

ГЕНЫ ПАРТЕНОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ

© 2024 г. Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев¹, Ю. В. Фадеева¹, С. И. Мазилев¹,
А. Ю. Колесова², М. И. Чумаков^{1,*}

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

²Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, 410010 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 31.07.2024 г.

Принята к публикации 06.08.2024 г.

Приведен анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, предположительно связанных с партеногенетическим развитием зародыша и эндосперма у кукурузы. С помощью секвенирования и последующего множественного выравнивания транскриптов целевых генов (*Hdt104*, *Chr106*, *Fie1* и *Fie2*) исследуемых в работе партеногенетических линий АТ-1, АТ-3 и АТ-4 и референсной линии кукурузы В73 определено наличие однонуклеотидных замен, делеций и вставок, построены филогенетические деревья по изучаемым генам.

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

DOI: 10.31857/S0016675824120057 **EDN:** WANBDA

Половое размножение является доминирующим, но не единственным способом размножения у покрытосеменных растений. Бесполое размножение семенами (апомиксис) существует у многих видов растений, включая злаки [1], и является запасным вариантом размножения для растений в отсутствие опылителя или при расхождении сроков созревания яйцеклетки, центральной клетки и спермиев в неблагоприятных погодных условиях. При апомиксисе эмбрион и эндосперм начинают развиваться спонтанно, без опыления.

Апомиксис у растений возникает в результате переключения с полового размножения на бесполое при запуске каскада генов (программы) в условиях отсутствия опыления [2–5]. За последние годы получен ряд данных, касающихся сравнительной экспрессии генов метилирования ДНК у современных сортов кукурузы с исключительно половым размножением и апомиктичных гибридов кукурузы и трипсакума [6–8].

Апомиксис, как правило, не наблюдается у культурных форм растений, поскольку традиционная селекция культурных растений на протяжении тысячелетий проводилась человеком путем гибридизации и отбора (т. е. путем полового размножения). Например, дикий предок кукурузы трипсакум (*Tripsacum dactyloides* L.) и гибриды кукурузы и трипсакума способны к апомиктичному способу

размножения [1, 2, 9]. А кукуруза (*Zea mays* L.) в ходе селекции человеком в течение нескольких тысяч лет приобрела ряд важных агрономических свойств, но потеряла некоторые признаки дикого предка, в частности способность к бесполому размножению [10].

Предполагается, что апомиктичные формы растений могут репродуцироваться непосредственно производителями сельскохозяйственной продукции без помощи семеноводческих хозяйств, поскольку не требуется получения гибридов, что значительно снижает затраты на получение, хранение, поддержание, транспортировку семенного материала, сокращает зависимость от зарубежных производителей семян.

Путем скрещиваний и селекции во второй половине XX и начале XXI в. в Саратове (Россия) были получены уникальные линии, у которых зафиксированы элементы апомиксиса: независимое от опыления начало развития эмбриона и эндосперма (автономный матроклинный партеногенез). В частности, саратовскими селекционерами около 40 лет назад была получена линия кукурузы АТ-1 [11] и ее производные АТ-3 [12], АТТ [13], АТТМ [14], у которых автономные (без опыления) эмбрио- и эндоспермогенез наблюдались с повышенной (6–50% и более) частотой.

Линия АТ-1 выделена в самоопыленном потомстве гибрида, полученного после скрещивания линий Stock 6 и Коричневый тестер [11]. Для линии АТ-1 характерен наследуемый тип партеногенеза с независимым от опыления эндоспермогенезом, полиэмбрионией, образованием гаплоидов в потомстве. Этот признак контролируется генами, расположенными в ядре растительной клетки. Но линия АТ-1 плохо вызревала в условиях Юго-Востока России. У более скороспелой линии АТ-3 партеногенетические зародыши развивались из неопыленных яйцеклеток через 7–10 дней после появления пестичных рыльцев [12]. У тетраплоидной линии АТТ (исходной для диплоидной линии АТ-4) было обнаружено 0.6% зародышевых мешков с развивающимися зародышами (от двухклеточных до глобулярных (93 клетки)) [13]. На данный момент известен ряд генов, которые связывают с независимым от опыления началом развития эмбриона и эндосперма.

Кандидатами для изучения генов, связанных с независимым от опыления развитием зародыша и эндосперма у кукурузы, являются гены с различным уровнем экспрессии при половом и апомиксическом развитии [8, 15–18].

Установлено, что подавление экспрессии генов, кодирующих хроматин-модифицирующие белки (ХМБ) (*Chr106*, *Hdt104*, *Hon101*), и генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы (*Dmt102*, *Dmt103*, *Dmt105*), коррелирует с признаками апомиксиса у гибридов кукурузы и трипсакума [8, 19]. Уровни экспрессии ХМБ у партеногенетических линий (АТ-3 и АТ-4) и обычных линий кукурузы (ГПЛ-1) существенно не различались, за исключением генов *Hon101* и *Hdt104* [20]. Уровни экспрессии *Hon101* и *Hdt104* были в 3 и 1.4 раза ниже соответственно в зародышевых мешках линии АТ-3 по сравнению с таковыми у линии ГПЛ-1. Кроме того, уровень экспрессии гена *Hon101* был в 2 раза ниже в эндосперме линии АТ-3, чем в эндосперме линии ГПЛ-1 [20]. Гены метилирования ДНК (*Dmt103*, *Dmt105*) и гены, кодирующие ферменты, модифицирующие хроматин (*Chr106*, *Hdt104*, *Hon101*), имели значительно более высокий уровень экспрессии в партеногенетических зародышах линии АТ-4 по сравнению с неопыленными зародышевыми мешками [21]. Изменение экспрессии генов *Hdt104*, *Hon101* может быть связано с переходом к партеногенетическому развитию у линий АТ.

Гены, контролирующие у кукурузы развитие эндосперма (fertilization independent endosperm, *Fie*), входят в Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) [22]. PRC2 представляет собой четырехсубъединичный гистон-метилтрансферазный комплекс, который катализирует триметилирование лизина 27 на гистоне H3 (H3K27me3), что способствует изменению структуры хроматина и длительной репрессии генов [22]. У *Arabidopsis thaliana* (резуховидки Таля)

идентифицированы три гена, которые контролируют независимое от оплодотворения развитие семян: *FIS1/MEDEA*, *FIS2* и *FIS3/FIE* [23–25]. В отличие от резуховидки Таля, имеющей единственный ген *Fie*, у кукурузы [15] и риса [26] обнаружены два гена *Fie*. Для мутантов *Osfie2* риса показано автономное образование зародышеподобной структуры в отсутствие оплодотворения, а для двойных мутантов *Osfie1/Osfie2* – автономное образование эмбриона и эндосперма с высокой частотой [27]. Аналогичные структуры наблюдались и у партеногенетических линий кукурузы АТ [11, 28].

