

УДК 579.25.5

АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС СЛИЯНИЯ ГАМЕТ, У ГАПЛОИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ ЗМС-П

© 2017 г. И. В. Волохина^а, Е. М. Моисеева^а, Ю. С. Гусев^а, О. В. Гуторова^б, М. И. Чумаков^а. *

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
410049 Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

^бСаратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
410012 Саратов, ул. Астраханская, д. 83

*E-mail: chumakovmi@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2016 г.

Окончательный вариант получен 26.09.2016 г.

Статья посвящена изучению механизма двойного оплодотворения у растений, в частности, генов, контролирующих слияние спермия и яйцеклетки у кукурузы. С помощью программы BLAST в геноме кукурузы проведен поиск гомологов генов *hap2/gcs1* (*generative cell specific 1 (gcs1)*), *gex2* (*gamete expressed 2*) и тетрапанинового семейства генов (*tet9*, *tet11*, *tet12*) арабидопсиса, контролирующих этап слияния гамет. Гомология (67% идентичности) была впервые обнаружена для гена *hap2* арабидопсиса и последовательности кукурузы ZM_BFb0162K03 (1921 н.о.), содержащей консервативный регион полностью идентичный соответствующим регионам генов арабидопсиса и лилии. Установлено, что экспрессия гена *Zm_hap2* кукурузы не является спермий-специфичной, поскольку мРНК обнаружена в образцах, выделенных из семязачатков, корней и листьев кукурузы гаплоиндуцирующей и контрольной линий кукурузы. С помощью секвенирования ПЦР продуктов, полученных с мРНК гена *Zm_hap2* (фрагмент ZM_BFb0162K03, 1467 н.о.) гаплоиндуцирующей и контрольной линий кукурузы нами впервые показано, что они полностью идентичны между собой и с фрагментом (1467 н.о.) последовательности ZM_BFb0162K03 кукурузы линии В73 из базы данных GenBank. В результате поиска транслированных белковых последовательностей у кукурузы были найдены белки, гомологичные белкам GEX2, TET11, TET12, экспонированных в мембранах спермиев арабидопсиса.

Ключевые слова: двойное оплодотворение, гены слияния гамет, кукуруза, секвенирование, *Zm_hap2*, биоинформационный анализ

DOI: 10.7868/S0475145017020094

ВВЕДЕНИЕ

Двойное оплодотворение присутствует у всех покрытосеменных растений и было открыто С.Г. Навашиным в 1898 г. (Навашин, 1951). Однако, несмотря на то, что прошло уже более ста лет, молекулярно-генетический контроль этого явления остается малоизученным. При оплодотворении у цветковых (покрытосеменных) растений два спермия после попадания пыльцы на пестик доставляются к зародышевому мешку по пыльцевой трубке, где один спермий сливается с яйцеклеткой, а второй — с центральной клеткой. В результате оплодотворения яйцеклетка дает начало зародышу, а оплодотворенная центральная клетка — эндосперму. Слияние спермиев с клетками женского гаметофита у растений является центральным этапом, определяющим успешное прохождение процесса оплодотворения и развития семени.

Следует отметить, что для важных в агрономическом плане растений, например, пшеницы, ри-

са, кукурузы процесс слияния гамет полностью не изучен. Между тем, именно для сельскохозяйственных растений может быть интересным практическое применение знаний о механизме слияния гамет. В частности, при разработке технологий получения гаплоидных и апомиктичных форм растений, которые возникают в результате нарушений при образовании и функционировании гамет, нарушений развития зародыша и эндосперма. С другой стороны, генетиками и селекционерами уже получены формы растений, у которых имеются генетически наследуемые нарушения процесса оплодотворения, развития зародыша и эндосперма, но неизвестно, где произошла мутация.

