

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ГИНОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

© 2024 Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев¹, Ю. В. Фадеева¹, С. И. Мазиллов¹, М. И. Чумаков^{1,*}

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

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 29.05.2024 г.

В статье приведен анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) у гаплоиндуцирующих (ЗМС-8, ЗМС-П) и контрольных (КМ, ГПЛ-1) линий кукурузы саратовской селекции. С помощью секвенирования и последующего множественного выравнивания транскриптов целевых генов исследуемых в работе линий и референсной линии кукурузы В73 определено наличие однонуклеотидных замен (ОНЗ), делеций и вставок, построены филогенетические деревья по изучаемым генам. Установлено наличие 4-нуклеотидной вставки в гене *Zm_Pla1*, которая обуславливает гаплоиндуцирующую способность у предковой линии Stock 6 и гаплоиндуцирующих линий ЗМС-8 и ЗМС-П, а также 15 идентичных ОНЗ. Но элементы партеногенеза, демонстрируемые линиями АТ-1, АТ-3 и АТ-4, у которых отсутствуют вставки из четырех нуклеотидов в гене *Zm_Pla1*, имеют иную генетическую основу. Филогенетический анализ гена *Zm_Pla1* подтвердил родство гаплоиндуцирующих линий Stock6, ЗМС-П и ЗМС-8. В гене *Zm_Dmp7* зафиксировано наличие пяти ОНЗ у линии ЗМС-8 и трех ОНЗ у линий ЗМС-П и КМ. Одна из ОНЗ (в положении 131 от стартового кодона) в гене *Zm_Dmp7* является причиной повышенной гаплоиндуцирующей способности линии САУ5, но не ЗМС-П. Помимо этого, в гене *Zm_Dmp7* обнаружены 3-нуклеотидная делеция у линии ЗМС-П и 9-нуклеотидная делеция у линии КМ.

Ключевые слова: гаплоиндукция, кукуруза, мутации, полиморфизм генов.

DOI: 10.31857/S0016675824100047 **EDN:** WGDEBU

Одной из важнейших мировых сельскохозяйственных культур является кукуруза (*Zea mays* L.). В современных сельскохозяйственных биотехнологиях для ускоренного получения гомозиготных линий применяют такую особенность систем размножения растений, как гиногенез (образование гаплоидных растений при нарушениях оплодотворения яйцеклетки). У современных сортов кукурузы независимое от оплодотворения развитие зародыша (гиногенез, или матроклинный партеногенез, как частный случай) встречается крайне редко (0,01–0,1%). Однако более 60 лет назад в результате скрещиваний и селекции была получена линия кукурузы Stock 6, при использовании которой в качестве опылителя в потомстве индуцируется образование до 2–3% матроклинных гаплоидов [1].

В 2017 г. впервые установлено, что в результате скрещиваний у линии кукурузы Stock 6, полученной более 60 лет назад [1], возникла случайная мутация — в четвертом экзоне гена *Zm_Pla1*,

кодирующего белок фосфолипазу А, произошла вставка четырех нуклеотидов, что привело к сдвигу рамки считывания, замене 20 аминокислот, появлению стоп-кодона и укорочению белка [2]. В ходе последующей селекции у линий саратовской селекции на базе линии Stock 6 эффективность гаплоиндукции (ГИ) была повышена с 2 до 8–10% [3–6]. Однако пока неясно, какие мутации обуславливают повышенную ГИ-способность у линий саратовской селекции.

В 2018 г. впервые было установлено, что ген *Dmp9* регулирует слияние мембран женской и мужской гамет растений и экспрессируется специфически как в генеративных клетках, так и в спермиях [7]. Годом позже было показано, что нокаут гена *Dmp9* арабидопсиса приводит к нарушению оплодотворения в большей степени яйцеклетки, чем центральной клетки [8]. В 2019 г. было показано, что ген *Dmp7*, расположенный в локусе *qhir8* (789 тпн) у кукурузы, является ортологом гена *Dmp9*

арабидопсиса и контролирует гаплоиндукцию [9]. Ген *Dmp7* экспрессируется на поздней стадии развития пыльца кукурузы, а кодируемый им белок локализуется в плазматической мембране спермия и участвует в прикреплении спермия к поверхности яйцеклетки или центральной клетки. Роль гена *Dmp7* в гаплоиндукции кукурузы была доказана в экспериментах по нокауту гена с помощью геномного редактирования (CRISPR/Cas9) [9]. Одна однонуклеотидная замена (ОНЗ) (в положении 131 от стартового кодона) последовательности гена *Dmp7* у линии кукурузы CAU5 приводит к аминокислотной замене (метионин на треонин), что повышает гаплоиндукцию в 2–3 раза в присутствии мутантного гена *Pla1* [9].