У кукурузы и риса *Zm_Fie2* является, вероятно, репрессором развития эндосперма до опыления [15, 16, 18]. Экспрессия *Zm_Fie1* зарегистрирована исключительно в центральной клетке кукурузы после опыления [15, 16, 18]. У партеногенетической линии кукурузы АТ-4 в 2021 г. нами был впервые зафиксирован необычный характер экспрессии генов *ZmFie1* и *ZmFie2* по отношению к непартеногенетическим линиям, наряду с экспрессией некоторых генов, контролирующих хроматин-модифицирующие белки, что может явиться причиной спонтанного (без опыления) развития зародыша и эндосперма [21]. В дальнейшем предстоит выяснить, какие гены связаны с наследуемым партеногенезом у линий кукурузы саратовской селекции и какие изменения нуклеотидной последовательности генов и функционирования кодируемых белков привели к этому.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения

Партеногенетическая линия кукурузы АТ-1 была выделена в самоопыленном потомстве гибрида линии-гаплоиндуктора Stock 6 (США) [29] и линии Коричневый тестер (США) [11]. Линия АТ-3 была получена путем скрещивания линии АТ-1 со скороспелой линией саратовской селекции ГПЛ-1 (дигаплоидизированный гаплоид, Саратов) [28]. Партеногенетическая линия кукурузы АТТ была получена путем скрещивания линии АТ-1 с тетраплоидной линией Кр-П-1 (Краснодар) и последующим отбором диплоидной формы гибрида из тетраплоидной партеногенетической линии АТТ [13, 30]. В потомстве линии АТТ среди 850 тетраплоидных растений было обнаружено одно диплоидное растение, отличавшееся от тетраплоидов меньшей высотой и более ранним цветением. В течение нескольких лет проводился отбор растений с наибольшим количеством двоен и гаплоидов, а также с высокой частотой автономных зародышей, в результате чего была получена линия АТ-4. Для всех линий АТ характерны такие элементы апомиксиса, как независимое от опыления развитие зародыша

Таблица 1. Праймеры для секвенирования генов партеногенеза кукурузы

Название гена	Праймер	Последовательность нуклеотидов 5'→3'
<i>Chr106</i>	seq1-1-F	TCTCGGCCTGTTCCCTTCTAT
	seq1-1-2-R	GAAGCTGGTCTTCGTCCTTG
	seq1-2-F	GACGAAGACCAGCTTCTGGA
	seq1-2-R	CGACTTCAACTTCCCACCAGT
	seq2-F	AAAAGGCCAAGACAGCAGTG
	seq2-R	TCCCAGTCAAAGGAGCTTG
	seq3-F	ATTGAGGGAGATGAAGCGCA
	seq3-R	TGCGTGCAAGTAGGGAAGTT
	seq4-F	TGGAACAACAAGCCTTTATCC
	seq4-R	GCGTTAGGCTTTGCTCTTTC
	seq6-F	GTGGTGATAGGCAAGGGACA
	seq6-R	AACCGATAAAGCATGGCAGT
<i>Hdt104</i>	seq1-F	CAATGGAGTTCTGGGGTGAA
	seq1-R	TCTTCTTGCCAACTACTACCTCA
	rt-F1	ACCCTAAACCCAGCACCAG
	seq2-F	TGGTGATGATGATGATTTCAGTG
	seq2-R	TTTGGGGGACTTCTTGTCAG
	seq3-F	CAACTTCTCATCCTGCAAAGC
<i>Fie1</i>	seq3-R	GGCCTTACGGGTCACAATAA
	seq1-F	CCGCCACCATATAGAACCAC
	seq1-R	AAATTGAACCCGATGGCATA
	seq2-F	TATGCCATCGGGTTCAATTT
	seq2-R	CAGCCCCTGCAAAGACTAAG
	seq3-F	CTGCCAGCAAGGATGAATCT
	seq3-R	GGACTGCACTTCCCAGACAT
	seq4-F	CAGATGGCAATAGGCAACAA
<i>Fie2</i>	seq4-R	TCCACGGTGCAAATTAACAA
	seq1-F1	GCGGAACCGGAAATCTTG
	seq1-R1	AGATTCATCCTTGCTTGACAGA
	seq1-F2	GCCATGGCGACTCAATAAAT
	seq1-R2	TGGACTGTACTTCCCACACG
	seq1-F3	GCGATAGGCAACCGTGAA
	seq1-R3	TTTCCACCAACGGATTCAAC

до стадии глобулы, начало эндоспермогенеза, пол-
лиэмбриония, а также псевдогамия [31, 32].

Определение нуклеотидной последовательности транскриптов генов

РНК выделяли из завязей початков, материал замораживали и хранили при -70°C . кДНК получали согласно инструкции производителя ревертазы (Евроген, Россия). Участки кДНК исследуемых генов амплифицировали с помощью набора реактивов Tersus Plus PCR kit (Кат. № PK121, Евроген) и специфических праймеров (Евроген) для получения перекрывающихся фрагментов последовательностей. Праймеры подбирали с помощью ресурса Primer-Blast (табл. 1).

ПЦР-продукты очищали при помощи набора Cleanup Mini (Кат. № BC023S, Евроген) и секвенировали в компаниях Евроген (Россия) и Синтол (Россия). Транскрипты генов *Chr106*, *Hdt104*, *Fie1* использованных в статье линий кукурузы были секвенированы и представлены в базе данных GenBank (см. Результаты и обсуждение).

Методы биоинформатики

Нуклеотидные последовательности кодирующих ХМБ и *Fie* генов партеногенетических линий кукурузы сравнивали между собой, с линиями, не обладающими данными признаками, и референсной линией В73 методом множественного выравнивания с использованием программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Филогенетический анализ генов был проведен в программе MEGA 11 [33]. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [34].

Микроскопический анализ зародышевых мешков кукурузы

Семяпочки кукурузы фиксировали и окрашивали, как описано в работе [20]. Анализ препаратов проводили под микроскопом AxioScope A1 (Karl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для экспериментальной задержки опыления изоляцию рылец линии кукурузы АТ-4 осуществляли пергаментными пакетами на 7–14 дней. У партеногенетической линии кукурузы АТ-4 без опыления наблюдаются элементы апомиксиса, такие как независимое от опыления развитие зародыша до стадии глобулы, начало эндоспермогенеза (рис. 1).

