

ЭЛИМИНАЦИЯ ХРОМОСОМ КАК МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ В ДИПЛОИДНО-ТЕТРАПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ У КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.)

© 2023 г. Л. А. Эльконин¹*, Л. И. Мавлютова¹, А. Ю. Колесова¹, В. М. Панин¹, М. И. Цветова¹

¹Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, 410010 Россия

*e-mail: lelkonin@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Одним из основных компонентов апомиктичного размножения растений является формирование нередуцированных зародышевых мешков (ЗМ). Эффективным инструментом для выявления способности к формированию таких ЗМ могут служить гетероплоидные скрещивания, в которых материнские диплоидные растения опыляют пыльцой тетраплоидов. У кукурузы в скрещиваниях $2n(\text{♀}) \times 4n(\text{♂})$ формируются как правило шуплые зерновки с триплоидным зародышем, у которых развитие эндосперма нарушено ввиду отклонения баланса материнского (м) и отцовского (о) геномов от соотношения $2m : 1o$. В наших экспериментах у нескольких диплоидных линий кукурузы при опылении их пыльцой тетраплоидов наблюдалось формирование крупных выполненных зерновок, из которых развивались диплоидные растения матроклинного типа, причем материнский фенотип растений, а также гибридный фенотип эндосперма были подтверждены экспрессией генетических маркеров. Было высказано предположение, что выполненные зерновки в $2n \times 4n$ скрещиваниях возникают на основе нередуцированных ЗМ и псевдогамного апомиксиса, поскольку слияние двух диплоидных полярных ядер с диплоидным спермием обеспечивает соотношение материнского и отцовского геномов в эндосперме $2m : 1o$. С целью уточнения генетической природы диплоидных растений, фенотипически сходных с материнскими линиями, которые развивались из выполненных зерновок в скрещиваниях $2n \times 4n$, нами было проведено их генотипирование по всем десяти хромосомам генома кукурузы с помощью полиморфных кодоминантных SSR- и Indel-маркеров, дифференцирующих отцовскую линию-опылитель от материнских линий. В качестве материнских форм использовали линию ГПЛ АТ, обладающую способностью к гаплоидному партеногенезу, растения из поколения F_2 гибрида между линией В47, способной к формированию нередуцированных ЗМ, и линией ГПЛ АТ. Кроме того, в скрещивания была включена линия Коричневый Маркер (КМ), несущая маркерный ген *B* коричневой окраски стебля, а также линия ЮВ11. В качестве отцовской формы использовали тетраплоидную кукурузу Черная Тетра (ЧТ), несущую маркерный ген *A1* черной окраски зерновок. Установлено, что у всех исследованных растений при использовании маркеров пяти хромосом – 1-й (iDp525), 2-й (iDP4004), 3-й (JY_3:457), 4-й (UfIDP4_31.55), 9-й (INDEL_139329242) – наблюдалась амплификация только материнских аллелей. Однако у каждого из изученных растений при использовании маркеров других хромосом были отмечены случаи амплификации аллелей, свойственных отцовской линии. Высказывается гипотеза о формировании диплоидных растений в $2n \times 4n$ скрещиваниях у кукурузы на основе оплодотворения нередуцированных ЗМ и последующей элиминации хромосом преимущественно отцовской линии.

Ключевые слова: апомиксис, ДНК-маркеры, гетероплоидные скрещивания, элиминация хромосом.

DOI: 10.31857/S0016675823090035, **EDN:** WRWCWX

Апомиксис – развитие семян, минуя процесс двойного оплодотворения, – относится к числу наиболее интенсивно исследуемых биологических явлений, различные формы которого описаны у многих видов растений. Такое внимание к проблеме апомиксиса связано с надеждами, что перенос апомиксиса в культурные растения будет способствовать фиксации гетерозиса у гибридов F_1 и их клональному размножению семенами [1–3].

Сложность решения данной проблемы обусловлена многокомпонентным характером апомиксиса, включающим способность к формированию нередуцированных зародышевых мешков (ЗМ) – диплоспорических, возникающих в результате нарушений мейоза, либо апоспорических, развивающихся из соматических клеток, расположенных вблизи мейотического ЗМ, а также способность к партеногенетическому развитию яйцеклеток. Кро-

ме того, ключевым фактором, обеспечивающим формирование семян при апомиксисе, является также развитие эндосперма – автономного или на основе псевдогамии (оплодотворения центральной клетки ЗМ одним из спермиев) [2–4]. Эти компоненты контролируются разными генетическими системами. Перенос их в культурные растения возможен либо на основе скрещивания с дикорастущими сородичами с факультативным проявлением апомиксиса, либо с помощью методов генетической инженерии. За последние годы благодаря интенсивному исследованию дикорастущих апомиктических видов были выявлены гены, участвующие в генетическом контроле отдельных компонентов апомиксиса [4–7]. Эти исследования открывают перспективы для конструирования апомиксиса методами генетической инженерии [8, 9], что недавно было успешно продемонстрировано у риса [10]. Однако у других видов злаковых культур, несмотря на интенсивные исследования, подобный успех еще не достигнут.

У кукурузы для создания линий с апомиктическим способом размножения использовали гибридизацию с дикорастущим тетраплоидным сородичем *Tripsacum dactyloides* L., обладающим способностью к факультативному апомиксису [11]. В результате многолетних исследований были получены гибриды, которые проявляли апомиксис, но отличались по морфологическим и хозяйственным признакам от кукурузы, причем потеря хромосом трипсакума приводила к утрате апомиктических потенций [12].

Одним из эффективных инструментов для выявления способности к формированию нередуцированных ЗМ при апомиксисе может служить использование тетраплоидных опылителей [13–17]. Как известно, у кукурузы, как и у многих других видов высших растений, нормальное развитие эндосперма требует высокоспецифичного баланса экспрессирующихся генов материнского (м) и отцовского (о) геномов, соотношение которых, в соответствии с теорией балансового числа эндосперма, должно быть $2m : 1o$ [18–20]. При оплодотворении гаплоидного (редуцированного) ЗМ кукурузы, содержащего гаплоидную яйцеклетку и два гаплоидных полярных ядра, диплоидными спермиями происходит формирование щуплых зерновок с триплоидным зародышем и тетраплоидным эндоспермом. У таких зерновок эндосперм в той или иной степени дегенерирует ввиду нарушения соотношения родительских геномов ($2m : 2o$) [20, 21]. В случае оплодотворения нередуцированного диплоидного ЗМ пылью тетраплоидов слияние двух диплоидных полярных ядер с диплоидным спермием должно приводить к появлению гексаплоидного эндосперма с соотношением родительских геномов $2m : 1o$, которое обеспечивает развитие нормально выполненных семян. Такие семена могут нести либо гибридный тетраплоид-

ный зародыш (в результате оплодотворения диплоидной яйцеклетки диплоидным спермием), либо апомиктический зародыш (в случае партеногенетического развития неоплодотворенной яйцеклетки).