В частности, в литературе описаны линии кукурузы, полученные в результате множественных скрещиваний, у которых зафиксировано появление гаплоидов с частотой, превышающей частоту спонтанного (0.01–0.1%) их возникновения: PEM (Chase, 1949), Stock 6 (Сое, 1959), и линии-гаплоиндукторы, полученные с использованием линии

Stock 6: ЗМС, КМС (Тырнов, Завалишина, 1984), Краснодарский маркер (Shatskaya et al., 1994), МН1 (Chalyk, 1999) и ряда других (Hu et al., 2016). При этом механизм возникновения гаплоидов может быть различным, нас же интересуют случаи образования гаплоидов, связанные с нарушением слияния гамет, обусловленных спермием. Так, гаплоиндуцирующую способность линии ЗМС (зародышевый маркер саратовский и ее производной линии зародышевый маркер саратовский пурпурный (ЗМС-П)), исследователи связывают с наследуемой мутацией, приводящей к тому, что при использовании этих линий в качестве опылителей, многократно повышается процент матроклинных гаплоидных растений из-за неспособности спермия двигаться к яйцеклетке или сливаться с яйцеклеткой (Тырнов, Завалишина, 1984; Vylich, Chalyk, 1996; Еналеева с соавт., 1997; Chalyk et al., 2003; Гуторова, 2006; Колесова, Гуторова, 2008). Родственные связи использованной нами в экспериментах линии ЗМС-П, происходящей от линий ЗМС, ЗМС-8, и сведения о других 51 линиях-гаплоиндукторах можно, посмотреть в статье (Hu et al., 2016).

Первые данные о генах, контролирующих этап слияния гамет у растений (*hap2/gcs1 (generative cell specific 1)*) были опубликованы в 2006 г. для арабидопсиса (Besser et al., 2006) и лилии (Mori et al., 2006). Во избежание возможной путаницы в дальнейшем ген *hap2/gcs1* мы будем называть *hap2*, т.к. в геноме *A. thaliana* есть ген *gcs1* – альфа-глюкозидаза 1 (alpha-glucosidase I). Показано, что продукт гена *hap2* белок HAP2 экспрессируется в мембране спермиев арабидопсиса и обеспечивает рост пыльцевых трубок по направлению к яйцеклетке (Besser et al., 2006). Кроме того, было показано, что спермии арабидопсиса, несущие мутацию по гену *hap2*, были не в состоянии оплодотворить яйцеклетку. Белок арабидопсиса HAP2 содержит N-концевой сигнал секреции, один трансмембранный домен и C-концевой гистидин-богатый домен (Besser et al., 2006). Считается, что белок HAP2 требуется у арабидопсиса на этапе после адгезии гамет, при слиянии мембран спермиев с яйцеклеткой и центральной клеткой (Mori et al., 2014). Однако функционирование белка HAP2 арабидопсиса не вполне известно.

Таким образом, в геноме арабидопсиса гены *hap2*, *gex2*, *tet9*, *tet11*, *tet12*, контролирующие этапы слияния гамет, охарактеризованы, нуклеотидные и белковые последовательности аннотированы в базах данных, а гены слияния у кукурузы неизвестны.

В данной работе проведен поиск генов-гомологов арабидопсиса *hap2*, *gex2*, *tet9*, *tet11*, *tet12* в геноме кукурузы и их анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформационные методы. Поиск последовательностей, гомологичных генам *hap2*, *gex2*, *tet9*, *tet11*, *tet12*, проводили в геноме кукурузы по базе данных GenBank с помощью программ BLAST (tblastn и blastn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). РНК выделяли из 100–150 мг пыльцы, семян, корней и листьев гаплоиндуцирующей (ЗМС-П) (Гуторова, 2006) и контрольной (не обладающей способностью к гаплоиндукции) ГПЛ-1 линий кукурузы (Тырнов, Завалишина, 1984), как описано в работе (Bijli et al., 2001).

С мРНК получали кДНК с олиго-Т праймерами (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя ревертазы (Fermentas, Литва). Затем проводили ПЦР со специфическими праймерами, подобранными для фрагмента последовательности ZM_BFb0162K03 кукурузы размером 656 п.о. с использованием праймеров: прямого – 5'-GGTGAGCCACAAAACCTTGG-3' и обратного – 5'-CATCCTTGTCTGTCGAGTTCAC-3' (рис. 1) (Синтол, Россия).