Как видно из рис. 1, неопыленный (10 дней после изоляции рылец) зародышевый мешок (ЗМ)

кукурузы линии АТ-4 содержит развивающийся партеногенетический (36-клеточный) зародыш и 4-ядерный партеногенетический эндосперм. Эмбриологический анализ зародышевых мешков семи растений линии АТ-4 (2021–2022 гг.) в отсутствие опыления (через 7–10 суток после появления рылец) показал, что автономные зародыши у них формируются с частотой 28–52% и содержат от двух до 120 клеток. У трех растений выявлено автономное развитие эндосперма, содержащего от двух до 16 ядер (1–8% зародышевых мешков). В нескольких мегагаметофитах наблюдалось одновременное развитие автономного зародыша и эндосперма (рис. 1). У растений исходной тетраплоидной линии АТТ частота автономного эмбриогенеза была значительно ниже, чем у диплоидной линии АТ-4, и составляла 0.5–5.9% [13].

Как правило, у линий АТ развивающиеся партеногенетические зародыши и эндосперм начинают деградировать на 12–14 день после изоляции рылец. Полностью развившихся без опыления зародыша и эндосперма не удавалось наблюдать в многолетних исследованиях на большом статистическом материале (250–300 тыс. зародышевых мешков) [35]. Одной из возможных причин можно назвать несоответствие пloidности эндосперма у спонтанно делящейся центральной клетки и отсутствие соответствующих сигнальных молекул для развивающегося зародыша. Но тем не менее у части ЗМ (0.5–5.9%) линии АТТ происходит деление яйцеклетки и центральной клетки [13]. Примерно

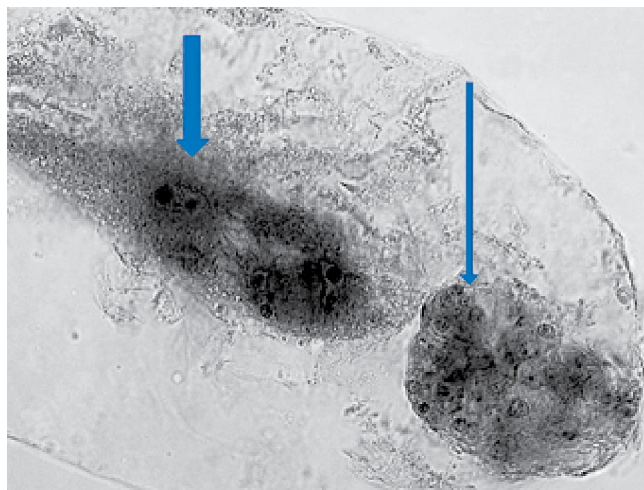


Рис. 1. Зародышевый мешок (ЗМ) кукурузы диплоидной линии АТ-4, содержащий партеногенетические зародыш и эндосперм. Неопыленный ЗМ выделен через 10 дней после изоляции пестичных нитей. Полевой сезон 2022 г. Тонкой стрелкой показан партеногенетический (36-клеточный) зародыш; толстой стрелкой показан 4-ядерный партеногенетический эндосперм. Ув. $\times 400$, микроскоп – Axio Scope A1 (Karl Zeiss, Германия).

Chr106_B73	1	ATGCTGGAAGGGATGCTAGTGGCCGTCGCCAATGGGTGAAGCGGATGGCCGCCGCC	60
Chr106_KM	1	60
Chr106_AT-4	1A.....	60
Chr106_AT-3	1	60
Chr106_B73	61	ACCGCCGCCGCCGCTAAGGCAGATTCTCTTAATCCGTTCTGGAGGACGAAAAATTTCT	120
Chr106_KM	61	120
Chr106_AT-4	61G.....	120
Chr106_AT-3	61	120
Chr106_B73	121	GAATCCAAGAATGGGAACGCTTCTTAGCCACGGAGCCAGTTAAGCAAGGGACGAGACC	180
Chr106_KM	121	180
Chr106_AT-4	121A.....A.....	180
Chr106_AT-3	121	180
Chr106_B73	181	TCGGACGATTTTGTGGATGCAATGATGTCCTCTCTGTGACCATGAAATCGACAGTGCC	240
Chr106_KM	181	240
Chr106_AT-4	181	..A.....	240
Chr106_AT-3	181	240
Chr106_B73	241	GATGTGCCCCCTGCTCTTGAGGCAGTCAAGGACGAAGACCAGCTTCTGGAGCTGGCAAG	300
Chr106_KM	241	300
Chr106_AT-4	241	300
Chr106_AT-3	241	300
Chr106_B73	301	GAGGAGAAATTTGATGATTTCTTGGATGACGGTTTATCTATACCTATTGATCTTGAGGCC	360
Chr106_KM	301	360
Chr106_AT-4	301	360
Chr106_AT-3	301	360
Chr106_B73	361	AAGAATGCTGATGTATCCCTGATCACAGAAGCAATGAAAAGGAAGAAGACAGCTCGAG	420
Chr106_KM	361	420
Chr106_AT-4	361	420
Chr106_AT-3	361	420
Chr106_B73	421	GAGCGCCGATTAAAGCAGAGGAAGAAGGAGGAGGAGGAGGAATGCAAAA	480
Chr106_KM	421	..A.....	480
Chr106_AT-4	421	480
Chr106_AT-3	421	480
Chr106_B73	481	CTTGCTTTTGATCCTGAGTCGGGTATAGCAAGTTAGATGAGCTACTGACGAAGACAAA	540
Chr106_KM	481	..C.....	540
Chr106_AT-4	481C.....	540
Chr106_AT-3	481	540
Chr106_B73	541	CTATTTTCAGAGTTCTTACTTCTGAGAAATGGATAAAATCGCCGATGAAGTTGTTGAACCT	600
Chr106_KM	541T..T.....	600
Chr106_AT-4	541T..T.....	600
Chr106_AT-3	541	600
Chr106_B73	601	CAAGGTGAAGAGTCAACCATAGCAAGAAGAAAAGACGTGGCCGAAGGAGGAAGCTAAT	660
Chr106_KM	601	660
Chr106_AT-4	601	660
Chr106_AT-3	601	660
Chr106_B73	661	GCCACACCACAAATCAATGATAAAAGGCCAAGACAGCAGTGGCAGCCATGCTTACAAGA	720
Chr106_KM	661	720
Chr106_AT-4	661	720
Chr106_AT-3	661	720
Chr106_B73	721	TCTCTGAAGATCGCTCTGCTGATGACTCTACTCTCTCGGAAGAAGAAGGTTGAAAAA	780
Chr106_KM	721T.....	780
Chr106_AT-4	721T.....	780
Chr106_AT-3	721	780
Chr106_B73	1441	aaaagaagGGTTCACTGTGTTTCAAGCTTCATGCCATTTCGGCCCATTTCTTCTGAGA	1500
Chr106_KM	1441	1500
Chr106_AT-4	1441C.....	1500
Chr106_AT-3	1441	1500
Chr106_B73	1501	CGGATGAAGGAGGATGTAGAACAATGCTTCCACGGAGCAAGGATATCATTTATGCT	1560
Chr106_KM	1501	1560
Chr106_AT-4	1501	1560
Chr106_AT-3	1501	1560
Chr106_B73	1561	AACATGACTGAGTTTCAAGAAGCAATCCAGGATCACTTAGTTGAGAAAACCTTTGATGTC	1620
Chr106_KM	1561	1620
Chr106_AT-4	1561	1620
Chr106_AT-3	1561T..T.....	1620
Chr106_B73	1621	TACTTGAATGATGAATCAGATA-TTG-TGTTGCTAGACCTGGCATCAAGACAAAGCTAA	1678
Chr106_KM	1621	1678
Chr106_AT-4	1621	1678
Chr106_AT-3	1621T..T..TCCTTC..CC.....	1678
Chr106_B73	1679	ATAGTCTCTTTATTCATTTGAGGAAGAACTCGGCCCATCTGATCTTTTGGAGCTGCAAT	1738
Chr106_KM	1679	1738
Chr106_AT-4	1679	1738
Chr106_AT-3	1679	1738
Chr106_B73	1739	TTGGAACAACAAGCCCTTATCCACCTGTAAATAAGCTTTAGAGCAATGGCAATTTTC	1798
Chr106_KM	1739	1798
Chr106_AT-4	1739	1798
Chr106_AT-3	1739	1798
Chr106_B73	1799	AGCTTCGGACAGGCTACTAATTCCTTCTTGCACGCAAGCATAGGTTCTAATATTCT	1858
Chr106_KM	1799A.....	1858
Chr106_AT-4	1799	1858
Chr106_AT-3	1799	1858
Chr106_B73	1859	SACAATGGACAAAAGTTTGGACATCTCTGAGTATTACCTAGATTCAAAAGGCTTGGGG	1918
Chr106_KM	1859	1918
Chr106_AT-4	1859	1918
Chr106_AT-3	1859	1918
Chr106_B73	1919	TTTCAGAAATTGATGGTAGCTGTTAATTTGGAAGAGAGCGCGGCAGATAGCAGATTTA	1978
Chr106_KM	1919	1978
Chr106_AT-4	1919A.....	1978
Chr106_AT-3	1919	1977
Chr106_B73	1979	ATGATTGGAATAGCAGTCTGAATGCTTTATTCTGAGCACAGGGCTGGCGGACTTGTA	2038
Chr106_KM	1979	2038
Chr106_AT-4	1979	2038
Chr106_AT-3	1978	2037
Chr106_B73	2039	TCAACCTTACTTCTGCTGATACATGATCCTTTATGACAGTACTGGAATCCTCAGATGC	2098
Chr106_KM	2039	2098
Chr106_AT-4	2039	2098
Chr106_AT-3	2038	2097