В 2003 г. Чалык (Chalyk) с соавт. впервые была выдвинута гипотеза, что возможной причиной появления гаплоидов в потомстве линий-гаплоиндукторов кукурузы является анеуплоидия (элиминация хромосом) у части популяции мужских половых клеток, которая вызывает стимуляцию деления яйцеклетки без оплодотворения [10]. Элиминация хромосом подтвердилась у линий-гаплоиндукторов кукурузы, созданных на основе линии Stock 6 [11, 12]. Согласно [13], для CENH3-мутантов кукурузы содержание гаплоидов в потомстве может достигать 3.6%.

Элиминация хромосом и появление гаплоидов в потомстве арабидопсиса наблюдались при мутации в гене, кодирующем центромер-специфичный гистоновый белок CENH3, необходимый для прикрепления веретена в процессе митоза и мейоза. Изменения в нуклеотидной последовательности гена приводят к несовместимости и потере хромосом в первых зиготических делениях [14].

Исследования механизма анеуплоидии у кукурузы показали, что гаплоиндукция возникает при модификации N-концевого фрагмента или C-концевого складчатого гистонного домена белка CENH3 [13]. В работе [15] показано, что при ко-экспрессии гена *CenH3* дикого и мутантного типов способность к гаплоиндукции пропадает.

Цель статьи – сравнительный анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих гиногенез (наследуемый и индуцируемый) у гаплоиндуцирующих и контрольных линий кукурузы саратовской селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения

Линия кукурузы ЗМС-8 (частота ГИ – 8%) [4], производная от линии ЗМС, получена на кафедре генетики ФГБУ ВО Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (СГУ). Линия ЗМС-П (частота ГИ – 10%) была получена из потомства

самоопыленных гибридов линии ЗМС-8 (материнский родитель) и формы кукурузы с пурпурной окраской стеблей, листьев и метелок [6]. В скрещиваниях при получении линий ЗМС-8 и ЗМС-П использована линия Stock 6 [16].

Партеногенетическая линия кукурузы АТ-1 была выделена в самоопыленном потомстве гибрида линии-гаплоиндуктора Stock 6 (США, [1]) и линии Коричневый тестер (США) [см. 17]. При экспериментальной задержке опыления в зародышевых мешках у линии кукурузы АТ-1 был обнаружен высокий процент начала развития зародышей и эндосперма [17]. Однако линия АТ-1 плохо вызревала в условиях Саратовской области и поэтому была скрещена со скороспелой линией саратовской селекции ГПЛ-1 (дигаплоидизированный гаплоид, Саратов), в результате чего получена линия АТ-3 [18]. Партеногенетическая линия кукурузы АТ-4 была получена путем скрещивания линии АТ-1 с тетраплоидной линией Кр-1 (Краснодар) и последующим отбором диплоидной формы гибрида [19, 20]. Для линий АТ характерны такие элементы апомиксиса, как независимое от опыления развитие зародыша до стадии глобулы, начало эндоспермогенеза, полиэмбриония, а также псевдогамия [17, 21–23].

Линия КМ саратовской селекции без ГИ-способности имеет пурпурную окраску корней и побегов, что позволяет выявлять гаплоиды на стадии проростков [3].

Определение нуклеотидной последовательности транскриптов генов

Для выявления мутаций были секвенированы транскрипты целевых генов у исследуемых линий кукурузы. РНК выделяли из замороженных тканей (пыльца, завязи) [24, 25], получали кДНК согласно инструкции производителя ревертазы (“Евроген”, Россия). Участки кДНК исследуемых генов амплифицировали с использованием специфических праймеров (подобранные с помощью ресурса Primer-Blast для перекрывающихся фрагментов последовательностей) и набора реактивов Tersus Plus PCR kit (Кат. № РК121, “Евроген”). Затем ПЦР-продукты очищали при помощи набора Cleanup Mini (Кат. № BC023S, Евроген) и секвенировали в компаниях “Евроген” и “Синтол”.

Методы биоинформатики

Нуклеотидные последовательности генов гаплоиндуцирующих и партеногенетических линий кукурузы сравнивали между собой, с линиями, не обладающими данными признаками, и референсной линией В73 методом множественного выравнивания с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Zm_Pla1

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей транскриптов гена *Zm_Pla1* исследованных нами линий ЗМС-П и ЗМС-8, а также предковой линии Stock 6 показало присутствие вставки из четырех нуклеотидов и 15 ОНЗ (рис. 1), что свидетельствует о наследовании саратовскими линиями нуклеотидной последовательности гена *Zm_Pla1* от линии Stock 6. Филогенетический анализ и множественное выравнивание гена *Zm_Pla1* у исследуемых линий и линий из базы данных (<https://www.gramene.org>, <https://www.maizegdb.org>) показали наличие тех же 15 ОНЗ в генах *Zm_Pla1* у линий, ни одна из которых не является гаплоиндуктором. Поэтому можно предположить, что наличие 15 ОНЗ не связано с повышенной ГИ-способностью линий ЗМС-П и ЗМС-8.