Ранее нами при опылении тетраплоидными опылителями ряда диплоидных линий кукурузы, в том числе линии ГПЛ АТ, созданной на основе линии АТ-1, обладающей способностью к гаплоидному партеногенезу [22], было обнаружено формирование на початках крупных выполненных зерновок, из которых развивались как тетраплоидные гибриды, так и диплоидные растения материнского типа [23]. Гибридный фенотип зерновок и матроклинный фенотип растений были подтверждены экспрессией генетических маркеров [24]. С целью уточнения генетической природы диплоидных растений, развивающихся из крупных выполненных зерновок, формирующихся на початках диплоидных линий и гибридов в результате их опыления пылью тетраплоидов, нами было проведено генотипирование таких растений по всем десяти хромосомам генома кукурузы с помощью полиморфных кодоминантных SSR- и Indel-маркеров. Часть полученных экспериментальных данных была представлена нами ранее в виде краткого сообщения [25]. В настоящей статье мы приводим подробное описание проведенного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. В качестве материнских форм в скрещиваниях использовали диплоидную линию кукурузы (*Zea mays* L.) ГПЛ АТ, которая была получена на основе линии АТ-1, характеризующейся способностью к партеногенетическому развитию яйцеклеток и высокой частотой гаплоидных растений [22], а также растения из поколения F_2 гибрида между линиями В47 и ГПЛ АТ. Линия В47 ($2n$) при использовании в качестве материнской формы в скрещиваниях с тетраплоидными отцовскими формами дает тетраплоидные гибриды, что указывает на наличие у нее способности к формированию нередуцированных ЗМ [23]. Кроме того, в скрещиваниях в качестве материнских форм использовали диплоидную линию Коричневый Маркер (КМ), несущую маркерный ген *B*, обуславливающий коричневую окраску стебля у гибридов F_1 , и ген *R*, обуславливающий черную окраску зерновок при взаимодействии с геном *A*, а также линию ЮВ11. В качестве отцовской формы использовали тетраплоидную кукурузу Черная Тетра (ЧТ), несущую ген *A*, что позволяет использовать ее для генетического маркирования гибридных зерновок при скрещивании с линиями, несущими ген *R* (к примеру, с КМ).

Растения выращивали на изолированном от других линий кукурузы (за исключением ЧТ) опытном участке Селекционного комплекса ФАНЦ Юго-Востока (г. Саратов, Россия). Почва на опытном участке представлена южным черноземом, среднесуглинистым по механическому составу. Растения выращивали рядовым способом с междурядьем 70 см и густотой стояния четыре растения на метр.

Скрещивания, потомство которых исследовали в данной работе, были выполнены в 2019 г. Вегетационный сезон 2019 г. отличался значительным количеством осадков (для условий Саратова) и отсутствием жары. За июль – первую декаду августа (т.е. в период развития генеративных структур и цветения) сумма осадков, по данным метеостанции ФАНЦ Юго-Востока, составила 82.0 мм, среднесуточный дефицит влажности воздуха варьировал от 6.0 до 20.0 гПа, среднесуточная температура – от 18.2 до 25.1°C, число дней с максимальной температурой воздуха выше 30°C – 4; ГТК за этот период составлял 0.97.

Методика опыления. У материнских растений кукурузы, выращенных на изолированном участке, тщательно удаляли метелки и, кроме того, початки тщательно изолировали пергаментными изоляторами за 2–3 дня до цветения. Таким образом, возможность случайного опыления была исключена. У разных материнских форм было опылено 6–15 початков. Изолированные, но неопыленные початки служили контролем. Число контрольных початков в разных гибридных комбинациях составляло 5–57 штук.

Проращивание зерновок. У выполненных зерновок, сформировавшихся на початках, отделяли часть эндосперма, которую использовали впоследствии для выделения ДНК, а остальную часть зерновки стерилизовали и проращивали в культуре *in vitro*. Стерилизацию проводили 70%-ным этиловым спиртом (30 с) и 0.1%-ным раствором сулемы (15 мин) и после тщательной промывки замачивали в течение суток в воде (28°C). После повторной стерилизации сулемой (7 мин) и промывки автоклавированной водой зародыши помещали в пробирки на питательную агаризованную среду MS и выращивали в растительной комнате, оборудованной лампами Osram Fluora L36w/77 (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь; $26 \pm 1^\circ\text{C}$). Проростки с развитыми корнями переносили на несколько дней в пробирки с водой для адаптации к нестерильным условиям, после чего высаживали в теплицу в пластиковые сосуды, и затем – на делянку на экспериментальном поле Селекционного центра ФАНЦ Юго-Востока.

Цитологический анализ. Для определения ploидности кончики корешков растений, выращенных в пластиковых сосудах, фиксировали в ацеталкоголе (1 : 3). Фиксацию проводили в 10–11 часов

утра при 26–28°C. Перед фиксацией кончики корешков помещали на 3 часа в насыщенный раствор α -бром-нафталина для укорачивания хромосом. Кончики корешков после проведения через серию растворов в следующей последовательности: 3.6% (1 N) HCl (10 мин), 50% HCl (20 мин), дистиллированная вода (1–2 мин), 45%-ная уксусная кислота (20 мин), окрашивали в 4%-ном ацетогематоксилине (30–60 мин). Временные препараты готовили с использованием смеси 45%-ной уксусной кислоты и 70% -ного хлорал-гидрата (1 : 1), подкрашенной ацетогематоксилином. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа AxioScore A1 и фотографировали с помощью цифровой камеры MfC (Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$. Для каждого растения ploидность определяли на основании анализа 8–10 метафазных пластинок.

ПЦР-анализ. ДНК выделяли из фрагментов листьев диплоидных растений, имевших материнский фенотип, которые были выявлены в потомстве от каждого скрещивания: десять растений из скрещивания $\text{♀ПЛ AT}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; девять растений из скрещивания $\text{♀F}_2 \text{ V47/ПЛ AT}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$ (от четырех разных материнских растений F_2 , опыленных ЧТ); три растения из скрещивания $\text{♀KM}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; два растения из скрещивания $\text{♀ЮВ11}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$. Кроме того, выделяли также ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены эти растения. ДНК экстрагировали с помощью модифицированного ЦТАБ-метода [26], в котором для осаждения ДНК использовали изопропанол, а осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом. ПЦР-анализ проводили с праймерами для кодоминантных SSR- и Indel-маркеров, при этом использовали маркеры для всех десяти хромосом генома кукурузы (табл. 1). Реакционная смесь содержала 50 нг ДНК, 0.03 ед./мкл SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, Москва, Россия), 0.6 пМ каждого праймера, однократный ПЦР-буфер, 2.5 мМ MgCl_2 , 0.2 мМ смеси дНТФ (Синтол). Общий объем реакционной смеси – 25 мкл. Амплификацию проводили с использованием ДНК-амплификаторов MasterCycler (Eppendorf, Гамбург, Германия) и T100 (BioRad, Сингапур) при следующем режиме: начальная денатурация 94°C (4 мин); 35 циклов: 94°C (45 с), 57°C (45 с), 72°C (45 с); заключительная элонгация 94°C (5 мин) [28]. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 3%-ном агарозном геле в 0.5-кратном TAE-буфере при напряжении 50 V (8 мин), 100 V (8 мин), 180 V (до 100 мин); для визуализации использовали 0.01%-ный водный раствор бромистого этидия. Все ПЦР-анализы были выполнены в двух повторениях.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили путем сравнения до-

Таблица 1. Праймеры, использованные для генотипирования растений кукурузы, полученных в скрещиваниях с тетраплоидной линией Черная Тетра