Рис. 2. Вываривание нуклеотидных последовательностей транскриптов гена *Zm_Chr106* линий KM, AT-3 и AT-4 и референсной линии B73. Точками показано нуклеотидное сходство с последовательностью референсной линии B73; ОНЗ у линий KM, ЗМС-8 и ЗМС-П обозначены буквами; дефис обозначает отсутствие нуклеотида, рамка обозначает вставку нуклеотида; на рисунке представлены фрагменты гена, в которых обнаружены мутации.

B73	61	ACTGGGACTGTTGGCCAACTCGAAACCTGGCTCATCATCGACGAACGAGGGGAAGCAACAG	120
AT-1	61C.....	120
AT-3	61	120
AT-4	61C.....	119
B73	481	TCACCGCTGTTGGTGGCCGCAAGGAATCGGATCATTCGGGTCAATTTGTGCTACC	540
AT-1	481T.....	540
AT-3	481	540
AT-4	480T.....A.....	539
B73	781	ACTGTGAAATTTGGTCAATGAAAGAAATTTTGGATATATGTTGAAAAATCATATTCAATGG	840
AT-1	781G.....	840
AT-3	781	840
AT-4	780G.....	839
B73	841	ACTGGCCATCCATCAAAGTTTCCAACGAGGAATATCCAGTTTCCGGTCTTGACTGCTGCA	900
AT-1	841	900
AT-3	841A.....	900
AT-4	840	899
B73	961	GTAAAGAATGCAGTTTTCGCTTTGGGAACCAAAACCAAGCGTAGGCCTGGGAGGGG	1020
AT-1	961T.....	1020
AT-3	961	1020
AT-4	960	1019
B73	1021	AGTGTGATGTTCTTCAGAAGTACCCGGTGCCAAAGTGTTTATGTTTATGAAATTT	1080
AT-1	1021	1080
AT-3	1021C.....	1080
AT-4	1020	1079
B73	1321	CAAGCTGCTGCCGCCGCCGGTGTTCGGTGCCGGTGCCGACGCCGACGCCGAC	1380
AT-1	1321	1380
AT-3	1321	1374
AT-4	1320	1379
B73	1381	GCCTCAGCCGACACGCCCTCGCCGCCGCCGGTTCACATCCGATCGTACTCCCTCCTGCTT	1440
AT-1	1381T.....	1440
AT-3	1375	1434
AT-4	1380T.....	1439
B73	1441	GATTAGCTTTACCCATTGGTATGTTTGGTTTCAGAGTCGCCAGATCTAGTGTGTGGCTGA	1500
AT-1	1441C.....G.....	1500
AT-3	1435	1494
AT-4	1440C.....G.....	1499
B73	1501	ACGTTGAATGTTAGGATGCTGCTGTTTGTATGCTCTGAGTCTTGAGTTCACTTTGTAA	1560
AT-1	1501C.....T.....	1560
AT-3	1495	1554
AT-4	1500C.....T.....	1559
B73	1561	TTTGACCGTGGATGAGATGAATAACTTGACGTTGCAA	1598
AT-1	1561	1598
AT-3	1555T.....	1592
AT-4	1560	1597

Рис. 3. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Fie1* линий кукурузы саратовской селекции и референсной линии B73. Точками показано нуклеотидное сходство с последовательностью референсной линии B73; ОНЗ у линий AT-1, AT-3, AT-4 обозначены буквами; дефис обозначает отсутствие нуклеотида; на рисунке представлены фрагменты гена, в которых обнаружены мутации.

такой же процент (до 6) спонтанных проэмбрио наблюдается у партеногенетической линии AT-3 [30]. У линии AT-1, исходной для линий AT-3 и AT-4, частота появления спонтанных зародышей составляла 82%, а ядер эндосперма – 52% [36]. Что является триггером начала спонтанного деления яйцеклетки и центральной клетки, пока неизвестно.