Секвенирование мРНК. Для секвенирования использовали ПЦР-продукты, полученные с кДНК линий кукурузы ЗМС-П и ГПЛ-1 с праймерами, подобранными для трех перекрывающихся фрагментов последовательности ZM_BFb0162K03 общим размером 1467 н.о. (рис. 1): № 1 – 5'-GGT-GAGCCACAAAACCTTGG-3', № 2 – 5'-ACTCGA-CAGACAAGGATGTGT-3', № 3 – 5'-ACCGGAG-GCACAAGAAAG-3', обратный № 4 – 5'-CCC-ACGGTACACCAACTTCA-3' (Синтол, Россия). Полученные ПЦР-продукты вырезали из геля и очищали с использованием набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). 15–20 нг/мкл ПЦР-продуктов секвенировали на Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) компании Евроген (Россия). Полученные последовательности были сравнены между собой и с последовательностью ZM_BFb0162K03 линии В73 кукурузы из базы данных GenBank (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск и анализ гена ZM_hap2 кукурузы

В геноме кукурузы нами обнаружены последовательности, гомологичные гену *hap2* арабидопсиса с идентичностью более 67% (таблица), в том числе последовательность, которая принадлежит транскрипту ZM_BFb0162K03 кукурузы (Soderlund et al., 2009). С помощью приложения (The MaizeGDB BLAST tool) базы данных кукурузы (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>) установлено, что транскрипт ZM_BFb0162K03 (1467 п.н.) находится во второй хромосоме и содержит кон-

```

1 CCCCTCTTACCTCGCCGCGTTCGGAGCTAGCCGGCGGGTTGTTCCGCCGGCTCGTGAGGAAGGCGGGTGGGGCC 77
78 TTTCGGCGTGTTCGTTGGCTCGCGCGCGGTCGGCTGTGCTCGCGCGCACGCCAACCGGCGGTGGCATTGCTGTGCTCC
155 AACGCGTGGCCGACCGGTTTGGTTCATGTTTTTGGAAATGGAACAAGGTCACTTGGGTTCAACATCAGGGTACAAG 231
232 TTAAGAAAGGTTTCATCTGTATCGGAGGTTGTTGTTGGTCCAGAGAATAGAAGTGTGTTTCTAAAGACAACCTTTCTG
309 AGAGTGAATCTCATTTGGTGGTATTTGGTGGTTATACCAGCATCCAGCATTTGAGGACTTCTATCTTGTGACCCCTAG
385 GAAGAGTCTGGTAGTGGTGGAGCCACAAAACCTTGGTGTGCTGAATATAGAAAGTGG [ATGCTGTTGGAGAGATTTCGT
461 TTTCAGACCGTCTCGAATGTAACAAGATTGGTGTGGTTATGAGGCTTTCCAAAACCAACCTTAACCTTTTGTGCATC
538 GCCATTGAGAGCTGTTTGAACCAATCAGCTATGGACCTTTTGGAGTCTGACAAAAACCGGATAAGCATGAGCCGAC
539 AGCCCAATATGTTGTGCAGGGAAGGTTTCAGAGGATCAATCAACATCCAGATGCAAGTGTTCATTCTTTTCTATT
692 GGAGTGACAGAAGTTATTAATAGCAATTTACGGATAGAGCTGAGTGTCTGATGACATAGAATACATGTATCAGAGGAG
769 TCCAGGGAATATAACAGACATTAGTGTCCAGCATTTGAAGTCTTAAGTCAATATGGTACTGCAAAAGGTCAACACTA
846 AGAATATTGGTCACTGGAGGCTTCGTATACCTTGACATTTCACTGCTCAAGTGGCATCAGTTTTATGGAGGAGCAG
923 TACTATATCTCAAAACCGAATGAAGAGAGTACCCGTTTATTTTACTTGCACGCATCTACAGATCAAGCAGCAAAAGTA
1000 TCAATGTACAGCTATTCTGAAGGCGTCGGATTCTAGTGAACCTCGACAGACAAGGATGTGTTTTTCTACTACGGCTA
1077 CAGTCTTGATAATGGAACACAGATTATCGGTTCAAATGGCTACAAATGGGTTCTTTGACACCATCAAAGGCTAT
1154 TTGGTTAGCTTCTGGGATTTTCTGATTGATTTAATCAGTGGCAAACTCTGCAGGCTGAACAATGTCGGAGCTTTTT
1231 TGACTTCAGCTGCCAGTACAGATGCATAAACCCTGGCTCGTCATGTTGGTGTCTGCTACTTTTTATGTTACCCG
1308 CAGGCGCAATGTCTCTTCTTCTCATCAGAAAGGCTTCTTCGACCCAGTATACGACTGGTGGGATGACCTGCTG
1385 GGGCGGACTACCCGCGCGCACCGGAGGCAACAAGGCGCCGCCACCACCATCACACCACGACCACCATCACCA
1462 CCGGCACCACCACCACCACGGGCACTCGCACGGCCATGACCACCACCCACAGTCAACCACCACGCGCACAGAGGA
1539 GAAAGATCGAGCCAGCCACCACCACCTCTACACAGGAGCAGCCCGGACAGCGGAGAGGCGCACCCGCGCACAA
1616 CACGACCCGCGCTCGGCGTGCAGCACAGGAGGCGCGGCACTTGGGGCACAAAGGCTCGGCATGGCAAGCGGTGGT
1693 CGCGGAGGACGCCCTGGACCTGGAGTTCAGGGAACGAAGGCCATACGAGGTCAGGCATGCCGGGCACCTGCACCCG
1770 ACCACCACCACCACCACCTCTGGGAAGTGTAG] GAATAGTCTGACCCGCTGAACTTTAAGACATCTAGCGCTAA
1846 GAAGAAGTGGTGTACCGTGGCCACGGGACATGCCSTTTGCATGCATGCAGTGAAGTGGTGTAAATTTCTA
1923 GT
    
```