Наименование	Хромосома	Последовательность (5' → 3')		Ссылка
		F	R	
iDp525 (Indel)	1	TATGGGAGTGAAGCCATCC	GCGTGCTGAGACTTACCTGG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889526
iDP4004 (Indel)	2	TTCTTCAAGGTGTTC AAGCC	TTGTTGAACACCGTAGAGGCG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=943083
JY_3:457 (Indel)	3	CCCAATGGTACCAGAGCTTTA	GTGGGTTACCGTCCAGGTAT	[27]
UfIDP4_31.55 (Indel)	4	TTCCGGTCTGTGATTACGTG	GATAGATGCACGCCCAAAAG	[27]
iDP1638 (Indel)	5	GCCCAAAAGTCTCAGAACAGG	TTGATAGAGCGGATGAGAGCG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=88956
Umc2036 (SSR)	5	TCAATCAAGCCCTCTCGTAAGGAAC	CTCTTGATCTCAACCGAAATCCTG	https://maizegdb.org/data_center/ssr?id=308985
Umc1870 (SSR)	5	AAGATTACGTTTAGCCCGTTCGTT	GAATTCGGATTGGAATGTTGTTTC	https://www.maizegdb.org/data_center/ssr?id=301322
iDP425 (Indel)	6	TTAACGGCACAGTGCTAACCC	TGTTGCCCTATGATGTCCTGC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889434
UfIDP7_1.2 (Indel)	7	AGAGGACCCAGCCCTTG	GCACTCGTGGTTCACAGAAAT	[27]
Umc1983 (SSR)	7	ATGGATCAGGGGAAGAGCAAG	CTGAAGGCCCTCTCGTCCCTC	https://www.maizegdb.org/data_center/ssr?id=301435
iDP452 (Indel)	8	ATGAAGGACTCTTGATGCG	TAAAGCAACGGTCTGTTATGC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889457
INDEL_139329242	9	CAACAACCTCGACTCTTGTC	AGGGCATCGGCTACAATTT	[27]
iDp1606 (Indel)	10	TGGCTCTCTTCTTCCATCC	GCCTGACTTTGTTAGGTGCC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=88925

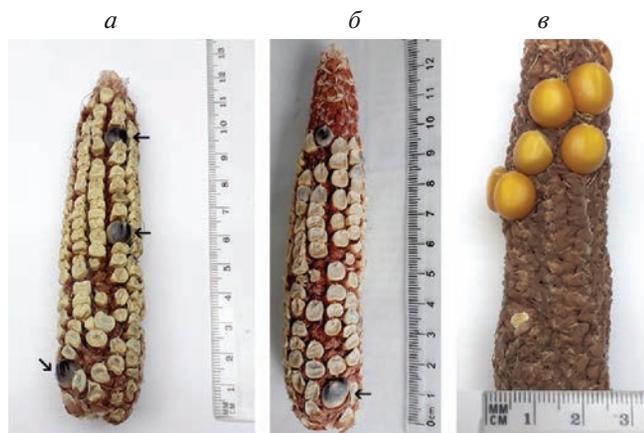


Рис. 1. Початки линии кукурузы КМ(2*n*) (а, б) и растения из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ(2*n*) (в), опыленные пылью линии Черная Тетра(4*n*). Стрелками отмечены выполненные зерновки.

лей по методу Фишера, применяющемуся для малых, а также неравновеликих выборок [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На початках диплоидных линий кукурузы, а также растений из F₂ В47/ГПЛ АТ, опыленных пылью тетраплоидной кукурузы ЧТ, в ряде случаев наблюдалось формирование полностью выполненных зерновок (рис. 1, табл. 2). На початках КМ эти зерновки имели черную окраску в результате взаимодействия маркерного гена *A* отцовской формы и гена *R* материнской линии, тогда как на початке гибрида F₂ В47/ГПЛ АТ – желтую окраску вследствие отсутствия гена *R* у данного гибрида. В результате проращивания этих зерновок были получены растения, фенотипически сход-

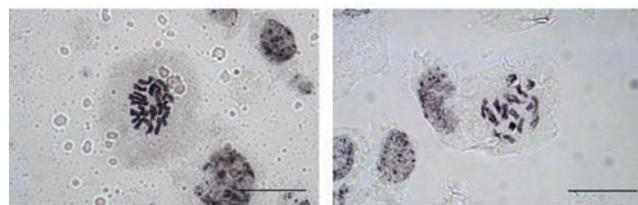


Рис. 2. Метафазные пластинки клеток корней растений, полученных из зерновок, завязавшихся в скрещивании [F₂ В47/ГПЛ АТ(2*n*) × Черная Тетра(4*n*)]. Шкала 20 мкм.

ные с материнскими линиями, которые имели диплоидный набор хромосом (рис. 2). В комбинации ♀ГПЛ АТ(2*n*) × ♂ЧТ(4*n*) было выращено 20 таких растений; в комбинации ♀КМ(2*n*) × ♂ЧТ(4*n*) – три растения; в комбинации ♀ЮВ11(2*n*) × ♂ЧТ(4*n*) – четыре растения; в комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2*n*) × ♂ЧТ(4*n*) – десять растений (от четырех разных растений F₂). При самоопылении эти растения формировали полностью озерненные початки, на которых присутствовали только нормально развитые выполненные зерновки, что следовало ожидать в случае диплоидной природы этих растений.

Диплоидные растения, полученные из выполненных зерновок, были подвергнуты генотипированию посредством ПЦР-анализа с полиморфными SSR- и Indel-маркерами, дифференцирующими тетраплоидную линию-опылитель ЧТ от материнских линий, использованных в экспериментах.

При использовании маркера JY_3:457 (хромосома 3) у двух из восьми растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2*n*) × ♂ЧТ(4*n*) (№ 9-8-8 и 9-8-10) было обнаружено присутствие обоих ам-

Таблица 2. Завязываемость зерновок на початках ряда диплоидных линий и гибридов кукурузы, опыленных тетраплоидной линией Черная Тетра (2019 г.)

Комбинация скрещивания	Число початков, шт.		Число початков с зерновками				
			всего (%) ¹	с числом выполненных зерновок			
				1–5	6–15	15–30	≥30
ГПЛ АТ-1	Контроль	9	0	–	–	–	–
	Опылено	6	2 (33.3)*	2	–	–	–
F ₂ В47/ГПЛ АТ-1	Контроль	57	2 (3.6)	2	–	–	–
	Опылено	15	5 (30.0)**	3	1	–	1
КМ	Контроль	5	0	–	–	–	–
	Опылено	12	4 (33.3)*	3	1	–	–
ЮВ11	Контроль	11	0	–	–	–	–
	Опылено	8	2 (25.0)*	–	2	–	–

Примечание. ¹ – процент початков с выполненными зерновками по отношению к числу опыленных початков; *, ** – различия между контролем и опытом значимы при *P* > 0.95 и *P* > 0.99 соответственно.

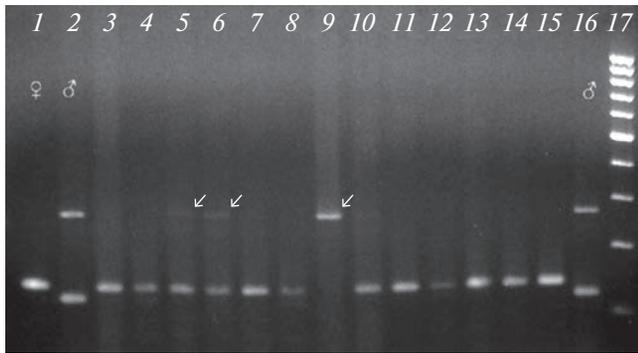


Рис. 3. Амплификация Indel-маркера JY_3:457 (хромосома 3) у растений линии ГПЛ АТ(2n) (1, 15); тетраплоидной кукурузы Черная Тетра (ЧТ, 4n) (2, 16) и диплоидных растений № 9-8-3 (3, 4), № 9-8-8 (5, 6), № 9-8-9 (7, 8), № 9-8-6 (9), № 9-8-10 (10), № 9-8-17 (11, 12), № 9-8-11 (13), № 9-8-13 (14) из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) (1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 – ДНК из листьев растений; 4, 6, 8 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены опытные растения); 17 – маркеры длины фрагментов ДНК (ООО “Синтол”). У растений № 9-8-6 (трек 9) и № 9-8-8 (треки 5, 6) отчетливо заметен фрагмент ДНК, специфичный для отцовской формы, или его следы (отмечены стрелками).

