминокислотные замены в белке GEX2 изменять его конформацию, предстоит выяснить трехмерную структуру белка GEX2 у линий кукурузы 3МСП (гаплоиндуктор) и KM (негаплоиндуктор).

HAP2/GCS1

Экспрессия гена *HAP2/GCS1* у *A. thaliana* ранее считалась спермий-специфичной [21, 22]. Позже, однако, было показано, что транскрипт этого гена присутствует в завязях и плодах *A. thaliana* [47]. Из данных РНК-секвенирования следует, что экспрессия гена *HAP2/GCS1* в зрелых пыльниках кукурузы практически отсутствует [26, 27]. Ген *HAP2/GCS1* экспрессируется в пыльце кукурузы, завязях и корнях [25], а также в листьях, семенах, початках и незрелых метелках [26, 27]. Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в вегетативных тканях предполагает, что этот ген участвует не только в слиянии гамет, но, возможно, и в других процессах в тканях кукурузы.

В наших исследованиях зарегистрирована высокая экспрессия гена *HAP2/GCS1* в завязях всех исследованных линий кукурузы как до, так и после оплодотворения (рис. 1,б). Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в пыльце и завязях линии 3МСП после оплодотворения (7 ДПО) существенно не отличалась от таковой в ГПЛ-1 (7 ДПО). Однако в неопыленных завязях линии 3МСП (7 ДППР) экспрессия гена *HAP2/GCS1* была в 2.4 раза ниже, чем

у ГПЛ-1 (7 ДППР). Экспрессия гена *HAP2/GCS1* у линии ЗМСП в пыльце и в неопыленных завязях (7ДППР) в 5 и 4 раза соответственно ниже по сравнению с линией КМ. Однако после оплодотворения в завязях (7 ДПО) у линии ЗМСП экспрессия гена *HAP2/GCS1* выше в 2.7 раза по сравнению с линией КМ (7 ДПО). Самая высокая экспрессия гена *HAP2/GCS1* была зарегистрирована в неопыленных завязях линии ЗМСП (7 ДППР) и в опыленных завязях у линии КМ (7 ДПО).

Таким образом, гаплоиндуцирующая линия ЗМСП достоверно отличалась по экспрессии *HAP2/GCS1* в пыльце и завязях только от одной контрольной линии КМ – в 2.7 раза больше в завязях (7 ДПО) и в 5 и 4 раза соответственно меньше в пыльце и в завязях (7 ДПО), и не отличалась в пыльце и завязях 7 ДППР от другой контрольной линии ГПЛ-1. То есть у ЗМСП нет однозначной связи между экспрессией гена *HAP2/GCS1* и индукцией гаплоидов.

В 2017 г. мы впервые секвенировали консервативную (1467 нп) область гена *HAP2/GCS1* линий кукурузы ЗМСП и ГПЛ-1 [25]. В базе данных GenBank в 2020 г. для гена *HAP2/GCS1* кукурузы методом компьютерного прогнозирования предсказано шесть транскриптов. Было установлено, что последовательность гена *HAP2/GCS1*, секвенированная нами для линий КМ и ЗМСП, соответствует транскрипту NM_001320812.1 референсной линии В73, кодирующему белок NP_001307741.1 (Protein HAPLESS 2 isoform 1 precursor). У линии КМ выявлены два несовпадения нуклеотидных последовательностей в позициях 1412, 1626 нп по сравнению с референсной линией В73.

Белок HAP2/GCS1 имеет домен, называемый фактором слияния мужских гамет, который является высоконсервативным и присутствует в различных семействах растений и животных [48]. Предполагается, что слияние мембран гамет цветковых растений происходит с помощью амфифильной спирали белка HAP2/GCS1 [49]. Белок HAP2/GCS1 у линии кукурузы ЗМСП имеет только одну аминокислотную замену по сравнению с линиями КМ и В73 (рис. 2).

Таким образом, установлено, что гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* экспрессируются не только в спермиях, но и в женских генеративных структурах кукурузы, однако гаплоиндуцирующая способность кукурузы не коррелирует с их экспрессией. Установлено, что гены *GEX2* гаплоиндуцирующей линии ЗМСП и негаплоиндуцирующей линии КМ имеют 29 и 34 изменений нуклеотидных последовательностей соответственно, в том числе одинаковую вставку размером девять нуклеотидов, по сравнению с референсной линией В73. Анализ аминокислотной последовательности белка GEX2 гаплоиндуцирующей линии ЗМСП выявил 15 аминокислотных замен по сравнению с линией КМ и 10

аминокислотных замен по сравнению с референсной линией (рис. 2), что, возможно, оказывает воздействие на процесс взаимодействия мембран гамет. Для уточнения роли генов *GEX2* и *HAP2/GCS1* в явлении гаплоиндукции у кукурузы требуется исследование их функций в биологических экспериментах, в том числе CRISPR/Cas-редактирование этих генов, а также анализ трехмерных моделей белков GEX2 и HAP2/GCS1 из различных линий кукурузы и возможного влияния нуклеотидных и аминокислотных замен на конформацию и функцию белков.