Последовательности гена *Zm_Pla1* линий КМ и ГПЛ-1, которые использовались при получении линий ЗМС-8 и ЗМС-П, также не содержали 4-нуклеотидной вставки. У линии КМ обнаружен вариант нуклеотидной последовательности гена *Zm_Pla1*, содержащий семь ОНЗ. Последовательность гена *Zm_Pla1* линии ГПЛ-1 полностью совпадает с последовательностью гена *Zm_Pla1* референсной линии В73.

Мы секвенировали транскрипт гена *Zm_Pla1* партеногенетической линии АТ-1, которая была выделена среди самоопыленного потомства Stock 6 и Коричневый тестер [17] и ее производных – АТ-3, АТ-4. Вопреки нашему ожиданию последовательности *Zm_Pla1* этих линий полностью совпадают с последовательностью *Zm_Pla1* референсной линии и не имеют вставки четырех нуклеотидов и 15 ОНЗ (данные не показаны). Эти линии характеризуются наличием элементов наследуемого партеногенеза, но не обладают гаплоиндуцирующей способностью. Таким образом, ген *Zm_Pla1*, мутировавший у линии Stock 6, не был унаследован линией АТ-1 и ее производными, а наследуемый партеногенез линий АТ связан с другими генетическими детерминантами.

Вставка четырех нуклеотидов в гене *Zm_Pla1* нарушает функцию кодируемого им фермента фосфолипазы А, который осуществляет гидролиз фосфолипидов до жирных кислот. Связь этого процесса с гаплоиндукцией не вполне ясна, но предположительно дефектная фосфолипаза влияет на состав фосфолипидов мембраны и, как следствие, способность мембран спермиев и яйцеклетки к слиянию [26]. В результате спермий не может слиться с яйцеклеткой и произвести диплоидный зародыш. Вставка четырех нуклеотидов в ген *Zm_Pla1* приводит к фенотипу, как у линии Stock 6, и служит причиной образования до 2% гаплоидов в

потомстве у линии-негаплоиндуктора [27]. Какие дополнительные мутации и в каких генах дают увеличение ГИ-способности линий ЗМС-П и ЗМС-8 до 8–10%, еще предстоит выяснить.

Zm_CenH3

Нуклеотидная последовательность гена *Zm_CenH3* у линий КМ и ЗМС-8 полностью совпадает с последовательностью гена референсной линии В73, а у линии ЗМС-П несет одну ОНЗ.

Zm_Dmp7

Линии ЗМС-8 и ЗМС-П обладают высокой гаплоиндуцирующей способностью – 8–10 % [3–6]. Количество ОНЗ на 1000 нуклеотидов у гена *Zm_Dmp7* исследованных линий составляет от 6,4 до 10,4. Анализ белок-кодирующей последовательности гена *Zm_Dmp7* показал наличие пяти ОНЗ у линии ЗМС-8, а также трех ОНЗ и одной делеции из трех нуклеотидов у линии ЗМС-П по сравнению с контрольной линией В73 (рис. 2). Линия КМ несет три ОНЗ и делецию из девяти нуклеотидов в белок-кодирующей части гена *Zm_Dmp7*, последовательность гена *Zm_Dmp7* линии ГПЛ-1 совпадает с референсной последовательностью гена *Zm_Dmp7* линии В73 (данные не показаны). У линий ЗМС-8 и ЗМС-П одинаковые ОНЗ С>G в положении 431, линии КМ, ЗМС-8 и ЗМС-П несут идентичные ОНЗ в положении 457 (см. рис. 2).

Интересно отметить, что ген *Zm_Dmp7* у линии ЗМС-8 несет ту же ОНЗ (в положении 131 от стартового кодона, рис. 2), что и гаплоиндуцирующая линия кукурузы CAU5 [9], которая, как считают авторы, увеличивает гаплоиндукцию у линии кукурузы CAU5 в 2–3 раза в присутствии мутантного гена *Zm_Pla1* [9]. Однако линия ЗМС-П (ГИ – 10%), полученная при скрещивании ЗМС-8 (ГИ – 8%) с негаплоиндуцирующими линиями, не несет ОНЗ в положении 131. Таким образом, ОНЗ в положении 131 от стартового кодона в гене *Zm_Dmp7* не является причиной повышенной гаплоиндуцирующей способности линии ЗМС-П.

Для выявления филогенетического родства изучаемых линий кукурузы были построены филограммы с использованием последовательностей транскриптов генов *Zm_Pla1* (рис. 3), *Zm_Dmp7* (рис. 4).