пликонов, характерных как для материнской линии, так и для линии-опылителя (рис. 3), что указывает на гибридную природу этих растений. В то же время у шести растений наблюдалась амплификация только ампликона, характерного для материнской линии. Причем, несмотря на кодоминантную природу данных маркеров, никаких признаков амплификации отцовского фрагмента в ДНК этих растений выявлено не было.

Аналогичным образом, при использовании этого маркера у растений, полученных из гибридных комбинаций ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n), ♀ЮВ11(2n) × ♂ЧТ(4n), ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), наблюдалась амплификация только ампликонов, характерных для материнских линий (табл. 3).

При использовании маркера INDEL_139329242 (хромосома 9) у ряда растений, полученных из зерновок из гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ) (2n) × ♂ЧТ(4n), определенных в экспериментах с маркером JY_3:457 как “матроклинные” (№ 5-19, 5-21, 13-1-9-1, 13-6-1), также наблюдалась амплификация только материнского ампликона (рис. 4). В то же время у других растений, определенных как “матроклинные” в экспериментах с маркером JY_3:457 (№ 13-1-9-2, 13-6-4), отчетливо был заметен ампликон линии-опылителя ЧТ, свидетельствующий об их гибридной природе (рис. 4,а). Аналогичная ситуация наблюдалась и среди растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початках ГПЛ АТ (рис. 4,б): у растений № 9-8-4, 9-8-11 и 9-8-13,

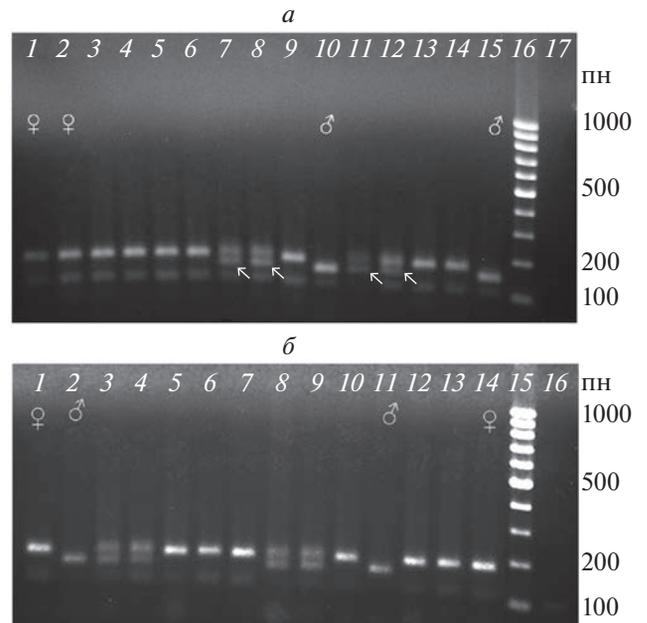


Рис. 4. Амплификация маркера INDEL_139329242 (хромосома 9) у диплоидных растений кукурузы из гибридных комбинаций ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n) (а) и ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) (б). а: 1, 2 – материнское растение из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ(2n), использованное в скрещивании с ЧТ(4n); 10, 15 – ЧТ; 3–9, 11–14 – диплоидные растения № 5-19 (3, 4), № 5-21 (5), № 13-1-9-1 (6), № 13-1-9-2 (7), № 13-1-9-6 (8), № 13-6-1 (9), № 13-6-4 (11, 12), № 8-11-4 (13, 14); 16 – маркеры ДНК; 17 – отрицательный контроль (нет ДНК). 1–3, 5–10, 11, 13 – ДНК из листьев растений; 4, 12, 14 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены растения. Стрелкой указан фрагмент ДНК, специфичный для отцовской линии. б: 1, 14 – ГПЛ АТ; 2, 11 – ЧТ; 3, 4 – № 9-8-4; 5, 6 – № 9-8-9; 7 – № 9-8-12; 8 – № 9-8-11; 9 – № 9-8-13; 10 – № 9-8-10; 12, 13 – № 9-8-8; 15 – маркеры ДНК; 16 – отрицательный контроль (нет ДНК). 1–3, 5, 7–14 – ДНК из листьев растений; 4, 6, 13 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены растения.

определенных как “матроклинные” в экспериментах с маркером JY_3:457, при использовании маркера INDEL_139329242 отчетливо наблюдалась амплификация отцовского фрагмента, указывавшая на их гибридную природу. В то же время у растений № 9-8-9 и 9-8-12 в экспериментах с маркером INDEL_139329242, так же, как и в экспериментах с маркером JY_3:457, наблюдалась амплификация только материнских фрагментов.

Учитывая эти факты, все растения, проявившие матроклинную природу при использовании маркеров JY_3:457 и INDEL_139329242, были проверены в экспериментах с другими маркерами, локализованными на остальных хромосомах генома кукурузы. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Результаты генотипирования диплоидных растений кукурузы, полученных из зерновок, завязавшихся в скрещиваниях диплоидных растений кукурузы с линией Черная Тетра(4n)

Номер растения	Хромосома, молекулярный маркер												
	1	2	3	4	5			6	7		8	9	10
	iDp525	iDP4004	JY_3:457	UfiDP4_31.55	iDP1638	Umc1870	Umc2036	iDP425	UfiDP7_1.2	Umc1983	iDP452	INDEL_139329242	iDp1606
♀ГПЛ АТ(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
9-8-9	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀	♀	♀ + ♂	=	♀	♀
9-8-12	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀	♀	♀ + ♂	=	♀	♀ + ♂
♀КМ(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
18-10-1	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♂	=	♀ + ♂	♀	♀
18-10-3	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♂	=	♀ + ♂	♀	♀
18-10-4	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	=	♀	♀	♀
♀ЮВ11(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
21-8-2	♀	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	=	♀ + ♂	=	♀	=	♀ + ♂	♀	♀	♀ + ♂
21-8-4	♀	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	=	♀	=	♀	=	♀ + ♂	♀	♀	♀
♀(F ₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
5-19	—	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	♀ + ♂	♀	♀	♀	♀
13-1-9-1	—	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	♂	♀ + ♂	♀	♀	♀ + ♂
13-6-1	—	♀	♀	♀	=	=	—	♀ + ♂	♂	♀	—	♀	—

Примечание. ♀ – амплификация только материнского аллеля; ♀ + ♂ – амплификация материнского и отцовского аллелей; ♂ – амплификация только отцовского аллеля; = – маркер не выявил полиморфизма между материнской линией и ЧТ.

Было обнаружено, что у трех изученных таким образом растений, полученных из зерновок из гибридной комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n), гибридная природа проявлялась только при использовании маркеров 7-й и 8-й хромосом, тогда как маркеры остальных хромосом указывали на матроклинную природу растений. Каждое из двух изученных растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) было гибридным по одной хромосоме: № 9-8-9 – по 7-й, № 9-8-12 – по 10-й (рис. 5, в, 15 трек). Растение № 5-19 из гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), оказалось гомозиготным по девяти материнским аллелям (девяти хромосомам), однако по одной хромосоме (седьмой) оказалось гетерозиготным.