Zm_Hdt104

Сиквенсы гена *Zm_Hdt104*, кодирующего гистоновую деацетилазу линий кукурузы AT-3 и AT-4, представлены нами в базе данных GenBank (MW222955.1 (AT-3) и OK557951.1 (AT-4)). Нуклеотидные последовательности транскрипта гена *Zm_Hdt104* линий AT-4 и AT-3 сравнивали с последовательностью мРНК *Zm_Hdt104* референсной линии B73 (NM_001148367.1). У линии AT-4 однонуклеотидных замен (ОНЗ) обнаружено не было, у линии AT-3 выявлено шесть ОНЗ. Как влияют

обнаруженные ОНЗ на функцию белка HDT104 у линии AT-3, пока неизвестно.

Zm_Chrl06

Ген кукурузы *Zm_Chrl06* кодирует белок, который участвует в ремоделировании хроматина. Транскрипты гена *Chrl06* кукурузы секвенированы и представлены нами в базе данных GenBank (MW441336.1 – для линии KM и OL649771.1 – для линии AT-4). Полученные нуклеотидные последовательности транскрипта гена *Zm_Chrl06* линий KM, AT-3 и AT-4 сравнивали с нуклеотидной последовательностью мРНК *Zm_Chrl06* референсной линии B73. Количество ОНЗ на 1000 нуклеотидов у гена *Zm_Chrl06* у разных линий колеблется от 2.7 до 6.8. В белок-кодирующей части гена *Zm_Chrl06* у линии KM обнаружены семь ОНЗ, у линии AT-3 – десять ОНЗ и две делеции, у линии AT-4 – 15 ОНЗ (рис. 2). Как влияют обнаруженные ОНЗ на функцию белка CHR106 у линий AT, пока неизвестно.

<i>Fie2_B73</i>	TGGGAACCGAAGACAAAAGAACAGAGTCCTGGGGAGGGAAGCATCGATATCCTTCAGAAG	1260
<i>Fie2_AT-1</i>	TGGGAACCGAAGACAAAAGAACAGAGTCCTGGGGAGGGAAGCATCGATATCCTTCAGAAG	1260
<i>Fie2_AT-3</i>	TGGGAACCGAAGACAAAAGAACAGAGTCCTGGGGAGGGAAGCATCGATATCCTTCAGAAG	1260
<i>Fie2_AT-4</i>	TGGGAACCGAAGACAAAAGAACAGAGTCCTGGGGAGGGAAGCATCGATATCCTTCAGAAG	1260

<i>Fie2_B73</i>	TATCCTGTCCCAGAATGTGACATTGGTTTATCAAATTTTCATGTGATTTTCACTTCAAT	1320
<i>Fie2_AT-1</i>	TATCCTGTCCCAGAATGTGACATTGGTTTATCAAATTTTCATGTGATTTTCACTTCAAT	1320
<i>Fie2_AT-3</i>	TATCCTGTCCCAGAATGTGACATTGGTTTATCAAATTTTCATGTGATTTTCACTTCAAT	1320
<i>Fie2_AT-4</i>	TATCCTGTCCCAGAATGTGACATTGGTTTATCAAATTTTCATGTGATTTTCACTTCAAT	1320

<i>Fie2_B73</i>	CAGTTGGCGATAGGCAACCGTGAAGGCAAAATCTACGTGTGGGAAGTACAGTCCAGCCCT	1380
<i>Fie2_AT-1</i>	CAGTTGGCGATAGGCAACCGTGAAGGCAAAATCTACGTGTGGGAAGTACAGTCCAGCCCT	1380
<i>Fie2_AT-3</i>	CAGTTGGCGATAGGCAACCGTGAAGGCAAAATCTACGTGTGGGAAGTACAGTCCAGCCCT	1380
<i>Fie2_AT-4</i>	CAGTTGGCGATAGGCAACCGTGAAGGCAAAATCTACGTGTGGGAAGTACAGTCCAGCCCT	1380

<i>Fie2_B73</i>	CCTGTCCTCATTGCTCGGCTGTATAATCAGCAGTGTAATCGCCGATAAGACAACTGCA	1440
<i>Fie2_AT-1</i>	CCTGTCCTCATTGCTCGGCTGTATAATCAGCAGTGTAATCGCCGATAAGACAACTGCA	1440
<i>Fie2_AT-3</i>	CCTGTCCTCATTGCTCGGCTGTATAATCAGCAGTGTAATCGCCGATAAGACAACTGCA	1440
<i>Fie2_AT-4</i>	CCTGTCCTCATTGCTCGGCTGTATAATCAGCAGTGTAATCGCCGATAAGACAACTGCA	1440

<i>Fie2_B73</i>	GTGTCCTTCGATGGAAGCACAAATCCTTGGAGCTGGTGAAGACGGCACCATCTGGCGGTGG	1500
<i>Fie2_AT-1</i>	GTGTCCTTCGATGGAAGCACAAATCCTTGGAGCTGGTGAAGACGGCACCATCTGGCGGTGG	1500
<i>Fie2_AT-3</i>	GTGTCCTTCGATGGAAGCACAAATCCTTGGAGCTGGTGAAGACGGCACCATCTGGCGGTGG	1500
<i>Fie2_AT-4</i>	GTGTCCTTCGATGGAAGCACAAATCCTTGGAGCTGGTGAAGACGGCACCATCTGGCGGTGG	1500

<i>Fie2_B73</i>	GATGAAGTGGACCATCCGAGCTCCAGAACTGAAGAAGTGTGCGGCTCAATGCTGGACT	1560
<i>Fie2_AT-1</i>	GATGAAGTGGACCATCCGAGCTCCAGAACTGAAGAAGTGTGCGGCTCAATGCTGGACT	1560
<i>Fie2_AT-3</i>	GATGAAGTGGACCATCCGAGCTCCAGAACTGAAGAAGTGTGCGGCTCAATGCTGGACT	1560
<i>Fie2_AT-4</i>	GATGAAGTGGACCATCCGAGCTCCAGAACTGAAGAAGTGTGCGGCTCAATGCTGGACT	1560

<i>Fie2_B73</i>	GATGGTTACGCTCGGTTGGGGTTGCGATGGTTGAATCCGTTGGTGGAAAGTGCCACCTGG	1620
<i>Fie2_AT-1</i>	GATGGTTACGCTCGGTTGGGGTTGCGATGGTTGAATCCGTTGGTGGAAAGTGCCACCTGG	1620
<i>Fie2_AT-3</i>	GATGGTTACGCTCGGTTGGGGTTGCGATGGTTGAATCCGTTGGTGGAAAGTGCCACCTGG	1620
<i>Fie2_AT-4</i>	GATGGTTACGCTCGGTTGGGGTTGCGATGGTTGAATCCGTTGGTGGAAAGTGCCACCTGG	1620

Рис. 4. Множественное выравнивание фрагмента нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Fie2* партеногенетических линий кукурузы AT саратовской селекции и референсной линии B73. Выделенные буквы обозначают нуклеотидные замены.

