

ИНДУКЦИЯ И ВЫЯВЛЕНИЕ НЕРЕДУЦИРОВАННЫХ ЖЕНСКИХ И МУЖСКИХ ГАМЕТОФИТОВ У КУКУРУЗЫ И СОРГО С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И РАЗНОПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ ($2n \times 4n$)

Мавлютова Л. И.¹, Эльконин Л. А.¹, Колесова А. Ю.¹, Беляева Е. В.¹, Геращенко Г. А.²

¹ ФГБНУ "Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока", Саратов, Россия

² Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

lidia.bahteewa@yandex.ru

Экспериментальное создание линий и гибридов возделываемых растений, способных к апомиктичному размножению в течение многих лет привлекало внимание генетиков и селекционеров растений. Формирование нередуцированных зародышевых мешков (ЗМ) – важный компонент апомиктичного размножения у растений. Известно, что мутации в гене *ameiotic*, контролирующем расхождение гомологичных хромосом в I делении мейоза, ведут к образованию нередуцированных гамет. С целью получения мутантов, способных к формированию нередуцированных ЗМ, нами на основе бинарного вектора pBAtC, содержащего генетическую конструкцию CRISPR/Cas для сайта-направленного мутагенеза, были сконструированы вектора p09 и p10, у которых в сайт для гидРНК были встроены фрагменты нуклеотидной последовательности гена *ameiotic*. Данные вектора посредством агробактериальной трансформации были введены в геном линии кукурузы АТ ГПЛ, обладающей способностью к гаплоидному партеногенезу, а также в геном сорго (сорт Аванс). В результате было получено 16 трансгенных растений кукурузы (частота трансформации 4.4–11.5%) и 6 растений сорго (9.4%), несущих генетические конструкции CRISPR/Cas.

Для выявления мутантов, способных к формированию нередуцированных ЗМ использовался цитологический анализ пыльцы. Среди регенерантов кукурузы было выявлено одно растение с крупными фертильными пыльцевыми зёрнами (ПЗ). У сорго такие растения были выявлены в T_1 в потомстве двух регенерантов (частота крупных ПЗ – 26–34%).

Для дальнейшего исследования полученных мутантов предполагается использовать гетероплоидные скрещивания ($2n \times 4n$), которые являются эффективным инструментом для выявления нередуцированных ЗМ. В таких скрещиваниях, в случае оплодотворения нередуцированного ЗМ пыльцой тетраплоида, в эндосперме восстанавливается баланс материнского и отцовского геномов (2м:1о), необходимый для развития полноценных выполненных зерновок.

В наших экспериментах при скрещивании некоторых линий и гибридов кукурузы с тетраплоидными линиями было обнаружено формирование выполненных зерновок, при этом частота зерновок с нередуцированными ЗМ, из которых развивались диплоидные, фенотипически матроклинные растения и тетраплоидные гибриды, составляла 17.6%.

Анализ плоидности эндосперма выполненных зерновок с помощью проточной цитометрии показал, что у большинства зерновок 1-й пик флуоресценции наблюдался при значениях, в два раза превышающих таковые в эндосперме диплоидов (ЗС), и соответствовал 6С, характерной для эндосперма тетраплоидов, что может свидетельствовать о развитии выполненных зерновок в скрещиваниях $2n \times 4n$ у кукурузы на основе нередуцированных ЗМ. Генотипирование диплоидных растений, полученных из таких зерновок, по всем 10 хромосомам кукурузы с помощью полиморфных SSR- и Indel-маркеров, дифференцирующих отцовскую линию от материнских линий, показало, что у этих растений наблюдалась амплификация преимущественно аллелей материнских хромосом. Однако у каждого из изученных растений были отмечены случаи амплификации аллелей, по крайней мере, одной отцовской хромосомы, что, возможно, свидетельствует о формировании таких растений на основе оплодотворения нередуцированных ЗМ и последующей элиминации хромосом преимущественно отцовской линии. Таким образом, наши исследования показывают, что сочетание методов классической генетики и современной биотехнологии открывает новые перспективы в решении проблемы апомиксиса. Исследования проведены при поддержке Российского Научного фонда (грант №24-16-00063).