У всех изученных растений ПЦР-анализ с праймерами, амплифицировавшими маркер 1-й хромосомы iDp525, свидетельствовал об их матроклинной природе, тогда как у тех же растений амплификация маркера десятой хромосомы iDp1606 в некоторых случаях выявляла их гибридную природу (рис. 5).

Примечательно, в некоторых случаях амплификация разных маркеров одной и той же хромосомы у одного и того же растения давала разные результаты. Так, у растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) результаты амплификации Indel-маркера UfiDP7_1.2 (рис. 6, а) указывали на их матроклинную природу, тогда как SSR-маркер UMC1983 (рис. 6, б), локализованный в другом сайте этой же хромосомы, демонстрировал их гибридную природу. Различие результатов амплификации разных маркеров одной и той же хромосомы, возможно, является следствием рекомбинации родительских хромосом в процессе онтогенеза исследуемых растений, возникших в результате гибридизации.

Интересный результат наблюдался при амплификации Indel-маркера UfiDP7_1.2 у потомства от скрещивания ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n). У двух растений – № 5-19 и 5-21, амплифицировались фрагменты обоих родителей, тогда как у растений № 13-1-9-1 и 13-6-1 – только отцовской линии (рис. 6, в). Причем у растения 13-6-1 маркер Umc1983 выявлял аллель только материнской линии. Такой результат также может быть объяснен

Таблица 4. Сравнительный анализ генотипирования растений № 18-10-3 и 5-19, полученных из зерновок из гибридных комбинаций ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) и ♀(F₂ 47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), и эндосперма этих зерновок

Исследуемый материал	Хромосома, молекулярный маркер								
	1	2	5	6	7		8	9	10
	iDp525	iDP4004	Umc2036	PiDP425	UfiDP7_1.2	Umc1983	iDP452	INDEL_139329242	iDP1606
№ 18-10-3 [♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n)]									
Растение	♀	♀	—	♀	♂	—	—	♀	♀
Эндосперм	♀	♀	—	♀ + ♂	♂	—	—	♀ + ♂	♀
№ 5-19 [♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n)]									
Растение	—	♀	♀	♀	♀ + ♂	♀	♀	♀	♀
Эндосперм	—	—	♀	♀ + ♂	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	♀	♀

Примечание см. к табл. 3.

рекомбинацией родительских хромосом и последующей элиминацией материнского или отцовского аллеля.

Результаты амплификации разных маркеров в ДНК, выделенной из листьев исследуемых растений и из эндосперма зерновок, из которых они были получены, как правило не различались между собой (рис. 4–6). Так, в случаях отсутствия отцовских маркеров у растений наблюдалось также их отсутствие и в эндосперме: к примеру, амплификация маркеров JY_3:457 у растений из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-3, 9-8-9, 9-8-17 (рис. 3, треки 3 и 4, 7 и 8, 11 и 12 соответственно, лист и эндосперм); iDP525 у растений из комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 18-10-3, 18-10-1, 18-10-4 (рис. 5,а, треки 2 и 3, 4 и 5, 6 и 7 соответственно, лист и эндосперм); INDEL_139329242 у растений из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-9, 9-8-8 (рис. 4,б, треки 5 и 6, 12 и 13 соответственно, лист и эндосперм). При амплификации маркеров обоих родителей в ДНК, выделенной из листьев, аналогичный характер амплификации наблюдался и в ДНК, выделенной из эндосперма: к примеру, амплификация маркера JY_3:457 у растения из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-8 (рис. 3, треки 5 и 6), а также маркера INDEL_139329242 у растения № 9-8-4 из той же комбинации скрещивания (рис. 4,б, треки 3 и 4).

Однако у растения № 18-10-3 из комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) было обнаружено, что результаты амплификации маркеров 6-й и 9-й хромосом (iDP 425 и INDEL_139329242 соответственно) различались при использовании ДНК, выделенной из листа и эндосперма (табл. 4). Аналогичный результат наблюдался у растения № 5-19 из

гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), у которого амплификация маркеров 6-й и 8-й хромосом также различалась в ДНК, выделенной из листа и эндосперма. У этих растений в листе наблюдалась амплификация только аллелей материнской линии, тогда как в эндосперме присутствовали аллели как материнской, так и отцовской линии. Разный характер амплификации разных маркеров в одном и том же эндосперме свидетельствует о возможной элиминации отцовских аллелей в ДНК эндосперма, подобно тому, что наблюдалось в ДНК растений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение диплоидных гибридных растений в скрещиваниях диплоидных и тетраплоидных линий — нередкое явление. Такие диплоидные гибриды могут возникать в результате формирования гаплоидных пыльцевых зерен у тетраплоидов вследствие их генетической нестабильности, вызванной, как полагают, соматической редукцией. Такое предположение ранее высказывалось в ряде работ, выполненных на *Fagopyrum esculentum* Moench [30], *Sorghum halepense* Linn. [31], *Pennisetum americanum* (L.) Leeke [32], *S. bicolor* L. (Moench) [33], *Zea mays* L. [23]. Такие диплоидные гибриды должны быть идентичны гибридам, возникающим при скрещивании обычных диплоидных индивидуумов, и в этой связи должны иметь один набор хромосом материнской линии и один набор хромосом линии-опылителя.

Представленные выше результаты генотипирования диплоидных растений кукурузы, развивающихся из выполненных зерновок, формирующихся

на початках диплоидных линий в скрещиваниях с тетраплоидным опылителем, показывают, однако, что эти растения существенным образом отличаются от таких гибридов. У растений, полученных из зерновок, сформировавшихся на початках линий ГПЛ АТ и КМ, фенотипически не отличавшихся от материнских линий, гибридность проявлялась только при анализе молекулярных маркеров двух хромосом, тогда как по восьми хромосомам растения были гомозиготны по материнским аллелям, т.е. у них отсутствовали хромосомы отцовской формы. Наличие двух наборов хромосом материнской линии может свидетельствовать о происхождении этих растений из диплоидных яйцеклеток, иначе говоря, на основе нередуцированных зародышевых мешков — одного из элементов апомиксиса. Вместе с тем амплификация молекулярных маркеров, характерных для двух хромосом отцовской линии-опылителя, свидетельствует о происхождении таких растений в результате оплодотворения. Возможно, крупные выполненные зерновки, несущие диплоидные зародыши, в проведенных нами скрещиваниях $2n \times 4n$ формируются в результате оплодотворения нередуцированных ЗМ материнских линий диплоидной пыльцой тетраплоидной отцовской формы, при этом возникает тетраплоидный зародыш, у которого в ходе последующего эмбриогенеза восстанавливается диплоидный набор хромосом за счет элиминации хромосом одной из родительских линий. Такая элиминация, по-видимому, носит неслучайный характер, и чаще всего элиминируют хромосомы тетраплоидной линии-опылителя. Хотя в некоторых случаях, по-видимому, имела место элиминация хромосом материнской линии (хромосома 7 у растения № 18-10-3, полученного на основе линии КМ, и растений № 13-1-9-1 и 13-6-1 из гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n)).