Эволюционный анализ генов был проведен в программе MEGA 11 [28]. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [29].

Из филограммы, построенной по гену *Zm_Pla1*, видно, что линии саратовской селекции распределились по родственным группам линий из баз данных. Линии по данному гену разделились на два больших кластера или на 12 отдельных групп,

B73	181	GAGCTGGACGGACCGGAGGCGAGGCTGGCGGACTACTTCGACTACATCGCCGGAACCAGC	240
ГПЛ-1	181		240
KM	181	..A.....	240
Stock 6	181		240
ЗМС-П	181		240
ЗМС-8	181		240
B73	301	GCTGCCAAGGACATCAACCACCTTTACATGCAGAACTGCCCGGCATCTTTCCTCAGAAG	360
ГПЛ-1	301		360
KM	301	T.....G.....C.....	360
Stock 6	301	T.....G.....C.....	360
ЗМС-П	301	T.....G.....C.....	360
ЗМС-8	301	T.....G.....C.....	360
B73	541	AAGAGCACGCCTCTGAAGAACGCTCTGCTCTCGGACGTGTGCATTGGCACGTCCGCCGCG	600
ГПЛ-1	541		600
KM	541	G.....	600
Stock 6	541	G.....	600
ЗМС-П	541	G.....	600
ЗМС-8	541	G.....	600
B73	841	CTCTACACGGCGCGGAGTGCTCCCGTGGGGTATCTGCCGGTGGTCCGCAACAACGGC	900
ГПЛ-1	841		900
KM	841	C.....	900
Stock 6	841	C.....	900
ЗМС-П	841	C.....	900
ЗМС-8	841	C.....	900
B73	961	GCCGCGATGTTCCAGTCGCTCCACAGCGACGGCGACTACCTGCGCATCCAGGACAACCTCG	1020
ГПЛ-1	961		1020
KM	961		1020
Stock 6	961	A.....	1020
ЗМС-П	961	A.....	1020
ЗМС-8	961	A.....	1020
B73	1021	CTCCGTGGCGCCGCGGCCACCGTGACGCGGCGACGCCGGAACATGCGGAACGCTCGTC	1080
ГПЛ-1	1021		1080
KM	1021		1080
Stock 6	1021	A.....	1080
ЗМС-П	1021	A.....	1080
ЗМС-8	1021	A.....	1080
B73	1081	GGGATCGGGGAGCGGATGCTGGCACAGAGGGTGTCCAGGGTCAACGTGGAGACAGG----	1136
ГПЛ-1	1081		1136
KM	1081		1136
Stock 6	1081	C.....GAGC	1140
ЗМС-П	1081	C.....GAGC	1140
ЗМС-8	1081	C.....GAGC	1140
B73	1137	GAGGTACGAACCGGTGACTGGCGAAGGAAGCAATGCCGATGCCCTCGGTGGGCTCGCTAG	1196
ГПЛ-1	1137		1196
KM	1137		1196
Stock 6	1141	C.A.....	1200
ЗМС-П	1141	C.A.....	1200
ЗМС-8	1141	C.A.....	1200
B73	1197	GCAGCTCTCCGAGGAGAGGAGAACAAGGCTCGCGCGCCGCTCTCTGCCATCAACCCAAG	1256
ГПЛ-1	1197		1256
KM	1197		1256
Stock 6	1201	C..	1260
ЗМС-П	1201	C..	1260
ЗМС-8	1201	C..	1260
B73	1257	AGGCTCTAGATGTGCGTCGTACGATATCTAAGACAAGTGGCTTTACTGTCTAGTCACATGC	1316
ГПЛ-1	1257	1287	
KM	1257	1287	
Stock 6	1261	.A.....C.C.....1320	
ЗМС-П	1261	.A.....C.C.....1291	
ЗМС-8	1261	.A.....C.C.....1291	

Рис. 1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Pla1* у линий кукурузы саратовской селекции KM, ЗМС-8, ЗМС-П, ГПЛ-1, а также линий Stock 6 и B73, выполненное с использованием программы BLAST. Точками показано нуклеотидное сходство у линий кукурузы, буквами обозначены одонуклеотидные замены, дефисом — отсутствие нуклеотида.