Ключевые слова: апомиксис, мей-мутанты, ген *ameiotic*, технология CRISPR/Cas, гетероплоидные скрещивания, сорго, кукуруза.

INDUCTION AND IDENTIFICATION OF UNREDUCED FEMALE AND MALE GAMETOPHYTES IN MAIZE AND SORGHUM USING GENOME EDITING AND HETEROPLOIDY CROSSES ($2n \times 4n$)

Mavlyutova L. I.¹, Elkonin L. A.¹, Kolesova A. Y.¹, Belyaeva E. V.¹, Gerashchenkov G. A.²

¹ Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry & Genetics UFRC RAS, Ufa
lidia.bahteewa@yandex.ru

Experimental creation of lines and hybrids of cultivated plants capable of apomictic reproduction has attracted the attention of geneticists and plant breeders for many years. Formation of unreduced embryo sacs (ESs) is an important component of apomictic reproduction in plants. It is known that mutations in the *ameiotic* gene, which controls the homologous chromosome segregation in the first meiotic division, lead to the formation of unreduced gametes. In order to obtain mutants capable of forming unreduced ESs, we constructed vectors p09 and p10. These vectors are based on the binary vector pBAtC containing the CRISPR/Cas genetic construct for site-directed mutagenesis, in which fragments of the nucleotide sequence of the *ameiotic* gene were inserted into the site for guide RNA. These vectors were introduced into the genome of the AT GPL maize line, which has the ability for haploid parthenogenesis, and into the genome of the grain sorghum cultivar Avans using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. As a result, 16 transgenic maize plants (transformation frequency 4.4–11.5%) and 6 sorghum plants (9.4%) carrying the CRISPR/Cas genetic constructs were obtained.

To identify mutants capable of forming unreduced ESs, cytological analysis of pollen was used. Among the maize regenerants, one plant with large fertile pollen grains (PGs) was identified. In sorghum, such plants were identified in the T₁ progeny of two regenerants (the frequency of large PGs is 26–34%).

For further study of these mutants, it is proposed to use heteroploid crosses ($\text{♀ } 2n \times \text{♂ } 4n$), which are an effective tool for identifying unreduced ESs. In such crosses, in the case of fertilization of unreduced ES by pollen of tetraploids, the balance of maternal to paternal genomes (2m:1o) is restored in the endosperm, which is necessary for the development of normally developed plump kernels.

In our experiments, when crossing maize diploid lines and hybrids with tetraploid lines, the formation of plump kernels was detected, the frequency of kernels with unreduced ESs, from which diploid, phenotypically matroclinous plants and tetraploid hybrids developed, was 17.6%.

The analysis of the endosperm ploidy of the plump kernels using flow cytometry showed that in most kernels the 1st fluorescence peak was observed at values twice as high as those in the endosperm of diploids (3C) and corresponded to 6C peculiar to endosperm of tetraploids. These data may indicate the development of plump kernels in the $2n \times 4n$ maize crosses on the basis of unreduced ESs. Genotyping of diploid plants obtained from such kernels for all 10 maize chromosomes using polymorphic SSR and Indel markers differentiating the paternal and maternal parents, showed that in these plants amplification of maternal chromosome alleles was observed predominantly. However, in each of the studied plants amplification of alleles of at least one paternal chromosome was observed. This result may indicate the formation of such plants as a result of the fertilization of unreduced ESs by diploid pollen grain and subsequent elimination of chromosomes mainly of the paternal line.

Thus, our research demonstrates that the combination of classical genetics and modern biotechnology methods opens up new prospects for solving the problem of apomixis.

The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-16-00063).

Keywords: apomixis, *mei*-mutants, *ameiotic* gene, CRISPR/Cas technology, heteroploid crosses, sorghum, maize.