Подобная элиминация хромосом отцовской линии-опылителя известна и описана в литературе достаточно подробно. Так, возникновение гаплоидов у ячменя и у кукурузы является следствием элиминации хромосом линий гаплоиндукторов [34–38], хотя возникновение гаплоидов у кукурузы может быть обусловлено также мутацией в гене фосфолипазы, необходимой для преодоления спермием мембраны яйцеклетки [39, 40]. У тетраплоидных сортов рапса при их скрещивании с экспериментально полученными октоплоидными линиями описано появление матроклинных тетраплоидных растений [41], формирование которых авторы связывают с “индуцирующей” способностью линий-опылителей. Следовательно, образование в гетероплоидных скрещиваниях растений матроклинного типа с плоидностью, аналогичной плоидности материнской формы, — реально существующее в природе явление. Для возникновения таких растений наряду с элиминацией хромосом

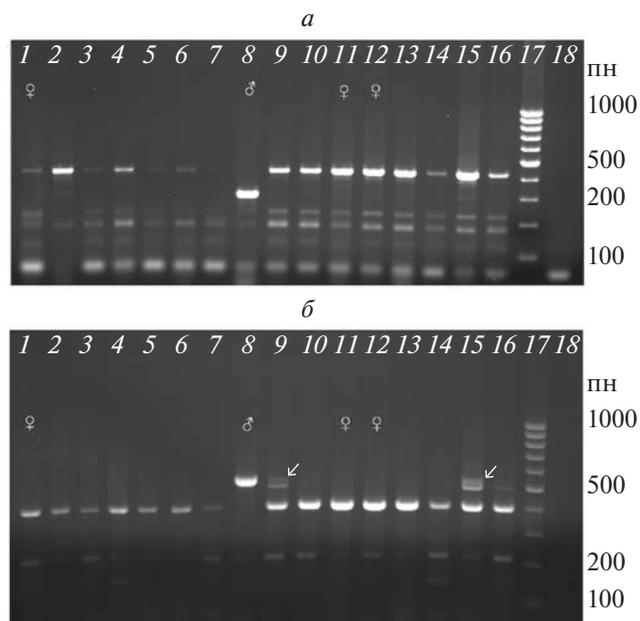


Рис. 5. Амплификация SSR-маркера iDP525 (хромосома 1) (а) и SSR-маркера iDP1606 (хромосома 10) (б) у материнских линий кукурузы КМ, ЮВ-11, ГПЛ АТ, тетраплоидной кукурузы Черная Тетра (ЧТ)(4n) и диплоидных растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початках, опыленных пыльцой ЧТ. 1 — КМ; 2–7 — диплоидные растения № 18-10-3 (2, 3), № 18-10-1 (4, 5), № 18-10-4 (6, 7) из гибридной комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n); 8 — ЧТ; 9, 10 — диплоидные растения № 21-8-2 (9), № 21-8-4 (10) из гибридной комбинации ♀ЮВ 11(2n) × ♂ЧТ(4n); 11 — ЮВ-11; 12 — ГПЛ АТ; 13–16 — диплоидные растения № 9-8-9 (13, 14), № 9-8-12 (15, 16) из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n); 17 — маркеры ДНК; 18 — отрицательный контроль (нет ДНК).

опылителя должен функционировать механизм формирования нередуцированных зародышевых мешков у материнской линии, что, возможно, имеет место у исследованных нами линий кукурузы. Нельзя, однако, исключать и возможность индуцированного опылителем удвоения хромосом яйцеклетки нормального мейотического ЗМ, которое, по-видимому, имеет место у рапса, поскольку в экспериментах китайских исследователей [41] использовались обычные ЦМС-линии, применяющиеся для получения гибридов F₁.

Обращает на себя внимание, что у всех исследованных растений маркеры пяти хромосом (1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 9-й) демонстрировали амплификацию только материнских аллелей, и на этом основании можно было бы сделать вывод о происхождении этих растений на основе апомиксиса. Однако расширение набора молекулярных маркеров позволило, во-первых, установить гибридное происхождение исследуемых растений и, во-вторых, выявить у кукурузы явление, которое можно было бы описать термином “диплоиндукция”, при кото-

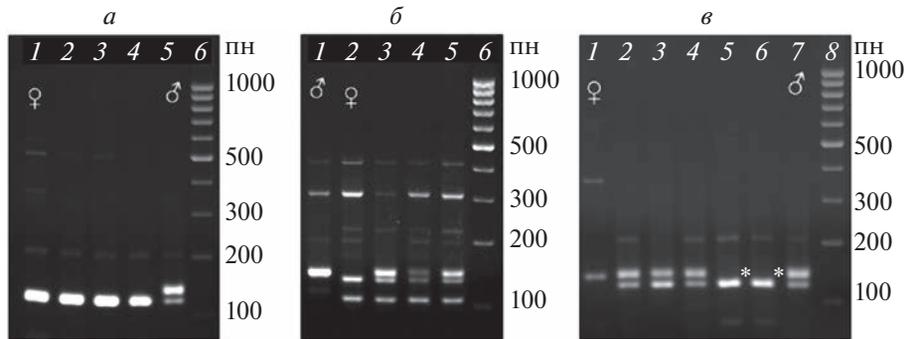


Рис. 6. Амплификация Indel-маркера UfiDP7_1.2 (*a*, *в*) и SSR-маркера Umc1983 (*б*), локализирующихся на 7-й хромосоме генома кукурузы, у потомства, полученного из зерновок, завязавшихся на початках растений ГПЛ АТ (*a*, *б*) и F₂ В47/ГПЛ АТ (*в*) после опыления пыльцой ЧТ. *a*: 1 – ГПЛ АТ; 2–4 – диплоидные растения № 9-8-9 (2), 9-8-12 (3, 4); 5 – ЧТ; 6 – маркеры длины фрагментов ДНК; 1–3, 5 – ДНК из листьев растений; 4 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 9-8-12. *б*: 1 – ЧТ; 2 – ГПЛ АТ; 3–5 – диплоидные растения № 9-8-9 (3, 4); № 9-8-12 (5); 6 – маркеры длины фрагментов ДНК; 1–3, 5 – ДНК из листьев растений; 4 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 9-8-12. *в*: 1 – материнское растение из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ, участвовавшее в скрещивании с ЧТ; 2–6 – диплоидные растения № 5-19 (2, 3), № 5-21 (4), № 13-1-9-1 (5), № 13-6-1 (6); 7 – ЧТ; 8 – маркеры ДНК; 1, 2, 4–7 – ДНК из листьев; 3 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 5-19.

ром подавляющее большинство хромосом тетраплоидной линии-опылителя элиминирует и формируется диплоидный генотип зародыша, несущий преимущественно хромосомы материнского родителя.

Механизмы, лежащие в основе элиминации хромосом тетраплоидной отцовской линии, заслуживают дальнейшего детального исследования. Объяснение элиминации отцовских хромосом в результате несбалансированности генома, свойственной отдаленной гибридизации [34, 42–44], вряд ли может быть убедительным, поскольку мы проводили скрещивания линий, принадлежащих к одному виду. В то же время элиминация отцовских хромосом в скрещиваниях с линиями-гаплоиндукторами, использующимися в качестве опылителя, которые несут мутации в гене центрального гистона CENH3 [45–47], участвующего в формировании центромеры и влияющего на расхождение хромосом, наводит на мысль, что в некоторых случаях у гибридов $2n \times 4n$ может иметь место аналогичный процесс. Не исключено, что ген центрального гистона CENH3 тетраплоидного опылителя в геноме гибридов $2n \times 4n$ может подвергаться импринтингу, а материнской гистон CENH3 в силу мутаций или эпигенетических эффектов слабо взаимодействует с отцовскими хромосомами, которые в результате этого элиминируются в ходе клеточных делений.