B73	1	ATGGATCGCAGCAACGCCGGTGC	60
КМ	1		51
ЗМС-8	1		60
ЗМС-П	1	A.....	57
B73	61	CCGCCGGGCGCGGAAGGAAGCGCCGCGGTGGCGAGGGGCGTGCAGAAGACGCTCTCC	120
КМ	52		111
ЗМС-8	61	A.....	120
ЗМС-П	58		117
B73	121	AAGACGTCCATGCTGGCCAACTTCTCCCCACGGGCACGCTGCTAACCTTCGAGATGCTA	180
КМ	112		171
ЗМС-8	121	C.....	180
ЗМС-П	118		177
B73	241	CTGCTCGCGCTCTGCGCCGCTCCTGCTTCTCTTCCACTTCACCGACAGCTTCCGCGCC	300
КМ	232		291
ЗМС-8	241	A.....	300
ЗМС-П	238		297
B73	361	GGGCTCGGCGTCGAGGTGCCAGGGAGGAAAGGTACCGGCTCGCCTTCGTCGACGTCGTG	420
КМ	352	A.....	411
ЗМС-8	361		420
ЗМС-П	358		417
B73	421	CACGCTGTTCATGTCCGTGCTGGTCTTTGCGGCCGTCACGCTCGCCGACTACCGGGTCTCC	480
КМ	412	C.....G.....	471
ЗМС-8	421	G.....G.....	480
ЗМС-П	418	G.....G.....	477

Рис. 2. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Dmp7* у линий кукурузы саратовской селекции КМ, ЗМС-8, ЗМС-П и референсной линии В73, выполненное с использованием программы BLAST. Точками показано нуклеотидное сходство последовательностей гена *Zm_Dmp7* исследуемых линий с последовательностью гена *Zm_Dmp7* референсной линии В73; ОНЗ у линий КМ, ЗМС-8 и ЗМС-П обозначены буквами; дефис означает отсутствие нуклеотида. ОНЗ линии ЗМС-8, совпадающая с ОНЗ линии САУ5, подчеркнута.

у всех линий в дендрограмме *p*-расстояния ветвей не превышают 0,007 (см. рис. 3). Линии АТ-1, АТ-3 и АТ-4 входят в одну группу с референсной линией В73. Несмотря на то что линия Stock 6 аннотирована как одна из предковых для линии АТ-1 [17], ген *Zm_Pla1* не был унаследован этой линией.

Филогенетический анализ гена *Zm_Pla1* демонстрирует родство гаплоиндуцирующих линий Stock 6, ЗМС-П и ЗМС-8 и приобретение линиями ЗМС-П и ЗМС-8 способности к гаплоиндукции за счет мутации в гене *Zm_Pla1* у Stock 6 укладывается в эту концепцию. Однако линии-гаплоиндукторы ЗМС-П и ЗМС-8 объединены в группу не только с линией Stock 6, но и с негаплоиндуцирующими линиями EP1, CML277, CML69, TX303, CML103, NC358, M162W, KY21, CML247 (см. рис. 3).

На основании выявленного нами полиморфизма гена *Zm_Dmp7* построена филограмма с использованием последовательностей гена *Zm_Dmp7* линий-негаплоиндукторов, найденных в базах данных и исследуемых нами, линий ГПЛ-1 и КМ, а также линий-гаплоиндукторов – ЗМС-П и ЗМС-8 (см. рис. 4). По характеру нуклеотидных последовательностей линии кукурузы распределились в два кластера с низким значением *p*-расстояния (эволюционное расстояние) между линиями внутри кластера. Как видно из дендрограммы, один из кластеров включает линии-гаплоиндукторы

ЗМС-П, ЗМС-8 и контрольную линию ГПЛ-1 саратовской селекции.

Линия Stock 6, несущая мутацию в гене *Zm_Pla1*, являлась предковой для линий с наследуемым (АТ-1, АТ-3, АТ-4) и индуцированным (ЗМС-П, ЗМС-8) партеногенезом. Нами показано, что высокая гаплоиндуцирующая способность саратовских линий ЗМС-П и ЗМС-8 частично обусловлена наличием дефектного гена *Zm_Pla1*, унаследованного от Stock 6. Партеногенетические линии АТ несут ген *Zm_Pla1*, полностью идентичный гену *Zm_Pla1* референсной непартеногенетической линии В73, что указывает на то, что элементы апомиксиса, демонстрируемые этими линиями, обусловлены иными генетическими детерминантами.

В процессе многолетней селекционной работы нескольких групп по всему миру частоту гаплоиндукции у современных линий-гаплоиндукторов кукурузы удалось повысить с 2 до 8–15 % по сравнению с предковой линией Stock 6 [6, 16]. Ген *Zm_Pla1* определен как первый детерминирующий гаплоиндукцию с частотой 2% [27], и ведутся поиски генов повышенной гаплоиндуцирующей способности. Например, в работе [30] идентифицировали девять ОНЗ, которые были достоверно связаны с гаплоиндукцией. В работе [9] одна из ОНЗ (в положении 131) в гене *Zm_Dmp7* была определена как причина повышенной частоты гаплоиндукции