Рис. 1. Сиквенс гена кукурузы *ZM_hap2* гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П. Примечание: желтым фоном отмечено положение прямого праймера № 1, зеленым фоном отмечено положение прямого праймера № 2, бирюзовым фоном отмечено положение прямого праймера № 3, красным фоном – положение обратного праймера. Консервативный участок мужского фактора слияния гамет (Male gamete fusion factor, region: HAP2(GCS1) (Besser et al., 2006)) отмечен курсивом с подчеркиванием (441–584 н.о.).

сервативный участок (рис. 1), полностью сходный с фрагментом гена *hap2* арабидопсиса, описанный в работе (Besser et al., 2006). Последовательность кукурузы *ZM_BFb0162K03* была обозначена нами как *Zm_hap2* и использована в дальнейшей работе в качестве референтной, поскольку первые две последовательности (таблица) были предсказаны с помощью метода прогнозирования генов (Gnomon), а третья (*ZM_BFb0162K03*) получена экспериментально (Soderlund et al., 2009). Для транскрипта *ZM_BFb0162K03* кукурузы в базе данных GenBank была также обнаружена гомология (72%) с геном *gsc1* (generative cell specific-1) лилии (*Lilium longiflorum*), имеющим консервативную последовательность, сходную с мужским фактором

слияния гамет арабидопсиса (участок HAP2) (Besser et al., 2006).

На основе значительного статистического материала, при сравнении нуклеотидных последовательностей большой длины считается, что две последовательности гомологичны, если они более чем на 30% идентичны по всей длине выравнивания, а в случае, идентичности около 70% и выше и при совпадении консервативных участков, считается, что последовательности имеют высокую гомологию, а белки, кодируемые этими последовательностями, имеют схожие функции (Pearson, 2013). Поэтому у нас есть основания предполагать, что белок *Zm_HAP2* обладает сходной функцией с белком HAP2 арабидопсиса. Что-

Результаты поиска гомологов гена *hap2* арабидопсиса в геноме кукурузы

№	Гомологи гена <i>hap2</i>	Идентичность/ покрытие	Параметр E	% идентичности	Идентификационный номер
1	Предсказанный белок кукурузы (LOC100274016), вариант транскрипта X1	63%	4e-125	68%	XM_008669343.1
2	Предсказанный белок кукурузы (LOC100274016), вариант транскрипта X2	44%	7e-84	68%	XM_008669344.1
3	Полноразмерный клон кДНК кукурузы <i>ZM_BFb0162K03</i>	44%	3e-82	67%	BT042207.1
4	Гипотетический белок кукурузы (LOC100274016)	39%	1e-80	68%	NM_001148401

бы понять могут ли отличаться галоиндуцирующая и контрольная линии кукурузы по структуре или экспрессии гена *Zm_hap2* был проведен их ПЦР-анализ.

На последовательность ZM_VFb0162K03 размером 1467 п. н., полностью перекрывающей последовательность (1365 п.н.), кодирующую HAP2-подобный белок кукурузы, с помощью программы Pick Primers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) были подобраны специфические праймеры (рис. 1).