Zm_Fie1

Zm_Fie2

Ген *Zm_Fie1* кукурузы экспрессируется в начале развития эндосперма и играет важную роль в его развитии [16]. Транскрипт гена *Zm_Fie1* кукурузы линии AT-3 секвенирован и представлен нами в базе данных GenBank (MW222954.1), а для линий AT-1 и AT-4 транскрипты представлены на рис. 3.

Ген *Zm_Fie1* у линии AT-1 имеет десять ОНЗ в белок-кодирующей области; у линии AT-3 — три ОНЗ в положениях, отличающихся от AT-1 и AT-4, и делецию из шести нуклеотидов в положении 1362–1367 (рис. 3). Линия AT-4 имеет 11 ОНЗ в белок-кодирующей области гена *Zm_Fie1*. Количество ОНЗ на 1000 нуклеотидов у гена *Zm_Fie1* исследованных линий колеблется от 1.9 до 7.5. Линии AT-1 и AT-4 имеют десять ОНЗ в одинаковых положениях, а линия AT-4 имеет дополнительную ОНЗ в положении 512 (рис. 3). Возможно, линия AT-4 унаследовала этот ген от линии AT-1 и приобрела дополнительную ОНЗ.

Белок FIE2 контролирует экспрессию генов, связанных с началом развития эндосперма [15]. Транскрипты гена *Zm_Fie2* кукурузы линий AT-1, AT-3 и AT-4 секвенированы и представлены нами на рис. 4. У гена *Zm_Fie2* линий AT-1 и AT-4 в белок-кодирующей части обнаружено по одной ОНЗ, а у линии AT-3 наблюдаются две ОНЗ в белок-кодирующей части (рис. 4).

У белка FIE2 аминокислотные последовательности для всех трех линий полностью идентичны аминокислотной последовательности белка референсной линии B73 (данные не показаны). Количество ОНЗ на 1000 нуклеотидов у гена *Zm_Fie2* исследованных линий колеблется от 0.6 до 1.2. Поскольку белок FIE2 контролирует экспрессию генов, связанных с началом развития эндосперма, в том числе, предположительно, гена *Zm_Fie1*, вполне объяснима его консервативность и схожесть у непартеногенетических и партеногенетических линий кукурузы. Правда, консервативность белка FIE2 не объясняет экспрессии гена *Zm_Fie1*,

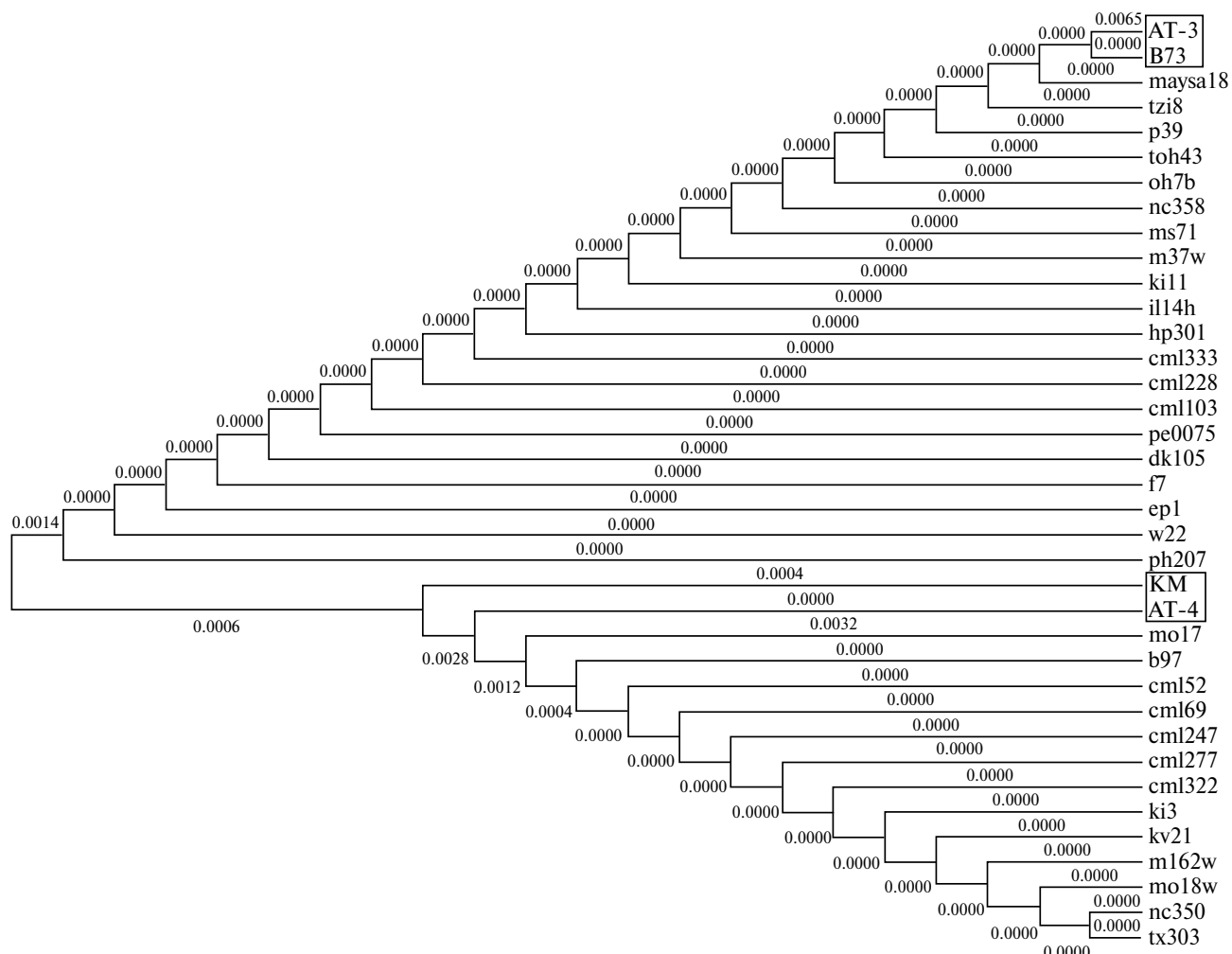


Рис. 5. Филограмма линий кукурузы, построенная по гену *Zm_Chr106* с помощью программы MEGA 11. Квадратами отмечены исследованные в данной статье линии.

которую мы наблюдали у партеногенетической линии AT-4 без опыления, что не характерно для непартеногенетических линий кукурузы [21].