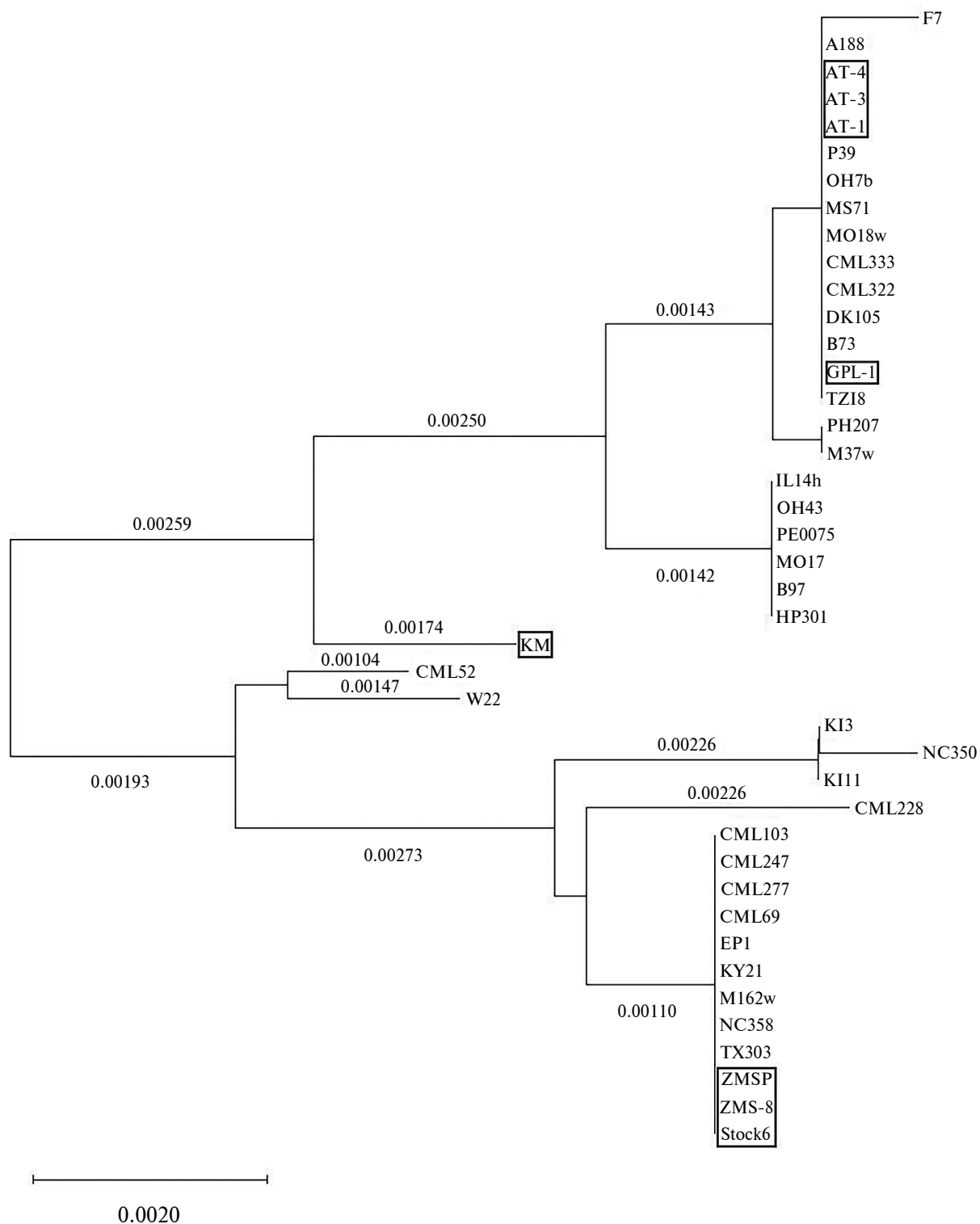


Рис. 3. Филограмма линий кукурузы по гену *Zm_Pla1*, построенная в программе MEGA 11 [по 16] (обозначения линий даны согласно авторскому оригиналу). Вариант представления с данными эволюционного расстояния для каждой из ветвей; рамками выделены изучаемые линии саратовской селекции.