С помощью ПЦР экспрессия гена *Zm_hap2* обнаружена в образцах мРНК, выделенных из пыльцы, корней, листьев (рис. 2) и семязачтков (данные не приведены) гаплоиндуцирующей (ЗМС-П) и контрольной (ГПЛ-1) линий кукурузы.

В пионерской работе по гену *hap2* (Besser et al., 2006) было показано, что ген *hap2* специфично экспрессируется в спермиях арабидопсиса. Однако более поздние исследования арабидопсиса (Borges et al., 2008) и изучение экспрессии HAP2 у водорослей *Clamidomonas reinhardtii* (Mori et al., 2006) показали, что ген *hap2* экспрессируется не только в мембране спермиев, но и в клетках женского гаметофита, и это не связано с возможным загрязнением образцов РНК геномной ДНК. Интересно отметить, что у кукурузы, в отличие от арабидопсиса, ПЦР-продукты с фрагмента гена *Zm_hap2* обнаружены нами в образцах РНК, выделенной из различных тканей (пыльца, семязачтки, листья и корни) обеих исследованных линий кукурузы. Т.е. экспрессия гена *Zm_hap2* не является спермий-специфичной.

ПЦР продукты, полученные из образцов кДНК линий кукурузы ЗМС-П и ГПЛ-1 (общий фрагмент гена *Zm_hap2* размером 1467 п.н., обобщенный из трех перекрывающихся фрагментов, см. Материалы и методы), были секвенированы, и полученные последовательности были сравнены между собой и с последовательностью ZM_VFb0162K03 кукурузы из базы данных GenBank. Установлено, что секвенированные результирующие последовательности гена *Zm_hap2* размером 1467 н.о. (рис. 1) линий кукурузы ЗМС-П и ГПЛ-1 полностью идентичны между собой и с последовательностью ZM_VFb0162K03 из базы данных GenBank. Т.е. нуклеотидная последовательность гена *Zm_hap2* кукурузы не содержит мутаций, которые могли бы повлиять на функционирование HAP2-подобного белка кукурузы.

Таким образом, способность гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П вызывать увеличение процента матроклинных гаплоидов не связана с *hap2*-подобным геном кукурузы, контролирующим этап слияния мембран спермиев и яйцеклетки.

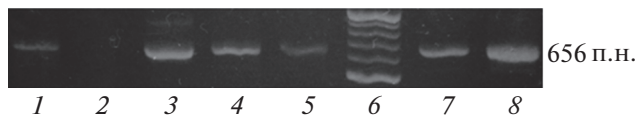


Рис. 2. Электрофорез ПЦР-продуктов, полученных с кДНК из генеративных и вегетативных тканей гаплоиндуцирующей (ЗМС-П) и контрольной (ГПЛ-1) линий кукурузы. Дорожки: 1 – корни ЗМС-П; 2 – ДНК ЗМС-П; 3 – пыльца ЗМС-П; 4 – пыльца ГПЛ-1; 5 – корни ГПЛ-1; 6 – молекулярный маркер (SM1153, Fermentas, Lithuania); 7 – листья ЗМС-П; 8 – листья ГПЛ-1.

Поиск и анализ гена *Zm_gex2* кукурузы

Генетическое картирование и эксперименты, проведенные ранее с использованием мутантов *Ara-bidopsis*, показали, что мутации, локализованные в гене *gex2* (GAMETE EXPRESSED 2, At5g49150) влияют на этап слияния гамет (Engel et al., 2005). В 2014 г. было показано, что белок GEX2 необходим на этапе контакта мембран спермия и яйцеклетки арабидопсиса (Mori et al., 2014). Вероятно, гомолог гена *gex2* кукурузы также может рассматриваться как кандидат для анализа причин нарушений, зарегистрированных у линии кукурузы ЗМС-П при слиянии спермия с яйцеклеткой. Проведенный нами поиск гомологов гена *gex2* арабидопсиса в геноме кукурузы положительных результатов не дал, однако, в результате поиска транслированных белковых последовательностей с помощью программы Blastx у кукурузы был найден предсказанный белок ZM_GEX2 (XP_008670206.1). Предсказанный белок кукурузы ZM_GEX2 (938 а.о.) (XP_008670206.1, E-value: 0.0, идентичность/покрытие: 95%) является гомологом белка арабидопсиса AT_GEX2 (914 а.о.) (NP_199726.3), кодируемого геном *gex2* (3052 н.о.) (XM_008671984.1).