Таким образом, можно заключить, что ген *Zm_Fie2* является высококонсервативным, и кодируемые им белки не различаются у партеногенетических и непартеногенетических линий, а спонтанное (без опыления) начало развития эндосперма контролируется другими генами.

Для выявления филогенетического родства изучаемых линий кукурузы были построены филограммы с использованием последовательностей транскриптов генов *Zm_Chr106* (рис. 5) и *Zm_Fie1* (рис. 6).

На филограмме, построенной на основе сходства последовательностей гена *Zm_Chr106*, линии кукурузы разделились на две группы с *p*-расстоянием (эволюционное расхождение) 0.0020. Партеногенетические линии AT-3 и AT-4 находятся в

разных группах. Линия AT-3 и референсная линия B73 имеют *p*-расстояние 0.0065.

Линии AT-1 и AT-4 имеют много совпадений по ОНЗ у гена *Zm_Fie1* (рис. 3) и входят в одну группу (рис. 6). Линия AT-3 от них сильно отличается и находится в отдельной группе, хотя обе линии (AT-3 и AT-4) являются прямыми потомками линии AT-1. То есть между AT-3 и AT-4 наблюдается разница как по гену *Zm_Chr106* (рис. 5), так и по гену *Zm_Fie1* (рис. 6). Линия AT-3 и референсная линия B73 имеют *p*-расстояние 0.1849. Возможно, делеция в шесть нуклеотидов в положении 1362–1367 (рис. 3) послужила причиной таких различий (рис. 6).

Таким образом, из четырех исследованных генов (*Hdt104*, *Chr106*, *Fie1* и *Fie2*) у партеногенетических линий кукурузы AT-1, AT-3, AT-4 наиболее консервативными являются гены *Hdt104* и *Fie2*, нуклеотидные замены в которых маловероятно приводят к изменению функции соответствующих белков.

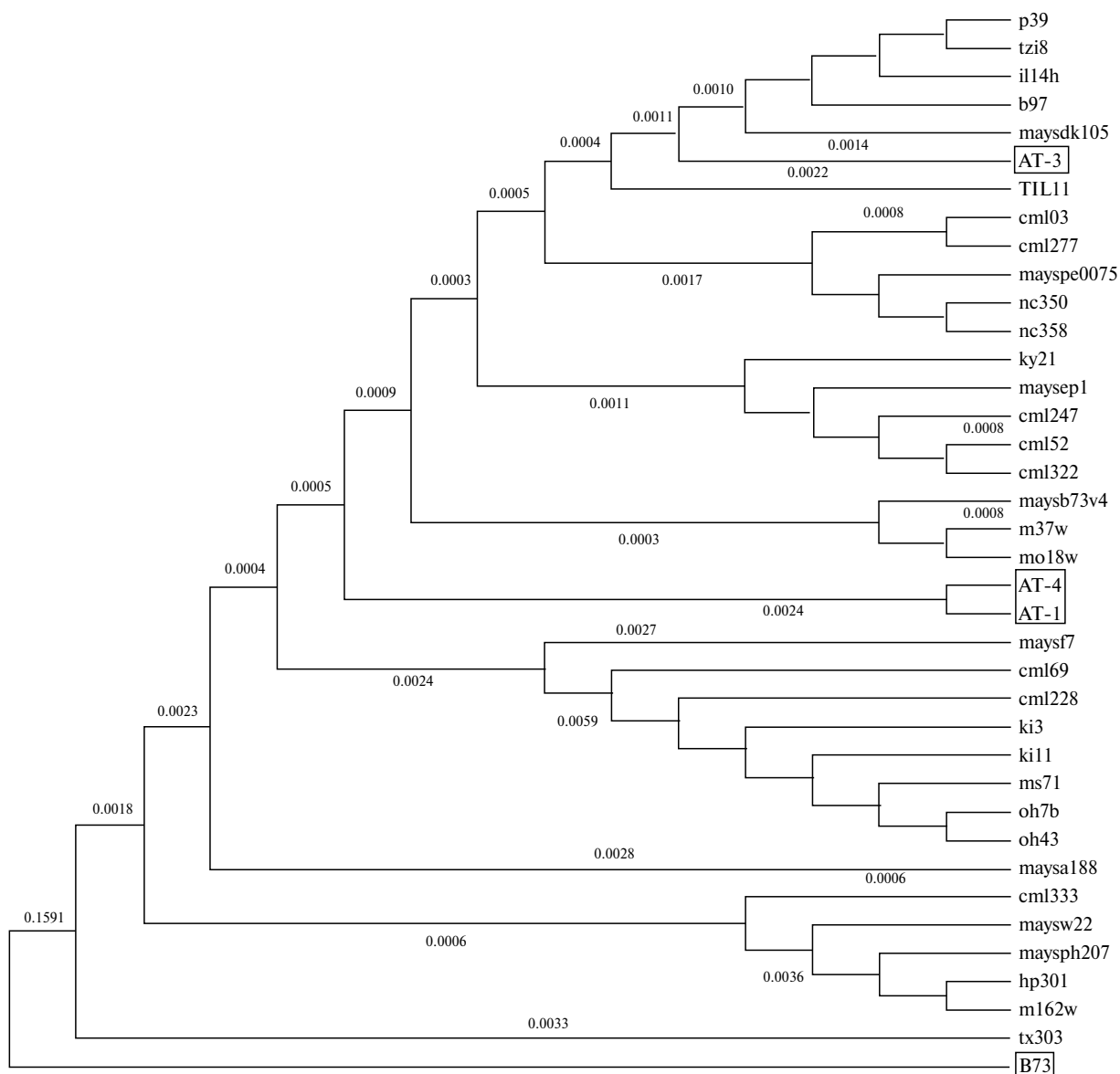


Рис. 6. Филограмма линий кукурузы, построенная по гену *Zm_Fie1* с помощью программы MEGA 11. Квадратами отмечены исследованные в этой статье линии.

Авторы признательны Ю. В. Смолькиной за предоставленные образцы кукурузы.