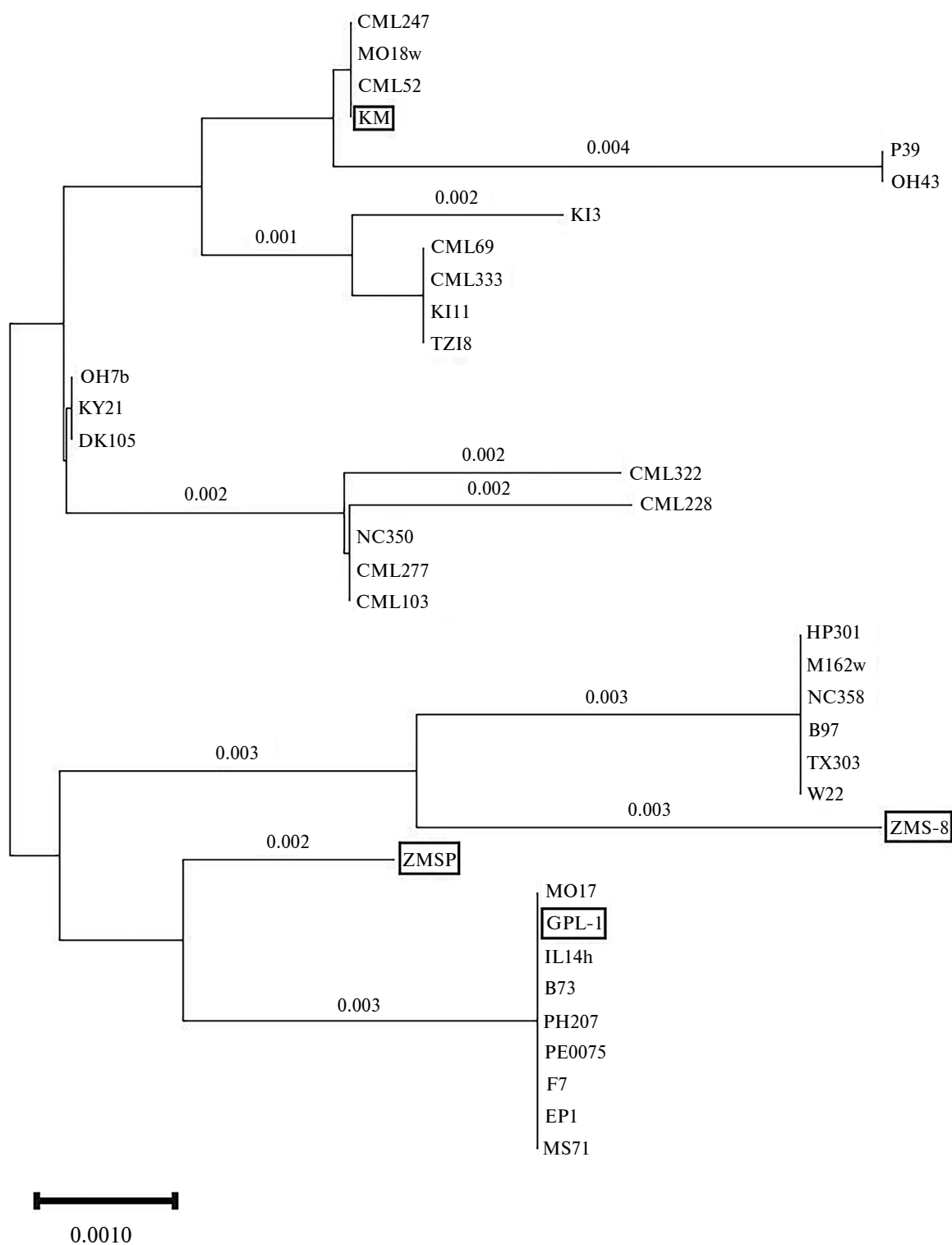


Рис. 4. Филограмма линий кукурузы по гену *Zm_DMP7*, построенная в программе MEGA 11 [по 16] (обозначения линий даны согласно авторскому оригиналу). Вариант представления с данными эволюционного расстояния для каждой из ветвей; рамками выделены изучаемые линии саратовской селекции.