Помимо белков GEX2 и HAP2 во взаимодействии гамет у арабидопсиса могут быть вовлечены белки тетраспанинового семейства, в частности, TET11 и TET12, которые локализуются в плазматической мембране спермиев, а также TET9, обнаруженный в плазматической мембране яйцеклетки и центральной клетки (Sprunck et al., 2012; Voavida et al., 2013). Данное семейство белков играет важную роль в клеточной адгезии, подвижности клеток, активации и пролиферации, а также обладает высоким консерватизмом между видами (Wright, Tomlinson, 1994). В базе данных GenBank в геноме кукурузы нами был также проведен поиск гомологов генов *tet9*, *tet11*, *tet12* и были обнаружены семь гомологов гена *tet9* со значением e-value 10^{-6} (данные не приведены), у которых была найдена консервативная последовательность (Tetraspanin family; Region: Tetraspannin). Гомологов генов *tet11* и *tet12* арабидопсиса в геноме кукурузы с помощью программы Blastn нами не найдено. Однако при поиске транслированных белковых

последовательностей с помощью программы Blastx у кукурузы был найден белок, связанный с функцией старения (senescence-associated protein DH [*Zea mays*], доступ NP_001105285.1), гомологичный белкам *tet11* и *tet12* (E value $4e^{-69}$ и $7e^{-54}$ соответственно).

В дальнейшем предстоит выяснить, какие из обнаруженных у кукурузы нами генов *gex2* и генов тетраспанинового семейства *tet* могут быть связаны с гаплоиндуцирующей способностью у линий кукурузы с нарушением способности спермиев сливаться с яйцеклеткой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в геноме кукурузы проведен поиск гомологов генов *hap2/gcs1* (*generative cell specific 1* (*gcs1*)), *gex2* (*gamete expressed 2*) и генов тетраспанинового семейства *tet9*, *tet11*, *tet12* арабидопсиса. Установлено, что экспрессия гена *Zm_hap2* кукурузы не является спермий-специфичной, поскольку мРНК обнаружена в образцах, выделенных не только из пыльцы, но и семязачатков, корней, листьев кукурузы гаплоиндуцирующей и контрольной линий кукурузы. С помощью секвенирования ПЦР продуктов, полученных с кДНК *Zm_hap2* (фрагмент 1467 н.о.), выделенных из пыльцы гаплоиндуцирующей и контрольной линий кукурузы, впервые показано, что они полностью идентичны между собой и с фрагментом (1467 н.о.) последовательности ZM_BFb0162K03 кукурузы линии В73 из базы данных GenBank. Установлено, что нуклеотидная последовательность гена *Zm_hap2* кукурузы не содержит мутаций, которые могли бы повлиять на функционирование HAP2-подобного белка кукурузы и соответственно на способность гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П вызывать увеличение процента матроклинических гаплоидов, вероятно, не связана с *hap2*-подобным геном кукурузы.

В результате поиска транслированных белковых последовательностей у кукурузы были найдены белки ZM_GEX2, TET11, TET12, гомологичные белкам GEX2, TET11, TET12, экспрессирующимся в мембранах спермиев арабидопсиса. В дальнейшем предстоит выяснить, какие из обнаруженных у кукурузы нами генов *gex2* и генов тетраспанинового семейства *tet* могут быть связаны с гаплоиндуцирующей способностью у линий кукурузы с нарушением способности спермиев сливаться с яйцеклеткой.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.С. Тырнову за иницирование данной работы, консультации и предоставленные линии кукурузы ЗМС-П и ГПЛ-1, полученные в его лаборатории. Работа частично

поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (15-04-08413).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гуторова О.В. Исследование женского гаметофита линии – гаплоиндуктора кукурузы ЗМС-П // Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета. 2006. № 5. С. 304–307.
- Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П. и др. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. Акад. Наук. 1997. Т. 353. С. 405–407.
- Колесова А.Ю., Гуторова О.В. Цитозембриологическое исследование гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-8 // Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета. 2008. № 7. С. 202–205.
- Навашин С.Г. Избранные труды / 1951. Т. 1. М.-Л., Изд-во. АН СССР. 364 с. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинических гаплоидов кукурузы // Докл. Акад. Наук. 1984. Т. 276. С. 735–738.
- Besser V.K., Frank A.C., Johnson M.A. et al. *Arabidopsis* HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization // *Development*. 2006. V. 133. P. 4761–4769.
- Bijli K.M., Singh B.P., Sridhara S. et al. Isolation of total RNA from pollens // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2001. V. 31. P. 155–162.
- Boavida L., Qin P., Broz M. et al. *Arabidopsis* tetraspanins are confined to discrete expression domains and cell types in reproductive tissues and form homo- and heterodimers when expressed in yeast // *Plant Physiol*. 2013. V. 163. P. 696–712.
- Borges F., Gomes G., Gardner R. et al. Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells // *Plant Physiology*. 2008. V. 148. P. 1168–1181.
- Bylich V.G., Chalyk S.T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line // *Maize Genet. Coop. Newslett.* 1996. V. 70. P. 33.
- Chalyk S., Baumann A., Daniel G. et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize // *Maize Genet. Coop. News Lett.* 2003. V. 77. P. 29.
- Coe E.H. A line of maize high haploid frequency // *American Naturalist*. 1959. V. 3. P. 381–382.
- Engel M., Holmes-Davis R., McCormick S. Green sperm. Identification of male gamete promoters in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. P. 2124–2133.
- 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(4). P. 1267–1276.
- Kermicle J.L. Indeterminate gametophyte (ig): Biology and use / In: *The Maize Handbook*. M. Freeling and V. Walbot (eds). New York, Springer-Verlag 1994. P. 388–393.
- Mori H., Kuroiwa T., Kranz E. et al. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 64–71.

- Mori T., Igawa T., Tamiya G. et al. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis* // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 170–175.
- Pearson W.R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2013. V. 42. Unit 3.1.
- Shatskaya O.A., Zabiroya E.R., Shcherbac V.S. et al. Mass induction of material haploids in corn // Maize Genet. Coop. Newslett. 1994. V. 68. P. 51.
- Soderlund C., Descour A., Kudrna D. et al. Sequencing, mapping, and analysis of 27.455 maize full-length cDNAs // PLoS Genet. 2009. V. 5. P. e1000740.
- Sprunck S., Rademacher S., Vogler F. et al. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization // Science. 2012. V. 338. P. 1093–1097.
- Wright M.D., Tomlinson M.G. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily // Immunol. 1994. V. 15. P. 588–594.

Analyzing of the Gamete-Fusion Genes in the Haploinducing Zms-P Maize Line

I. V. Volokhina¹, Ye. M. Moiseeva¹, Yu. S. Gusev¹, O. V. Gutorova², and M. I. Chumakov¹. *

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov 410049, Russia*

²*Saratov State University, Saratov 410012, Russia*

*e-mail: chumakovmi@gmail.com

Received April 7, 2016; in final form, September 26, 2016

This article is devoted to the study of the double fertilization mechanism in plants, in particular of the maize gamete membrane fusion genes. We detected and analyzed for the first time gamete-fusion genes in the maize genome. Using the BLAST program, we searched for the *hap2* gene (*generative cell specific 1 (gcs1)*) homologs from *Arabidopsis* in the maize genome. The ZM_BFb0162K03 maize transcript was found, which had 67% identity to the *Athap2* gene and contained a conserved region similar to the *Athap2* gene fragment. In mRNA samples from the haploinducing and control maize lines, an RT-PCR was conducted by using primers specific to the ZM_BFb0162K03 sequence fragment. Sequences of the PCR products from a fragment (1467 bp) of the *Zm_hap2* gene of a haploinducing and a control maize line were identical and also were identical to the maize sequences from the GenBank (ZM_BFb0162K03). PCR products (656 bp region of *Zm_hap2*) for the ZM_BFb0162K03 (1925 bp) maize sequence were observed for the cDNA of pollen grains, ovary, leaves, and roots of the haploinducing and control maize lines. Using the Blastx program, we found significant homology of the maize translated proteins to the GEX2, TET11, and TET12 proteins, involved in *Arabidopsis* gamete-fusion contacts.

Keywords: double fertilization, maize, gamete-fusion genes, *Zm_hap2* gene, sequencing, bioinformatic analysis