Авторы признательны О.И. Юдаковой за прочтение рукописи и полезные замечания, а также В.В. Фадееву за помощь в оформлении рукописи и рецензенту за полезные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-016-00020а и 20-316-80020/20 мол-э), гранта Президента РФ (№ МК-4527.2022.1.4, Минобрнауки) и Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2021–2023 годы (№ 121031700141-7).

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. Навашин С.Г. Избранные труды. Т. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1951. 364 с.
2. Dresselhaus T., Snell W.J. Fertilization: A sticky sperm protein in plants // *Current Biol.* 2014. V. 24. № 4. P. R164–R166. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.044>
3. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // *The Am. Naturalist.* 1959. V. 93. № 873. P. 381–382. <https://doi.org/10.1086/282098>
4. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines // *Genetics.* 1949. V. 34. № 3. P. 328–332. <https://doi.org/10.1093/genetics/34.3.328>
5. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матрокллиных гаплоидов кукурузы // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 276. № 3. С. 735–738.
6. Shatskaya O.A., Zabirowa E.R., Shcherbak V.S., Chumak M.V. Mass induction of maternal haploids in corn // *Maize Genet. Cooperation Newsletter.* 1994. V. 68. P. 51.
7. Bylich V.G., Chalyk S.T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line // *Maize Genet. Cooperation Newsletter.* 1996. V. 70. P. 33.

8. Chalyk S., Baumann A., Daniel G., Eder J. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize // *Maize Genet. Cooperation Newsletter*. 2003. V. 77. P. 29.
9. Hu H.L., 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. № 4. P. 1267–1276. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184234>
10. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397.
11. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П. Оди-нарное оплодотворение и проблема гаплоиндук-ции у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1997. Т. 353. № 3. С. 405–407.
12. Гуторова О.В. Исследование женского гаметофита линии-гаплоиндуктора кукурузы ЗМС-П // *Бюл. Ботанического сада Саратовского гос. ун-та*. 2006. № 5. С. 304–307.
13. Колесова А.Ю., Гуторова О.В. Цитоэмбриологи-ческое исследование гаплоиндуцирующей линии ку-курузы ЗМС-8 // *Бюл. Ботанического сада Сара-товского гос. ун-та*. 2008. № 7. С. 202–205.
14. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие за-родыша и эндосперма у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
15. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn // *Maize Genet. Co-operation. Newsletter*. 1997. V. 71. P. 74–75.
16. Еналеева Н.Х., Отыкало О.В., Тырнов В.С. Феноти-пическое проявление мутации *ig* в мегагаметофите кукурузы линии Зародышевый маркер // *Генети-ка*. 1998. Т. 34. № 2. С. 259–265.
17. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // *Nature*. 2017. V. 542. № 7639. P. 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature20827>
18. Gilles L.M., Khaled A. Loss of pollen-specific phospholi-pace NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J*. 2017. V. 36. № 6. P. 707–717. <https://doi.org/10.15252/embj.201796603>
19. Liu C., Li X., Meng D., Zhong Y. et al. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase a gener-ates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. № 3. P. 520–522. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
20. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимо-действие гамет у кукурузы // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 10. С. 1120–1124.
21. Mori H., Kuroiwa T., Kranz E., Scholten S. GENERA-TIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. P. 64–71. <https://doi.org/10.1038/ncb1345>
22. Besser V.K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. *Arabidopsis* HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization // *Develop-ment*. 2006. V. 133. № 23. P. 4761–4769. <https://doi.org/10.1242/dev.02683>
23. Mori T., Igawa T., Tamiya G. et al. Gamete attachment re-quires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis* // *Current Biol*. 2014. V. 24. № 2. P. 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.030>
24. Wong J.L., Leydon A.R., Johnson M.A. HAP2(GCS1)-dependent gamete fusion requires a positively charged car-boxy-terminal domain // *PLoS Genetics*. 2010. V. 6. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000882>
25. Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гусев Ю.С. и др. Ана-лиз генов, контролирующих процесс слияния гамет, у гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-П // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 2. С. 134–139.
26. Hoopes G.M., Hamilton J.P., Wood J.C. et al. An updat-ed gene atlas for maize reveals organ-specific and stress-induced genes // *The Plant J*. 2019. V. 97. № 6. P. 1154–1167. <https://doi.org/10.1111/tpj.14184>
27. Stelplflug S.C., Sekhon R.S., Vaillancourt B. et al. An ex-panded maize gene expression atlas based on RNA se-quencing and its use to explore root development // *The Plant Genome*. 2016. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025>
28. Engel M.L., Holmes-Davis R., McCormick S. Green sperm. Identification of male gamete promoters in *Arabi-dopsis* // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. № 4. P. 2124–2133. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054213>
29. Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by cen-tromere-mediated genome elimination // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 615–618.
30. Zhang Z., Qiu F., Liu Y. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-de-rived inducer line in maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Reports*. 2008. V. 27. № 12. P. 1851–1860. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0601-2>
31. Qiu F., Liang Y., Li Y. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimina-tion *in vivo* upon haploid induction in maize // *Current Plant Biol*. 2014. V. 1. P. 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.04.001>
32. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap trans-genic complementation in maize // *Frontiers Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
33. Xu X., Li L., Dong X. et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize // *J. Exper-imental Bot*. 2013. V. 64. № 4. P. 1083–1096. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers393>
34. Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for dou-ble fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 145. № 23. dev170076. <https://doi.org/10.1242/dev.170076>
35. Cyprys P., Lindemeier M., Sprunck S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 mem-brane proteins // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 253–257. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0382-3>
36. Zhong Y., Liu C., Qi X. et al. Mutation of ZmDMP en-hances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>
37. Conner J.A., Mookkan M., Huo H. et al. A parthenogen-esis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant // *Proc. Natl*

- Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 36. P. 11205–11210.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505856112>
38. Conner J.A., Podio M., Ozias-Akins P. Haploid embryo production in rice and maize induced by PsASGR-BBML transgenes // *Plant Reproduction*. 2017. V. 30. P. 41–52.
 39. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // *Reproductive Biol. Plant Breeding: XIII EUCARPIA Congr.* 1992. P. 221–222.
 40. 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. № 2-2. С. 341–344.
 41. Chase S.S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) // *The Bot. Review*. 1969. V. 35. № 2. P. 117–168.
 42. Bijli K.M., Singh B.P., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens // *Preparative Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 31. № 2. P. 155–162.
<https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
 43. Manoli A., Sturaro A., Trevisan S. *et al.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. № 8. P. 807–815.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>
 44. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 45. Weaver S., Dube S., Mir A. *et al.* Taking qPCR to a higher level: analysis of *cnv* reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution // *Methods*. 2010. V. 50. № 4. P. 271–276.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.003>
 46. Alandete-Saez M., Ron M., McCormick S. GEX3 expressed in the male gametophyte and in the egg cell of *Arabidopsis* is essential for micropylar pollen tube guidance and plays a role during early embryogenesis // *Mol. Plant*. 2008. V. 1. № 4. P. 586–598.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssn015>
 47. Borges F., Gomes G., Gardner R. *et al.* Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. № 2. P. 1168–1181.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.125229>
 48. Valansi C., Moi D., Leikina E. *et al.* *Arabidopsis* HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens // *J. Cell Biol.* 2017. V. 216. P. 571–581.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201610093>
 49. Fedry J., Forcina J., Legrand P. *et al.* Evolutionary diversification of the HAP2 membrane insertion motifs to drive gamete fusion across eukaryotes // *PLoS Biology*. 2018. V. 16(8): e2006357.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006357>

Comparative Analysis of the *HAP2/GCS1*, *GEX2* Genes Expression in Maize Lines of Saratov Selection

E. M. Moiseeva^a, Yu. S. Gusev^{a, b}, O. V. Gutorova^b, and M. I. Chumakov^{a, *}

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

^b*Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The haploid-induction phenomenon have a scientific and practical aspects for development the effective haploid-inducing maize line and diploid homozygous lines creation. The article discusses the relationship between the maize haploid-induction and the violation of the gamete interactions, in particular for *GEX2-HAP2/GCS1*-mediated adhesion and fusion of gamete membranes in Zarodishevii Marker Saratovskii Purpurnii (ZMSP) maize lines. Using real-time RT-PCR method, it was found that the *GEX2*, *HAP2/GCS1* genes are expressed in sperm and ovules, but the maize haploid-inducing ability does not correlate with their expression. It was shown that the ZMSP haploid-inducing line have 27 SNP, one 9-bp insertion, 2-bp SNP and the corresponding 10 amino acid substitutions with two insertions in the GEX2 protein in comparing with reference B73 line. It was found that HAP2/GCS1, as a conservative protein for membrane fusion has only one amino acid substitution in ZMSP in comparing with B73 maize and Brown Marker maize lines.

Keywords: maize, *Zea mays*, gynogenesis genes, expression.