в присутствии мутантного гена *Zm_Pla1*. В наших исследованиях связь этой мутации гена *Zm_Dmp7* с повышенной способностью линий саратовской селекции к гаплоиндукции не установлена.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00101). Авторы признательны Ю.В. Смолькиной, О.В. Гуторовой, А.Ю. Колесовой за предоставленные образцы кукурузы.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // *Am. Naturalist*. 1959. V. 59. P. 381–382. doi: 10.1086/282098
2. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J*. 2017. doi: 10.15252/embj.201796603
3. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1984. Т. 276. С. 735–738.
4. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // *Reproductive biology and plant breeding: XIII EUCARPIA Congr. L*. 1992. P. 221–222.
5. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // *ДАН*. 1997. Т. 353. С. 405–407.
6. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самар. науч. центра Росс. академии наук*. 2016. Т. 18. № 2. С. 341–344.
7. Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 45. Iss. 23. doi: 10.1242/dev.170076
8. Cyprys P., Lindemeier M., Sprunck S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 membrane proteins // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 253–257. doi: 10.1038/s41477-019-0382-3
9. Zhong Y., Liu C., Qi X. et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. doi: 10.1038/s41477-019-0443-7
10. Chalyk S., Baumann A., Daniel G. et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2003. V. 77. P. 29–30.
11. Zhang Z.L., Qiu F.Z., Liu Y.Z. 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. P. 1851–1860. doi: 10.1007/s00299-008-0601-2
12. 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. doi: 10.1016/j.cpb.2014.04.001
13. 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. P. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2016.00414
14. Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination // *Nature*. 2010. V. 464. P. 615–619. doi: 10.1038/nature08842
15. Wang S., Jin W., Wang K. Centromere histone H3- and phospholipase-mediated haploid induction in plants // *Plant Methods*. 2019. V. 15. Article 42. doi: 10.1186/s13007-019-0429-5
16. Hu H., Schrag T.A., Peis R. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // *Genetics*. 2016. V. 202. P. 1267–1276. doi: 10.1534/genetics.115.184234
17. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
18. Апанасова Н.В., Павлов Н.А. Новые партеногенетические линии кукурузы // *Сб. ст. Межд. науч.-практ. конф., посвящ. 135-й годовщине со дня рождения акад. Н.И. Вавилова. ВАВИЛОВСКИЕ ЧТЕНИЯ*. Саратов, 2022. С. 49–52. <https://www.vavilovsar.ru/files/ckeditor/uploads/22-12-26/1672047844/VCh2022%20SBORNIK.pdf>
19. Kolesova A.Y., Tyrnov V.S. Embryological peculiarities of tetraploid parthenogenetic maize forms // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2012. V. 85. P. 65–66.
20. Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Ye. et al. Gene expression in parthenogenetic maize proembryos // *Plants*. 2021. V. 10 (5). doi: 10.3390/plants10050964
21. Апанасова Н.В., Тумовец В.В. Цитозембриологическое изучение проявления апомиксиса у кукурузы линии АТ-3 после опыления // *Бюлл. Бот. сада Саратовского гос. ун-та*. 2003. № 2. С. 194–197.
22. Tyrnov V.S. Producing of parthenogenetic forms of maize // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 1997. V. 71. P. 73–74.

23. Tyrnov V.S., Smolkina Y.V., Titovets V.V. Estimation of parthenogenesis frequency on the grounds of genetical and embryological data // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2001. V. 75. P. 56–57.
24. Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуморова О.В., Чумаков М.И. Сравнительный анализ экспрессии генов *HAP2/GCS1*, *GEX2* у линий кукурузы саратовской селекции // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 3. С. 327–335. doi: 10.31857/S0016675823030098.
25. Моисеева Е.М., Фадеев В.В., Красова Ю.В., Чумаков М.И. Анализ мутаций генов автономного эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 9. С. 1090–1093. doi: 10.31857/S0016675823090084.
26. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимодействие гамет у кукурузы (обзор) // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 10. С. 1120–1124. doi: 10.1134/S1022795418100058
27. Liu C., Li X., Meng D. et al. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. P. 520–522. doi: 10.1016/j.molp.2017.01.011
28. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101 (30). P. 11030–11035.
29. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. P. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
30. Trentin H.U., Frei U.K., Lübberstedt T. Breeding maize maternal haploid inducers // *Plants*. 2020. V. 9 (5). P. 614. doi: 10.3390/plants90506

Comparative Analysis of Mutations of the Gynogenesis Maize Genes

Ye. M. Moiseeva¹, V. V. Fadeev¹, Yu. V. Fadeeva¹, S. I. Mazilov¹, M. I. Chumakov^{1, *}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center “Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The SNP polymorphism in gynogenesis (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) genes from haploid-inducing and control maize lines was evaluated. Using sequencing and multiple alignment methods the SNP, deletions, insertions in the target genes was established in comparing with the reference B73 maize line, and the phylogenetic trees were prepared. The presence of a 4-nucleotide insertions (4NI) and 15 identical SNP in the *Zm_Pla1* gene of the ancestral Stock 6 and haploid-inducing ZMS-8 and ZMS-P maize lines and the absence of 4NI in the *Zm_Pla1* gene in parthenogenetic as well as control maize lines were established. Phylogenetic analysis of the *Zm_Pla1* gene confirmed the relationships between Stock 6 and haploid-inducing ZMS-P and ZMS-8 maize lines from Saratov. The presence of 5 SNPs in the *Zm_Dmp7* gene of the ZMS-8 line, 3 SNPs and one 3-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene of the ZMS-P line, 3 SNPs and a 9-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene of the KM line were observed. The SNP (at position 131 from the start codon) in the *Zm_Dmp7* gene is the reason for the increased haploid-inducing ability in CAU5, but not for ZMS-P maize line. Additionally, the 3-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene in the ZMS-P maize line and a 9-nucleotide deletion in the KM maize line were observed.

Keywords: haploid-induction, maize, mutations, gene polymorphism.