Примечательно, что в некоторых случаях амплификация разных маркеров одной и той же хромосомы у одного и того же растения давала разные результаты. Так, у обоих растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початке линии ГПЛ АТ, № 9-8-9 и 9-8-12, SSR-маркер 5-й хромосомы Umc2036 выявлял аллели только ма-

теринской линии, тогда как другой SSR-маркер этой же хромосомы (Umc1870) – аллели как материнской, так и отцовской линии. Эти маркеры находятся на значительном удалении друг от друга на 5-й хромосоме: Umc2036 картирован в области 6993294...7011505, тогда как Umc1870 – в области 64135849...64145035 (<https://www.maizegdb.org>). Вполне возможно, что в процессе онтогенеза у исследуемых растений имела место рекомбинация родительских хромосом, в результате чего пятая хромосома приобрела рекомбинантную природу и несла как отцовские, так и материнские маркеры. Аналогичным образом, у растения № 13-6-1 Indel-маркер 7-й хромосомы UfiDP7_1.2 (локализация в сайте 1298878 [27]) выявлял аллель отцовской линии, тогда как SSR-маркер Umc1983, локализованный на той же хромосоме (113048246...113049029) (<https://www.maizegdb.org>), – аллель материнской линии. Различие результатов амплификации разных маркеров одной и той же хромосомы, возможно, является следствием рекомбинации родительских хромосом в процессе онтогенеза исследуемых растений, возникших в результате гибридизации.

Процессы элиминации хромосом, как свидетельствуют данные рис. 4–6, протекали не только в тканях зародыша, но и в эндосперме. При этом в большинстве случаев результаты амплификации ДНК из листьев растений, полученных из зерновок с початков, опыленных ЧТ, и из эндосперма этих же зерновок совпадали между собой, за исключением растений № 18-10-3 и 5-19, полученных из зерновок из гибридных комбинаций ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) и ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n) соответственно (табл. 4). У этих растений в листе наблюдалась амплификация только

аллелей материнской линии, тогда как в эндосперме присутствовали аллели как материнской, так и отцовской линии. Такой гибридный характер эндосперма зерновки в сочетании с отсутствием отцовских аллелей у растений мог бы свидетельствовать в пользу псевдогамного апомиксиса, однако факт амплификации отцовского аллеля маркера uFIDP7_1.2 (7-я хромосома) в ДНК этих же растений отвергает эту гипотезу и указывает на их возникновение в результате двойного оплодотворения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что диплоидная природа растений, развивающихся у кукурузы из выполненных зерновок, формирующихся в $2n \times 4n$ скрещиваниях, по-видимому, является следствием оплодотворения нередуцированных зародышевых мешков диплоидных линий пыльцой тетраплоидов и последующей элиминации хромосом преимущественно тетраплоидного отцовского родителя. Гипотеза о происхождении этих растений в результате псевдогамного апомиксиса, предложенная нами ранее [23], в данном материале не нашла своего экспериментального подтверждения. Тем не менее диплоидная природа растений, гомозиготных по подавляющему большинству молекулярных маркеров материнских линий, свидетельствует о развитии таких растений на основе диплоидных яйцеклеток и, следовательно, о наличии у использованных линий способности к формированию нередуцированных зародышевых мешков — одного из основных компонентов апомиктического размножения.

Авторы благодарят д.б.н. Э.Б. Хатефова (Всемирный институт генетических ресурсов растений (ВИР) им. Н.И. Вавилова) за предоставление семян тетраплоидной линии Черная Тетра; к.б.н. А.Н. Завалишину (Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского) за предоставление семян линий ГПЛ АТ и Коричневый Маркер; д.с.-х.н. В.И. Жужукина (РосНИИСК “Россорго”) за предоставление семян линий В47 и ЮВ11; к.б.н. Г.А. Герашенкова (ИБГ УФИЦ РАН) и рецензентов за внимательное прочтение рукописи и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России согласно тематическому плану ФАНЦ Юго-Востока (тема FNWF-2022-0006).

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. *Barcaccia G., Albertini E.* Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma // *Plant Reprod.* 2013. V. 26(3). P. 159–179. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0222-y>
2. *Tavva S.S., Mohan D., Venkateswara R.Y. et al.* Apomixis in crop improvement // *Plant Biology and Biotechnology*. V. 1. Plant diversity, organization, function and improvement / Eds Bahadur B., Rajam M.V., Sahijram L., Krishnamurthy K.V. Springer, 2015. P. 656–669. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6>
3. *Fiaz S., Wang X., Younas A. et al.* Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations // *GM Crops Food*. 2020. V. 12(1). P. 57–70. <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1808423>
4. *Hand M.L., Koltunow A.M.G.* The genetic control of apomixis: asexual seed formation // *Genetics*. 2014. V. 197(2). P. 441–450. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163105>
5. *Брюхин В.Б.* Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 9. С. 1001–1024.
6. *Vijverberg K., Ozias-Akins P., Schranz M.E.* Identifying and engineering genes for parthenogenesis in plants // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00128>
7. *Worthington M., Ebina M., Yamanaka N. et al.* Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola* // *Genomics*. 2019. V. 20(1). P. 41–58. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5392-4>
8. *Xie E., Li Y., Tang D. et al.* A strategy for generating rice apomixis by gene editing // *J. Integr. Plant Biol.* 2019. V. 61(8). P. 911–916. <https://doi.org/10.1111/jipb.12785>
9. *Xiong J., Hu F., Ren J.* Synthetic apomixis: The beginning of a new era // *Curr. Opin. in Biotechnol.* 2023. V. 79. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102877>
10. *Vernet A., Meynard D., Lian Q. et al.* High-frequency synthetic apomixis in hybrid rice // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 7963. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35679-3>
11. *Sokolov V.A., Kravtchenko A.Yu., Nakagawa H., Knatypova I.Y.* Apomictic maize-*Tripsacum* hybrids: genetics and breeding perspectives // *Grassland Sci.* 2002. V. 48. P. 342–343.
12. *Белова И.В., Тараканова Т.К., Абдырахманова Э.А. и др.* Хромосомный контроль апомиксиса у гибридов кукурузы с гамаграссом // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 9. С. 1188–1191.
13. *Sarkar K.R., Coe E.H., Jr.* Origin of parthenogenetic diploids in maize and its implications for the production of homozygous lines // *Crop Sci.* 1971. V. 11. P. 543–544.
14. *Petrov D.F., Belousova N.I., Fokina E.S. et al.* Transfer of some elements of apomixis from *Tripsacum* to maize // *Apomixis and Its Role in Evolution and Breeding* / Ed Petrov D.F. New Delhi: Oxonian Press Ltd., 1984. P. 9–73.