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

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. Белова И., Тараканова Т., Абдырахманова Э. и др. Хромосомный контроль апомиксиса у гибридов кукурузы с гамаграссом // Генетика. 2010. Т. 46. № 9. С. 1188–1191 (Belova I.V., Tarakanova T.K., Abdyrahmanova E.A. et al. Chromosome control of apomixis in maize-gamagrass hybrids / Russ. J. Genet. 2010. V. 46. P. 1055–1057. <https://doi.org/10.1134/S1022795410090103>
2. Grimanelli D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixes in angiosperms // Current Opinion in Plant Biology. 2012. V. 15. P. 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.002>

3. Koltunow A.M., Grossniklaus U. Apomixis: A developmental perspective // Annual Review of Plant Biology. 2003. T. 54. № 1. С. 547–574.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842>
4. Bicknell R., Koltunow A. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums // The Plant Cell. 2004. V. 16. P. 228–245.
<https://doi.org/10.1105/tpc.017921>
5. Bradley J., Carman J., Jamison M., Naumova T. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae) // Sex. Plant Reprod. 2007. V. 20. P. 9–17.
<https://doi.org/10.1007/s00497-006-0038-0>
6. Sauter M., Wiegen P., Lörz H., Kranz E. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division // Sex Plant Reprod. 1998. V. 11. P. 41–48.
<https://doi.org/10.1007/s004970050119>
7. Liu X., Fu J., Gu D. et al. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of *Zea mays* // Genomics. 2008. V. 91. P. 378–387.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.12.002>
8. Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes // The Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3249–3267.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.072181>
9. Leblanc O., Grimanelli D., Hernandez-Rodriguez M. et al. Seed development and inheritance studies in apomictic maize – *Tripsacum* hybrids reveal barriers for the transfer of apomixis into sexual crops // Int. J. Dev. Biol. 2009. V. 53. P. 585–596.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082813ol>
10. Matsuoka Y. Original matters: Lessons from the search for the wild ancestors of maize // Breeding Sci. 2005. V. 33. P. 383–390.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.383>
11. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
12. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. АН СССР. 1997. Т. 353. С. 405–407.
13. Kolesova A.Y., Tyrnov V.S. Embryological peculiarities of tetraploid parthenogenetic maize forms // Maize Genet. Cooperation Newsletter. 2012. V. 85. P. 65–66.
14. Гуморова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самарского науч. центра Российской акад. наук. 2016. Т. 18. № 2. С. 341–344.
15. Danilevskaya O.N., Hermon P., Hantke S. et al. Duplicated fie genes in maize: Expression pattern and imprinting suggest distinct functions // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 425–438.
<https://doi.org/10.1105/tpc.006759>
16. Hermon P., Srilunchang K., Zou J. et al. Activation of the imprinted Polycomb group Fie1 gene in maize endosperm requires demethylation of the maternal allele // Plant Mol. Biol. 2007. V. 64. P. 387–395.
<https://doi.org/10.1007/s11103-007-9160-0>
17. Makarevitch I., Eichten S.R., Briskine R. et al. Genomic distribution of maize facultative heterochromatin marked by trimethylation of H3K27 // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 780–793.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.106427>
18. Li Q., Eichten S.R., Hermanson P.J. et al. Genetic perturbation of the maize methylome // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 4602–4616.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.133140>
19. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397.
doi: 10.31857/S001667582204004X (Chumakov M. I., Mazilov S. I. Genetic control of maize gynogenesis // Rus. J. Genet. 2022. V. 58. № 4. P. 384–392.
<https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
20. Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Y. et al. Expression of genes coding for chromatin-modifying enzymes maize embryo sacs before and after pollination // Plant Gene. 2020. V. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100221>
21. Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Y. et al. Gene expression in parthenogenic maize proembryos // Plants. 2021. V. 10.
<https://doi.org/10.3390/plants10050964>
22. Mozgova I., Kohler C., Hennig L. Keeping the gate closed: Functions of the polycomb repressive complex PRC2 in development // The Plant J. 2015. V. 83. P. 121–132.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12828>
23. Grossniklaus U., Vielle-Calzada J.P., Hoeppner M.A., Gagliano W.B. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis* // Science. 1998. V. 280. P. 446–450.
<https://doi.org/10.1126/science.280.5362.446>
24. Luo M., Bilodeau P., Koltunow A. et al. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 1. P. 296–301.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.296>
25. Ohad N., Yadegari R., Margossian L. et al. Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 407–416.
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.3.407>
26. Luo M., Platten D., Chaudhury A. et al. Expression, imprinting, and evolution of rice homologs of the polycomb group genes // Mol. Plant. 2009. V. 2. № 4.

- P. 711–723.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp036>
27. Wu X., Xie L., Sun X. et al. Mutation in Polycomb repressive complex 2 gene *OsFIE2* promotes asexual embryo formation in rice // *Nat. Plants*. 2023. V. 9. № 11. P. 1848–1861.
<https://doi.org/10.1038/s41477-023-01536-4>
 28. Enaleeva N.Ch., Tyrnov V.S. Cytological manifestation of apomixis in AT-1 plants of corn // *Maize Genet. Cooperation Newsletter*. 1997. № 71. P. 74–75.
 29. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // *Am. Naturalist*. 1959. V. 59. P. 381–382.
<https://doi.org/10.1086/282098>
 30. Анапасова Н.В., Гуторова О.В., Юдакова О.И., Смолькина Ю.В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самарского науч. центра Российской акад. наук*. 2017. Т. 19. № 2 (2). С. 216–219.
 31. Tyrnov V.S. Producing of parthenogenetic forms of maize // *Maize Genet. Cooperation Newsletter*. 1997. V. 71. P. 73–74.
 32. Tyrnov V.S., Smolkina Y.V., Titovets V.V. Estimation of parthenogenesis frequency on the grounds of genetical and embryological data // *Maize Genet. Cooperation Newsletter*. 2001. V. 75. P. 56–57.
 33. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101 (30). P. 11030–11035.
<https://doi.org/10.1073/pnas.04042061>
 34. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38 (7). P. 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
 35. Смолькина Ю.В. Особенности развития завязей у партеногенетических линий кукурузы без опыления // *Бюл. Ботан. сада Саратовского гос. ун-та*. 2003. № 2. С. 197–201.
 36. Еналеева Н.Х., Тирнов В.С. Цитологическое проявление элементов апомиксиса у линии кукурузы AT-1 и ее гибридов // *Апомиксис у растений: состояние, проблемы и перспективы исследования*. Саратов, 1994. С. 57–59.

Partenogenesis Maize genes: Comparative Mutations Analysis

Ye. M. Moiseeva¹, V. V. Fadeev¹, Yu. V. Fadeeva¹, S. I. Mazilov¹,
 A. Y. Kolesova², 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*

²*Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, 410010 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The article presents an analysis of the polymorphism of nucleotide sequences of the genes presumably associated with the parthenogenetic development of the embryo and endosperm in maize. Sequencing and subsequent multiple alignment of transcripts of the target genes (*Hdt104*, *Chr106*, *Fie1* and *Fie2*) studied in the work of the AT-1, AT-3 and AT-4 parthenogenetic maize lines and the reference line B73 determined the presence of SNP, deletions and insertions. The phylogenetic trees for the studied genes were constructed.

Keywords: maize, parthenogenesis, mutations, gene polymorphism.