15. Lamote V., Baert J., Roldán-Ruiz I. et al. Tracing of 2n EGG occurrence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) using interploidy crosses // *Euphytica*. 2002. V. 123. P. 159–164.
<https://doi.org/10.1023/A:1014980123519>
16. Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3249–3267.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.072181>
17. Kovalsky I.E., Neffa V.G.S. Evidence of the production of 2n eggs in diploid plants of the autopolyploid complex *Turnerasioides* L. (Passifloraceae) // *Plant Syst. Evol.* 2016. V. 302. P. 357–366.
<https://doi.org/10.1007/s00606-015-1268-0>
18. Lin B.-Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize // *Genetics*. 1984. V. 107. P. 103–115.
<https://doi.org/10.1093/genetics/107.1.103>
19. Pennington P.D., Costa L.M., Gutierrez-Marcos J.F. et al. When genomes collide: Aberrant seed development following maize interploidy crosses // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. P. 833–843.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn017>
20. Birchler J.A. Interploidy hybridization barrier of endosperm as a dosage interaction // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00281>
21. Хатевфов Э.Б., Грушин А.А., Бойко В.Н. Цитогенетические факторы снижения фертильности пыльцы и початка при засорении посевов тетраплоидной кукурузы триплоидными зерновками (*Zea mays* L.) // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183. № 1. С. 135–146.
22. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. № 3. С. 722–725.
23. Tsvetova M.I., Elkonin L.A., Italienskaya Yu.V. Diploid–tetraploid crosses as the instrument for obtaining apomictic maize plants // *Russ. Agric. Sci.* 2016. V. 2. № 3–4. P. 201–204.
<https://doi.org/10.3103/S106836741603023X>
24. Tsvetova M., Elkonin L., Italienskaya Y. Pseudogamous apomixis in maize and sorghum in diploid–tetraploid crosses // *Phyton*. 2019. V. 88. № 4. P. 389–401.
<https://doi.org/10.32604/phyton.2019.07485>
25. Мавлютова Л.И., Эльконин Л.А., Колесова А.Ю. Генотипирование диплоидных растений, полученных в результате диплоидно-тетраплоидных скрещиваний у линий и гибридов кукурузы, с генетически детерминированной способностью к партеногенезу // Вавиловские чтения – 2022. Межд. науч.-практ. конф. Саратов: Амирит, 2022. С. 137–142.
26. Шилов И.А., Колобова О.С., Анискина Ю.В. и др. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу риса *PI-TA*, *PI-B* // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 8. С. 45–48.
27. Settles A.M., Bagadion A.M., Bai F. et al. Efficient molecular marker design using the maize GDB Mo17 SNPs and indels track // *G3 (Bethesda)*. 2014. V. 4. P. 1143–1145.
<https://doi.org/10.1534/g3.114.010454>
28. Martin F., Dailey S., Settles A.M. Distributed simple sequence repeat markers for efficient mapping from maize public mutagenesis populations // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. P. 697–704.
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1341-6>
29. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1990. 424 с.
30. Сахаров В.В. Соматическая редукция как причина своеобразной мозаичности у тетраплоидной гречихи // Докл. АН СССР. 1946. Т. 52. № 4. С. 349–352.
31. Raman V.S., Krishnaswami N. A chromosomal chimera in *S. halepense* (Linn.) // *Indian J. Agric. Sci.* 1955. V. 25. P. 45–50.
32. Rao P.N., Nirmala A. Chromosome numerical mosaicism in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) // *Genome*. 2011. V. 28. № 2. P. 203–206.
<https://doi.org/10.1139/g86-028>
33. Цветова М.И., Эльконин Л.А. Нестабильность уровня плоидности у аутотетраплоидов линии сорго с вариабельной мужской стерильностью // Генетика. 2002. Т. 38. № 5. С. 641–646.
34. Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Nature*. 1970. V. 225. P. 874–876.
<https://doi.org/10.1038/225874a0>
35. Zhang Z., Qiu F., Liu Y. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Rep.* 2008. V. 27 (12). P. 1851–1860.
<https://doi.org/10.1007/s00299-008-0601-2>
36. Li L., Xu X., Jin W., Chen S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer *CAUHOI* in maize // *Planta*. 2009. V. 230. P. 367–376.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0943-1>
37. Zhao X., Xu X., Xie H. et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. № 2. P. 721–731.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.223982>
38. Qiu F., Liang Y., Li Y. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid induction in maize // *Curr. Plant Biol.* 2014. V. 1. P. 83–90.
<https://doi.org/10.5061/dryad.bt963>
39. Chenxu L., Xiang L., Dexuan M. et al. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase *a* generates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. № 3. P. 520–522.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
40. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILIN-EAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // *Nature*. 2017. V. 542. P. 105.
<https://doi.org/10.1038/nature20827>
41. Fu S., Yin L., Xu M. et al. Maternal doubled haploid production in interploidy hybridization between *Brassica napus* and *Brassica alloctaploids* // *Planta*. 2018. V. 247. P. 113–125.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2772-y>
42. Laurie D.A., Bennett M.D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses // *Ge-*

- nome. 2011. V. 32(6). P. 953–961.
<https://doi.org/10.1139/g89-537>
43. Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phillips R.L. Cytological and molecular characterization of oat \times maize partial hybrids // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 123–135.
<https://doi.org/10.1007/BF00225737>
44. Gernand D., Rutten T., Varshney A. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 2431–2438.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.034249>
45. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize // Front. Plant Sci. 2016. V. 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
46. Wang N., Gent J., Dawe R. Haploid induction by a maize *cenh3* null mutant // Sci. Adv. 2021. V. 7. № 4.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abe2299>
47. Meng D., Luo H., Dong Z. et al. Over-expression of modified CENH3 in maize Stock6-Derived inducer lines can effectively improve maternal haploid induction rates // Front. Plant Sci. 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.892055>

Elimination of Chromosomes as a Mechanism for the Formation of Diploid Plants in Diploid–Tetraploid Crosses in Maize (*Zea mays* L.)

L. A. Elkonin^a*, L. I. Mavlyutova^a, A. Yu. Kolesova^a, V. M. Panin^a, and M. I. Tsvetova^a

^aFederal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, 410010 Russia

*e-mail: lElkonin@gmail.com

One of the main components of apomictic plant reproduction is the formation of unreduced embryo sacs (ESs). Heteroploid crosses, in which maternal diploid plants are pollinated by pollen of tetraploid paternal parent, can be used as an effective tool for identifying the ability to form unreduced ESs. In maize, in crosses $2n(\text{♀}) \times 4n(\text{♂})$, as a rule, shrunken kernels with a triploid embryo are formed, in which the development of the endosperm is impaired due to the deviation of the balance of the maternal (m) to paternal (p) genomes from the ratio of $2m : 1p$. In our experiments, in several diploid maize lines, after their pollination with tetraploid pollen, the formation of large plump kernels was observed, from which diploid maternal-type plants developed, the maternal-type phenotype, as well as the hybrid endosperm phenotype, were confirmed by the expression of genetic markers. It has been suggested that the plump kernels in $2n \times 4n$ crosses arise on the basis of unreduced embryo sacs (ESs) and pseudogamous apomixis, since the fusion of diploid sperms with diploid polar nuclei provides a 2 : 1 ratio of maternal to paternal genomes in the endosperm. In order to clarify the genetic nature of diploid plants phenotypically similar to maternal lines that developed from plump kernels in $2n \times 4n$ crosses, we carried out their genotyping for all 10 chromosomes of the maize genome using polymorphic codominant SSR- and Indel-markers that differentiate the paternal line from maternal lines. As maternal lines, we used HPL AT, which has the ability to haploid parthenogenesis, KM, YuV-11, as well as the F₂ B47/HPL AT hybrid plants; and as a paternal line – Chernaya Tetra(4n). It was found that in all the plants studied, when markers of five chromosomes (1, 2, 3, 4, and 9) were used, amplification of only maternal alleles was observed. However, in each of the studied plant, when using markers of other chromosomes, cases of amplification of alleles characteristic of the paternal line were noted. A hypothesis is put forward on the formation of diploid plants in $2n \times 4n$ crosses in maize as a result of fertilization of the unreduced ESs and the subsequent elimination of chromosomes, predominantly of the pollen parent.

Keywords: apomixes, DNA markers, heteroploid crosses, elimination of chromosomes.