



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С МЕТИЛИРОВАНИЕМ ДНК У ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КУКУРУЗЫ

Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гуторова О.В., Гусев Ю.С., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
410049 Саратов, пр-т. Энтузиастов, д. 13
E-mail: chumakovmi@gmail.com

Резюме

Приведены экспериментальные данные об экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *hon101*, *chr106*), в завязях, зародышевых мешках при экспериментальной задержке опыления на 3, 7 дней и в проэмбрио, зародышах и эндосперме партеногенетической (АТ-3) и контрольной (ГПЛ-1) линий кукурузы через 3, 7 дней после опыления. У кукурузы линий АТ-3 и ГПЛ-1 обнаружено отличие в экспрессии гена *dmt102* в завязях и зародышевых мешках при искусственной задержке опыления и гена *hdt104* в зародышевых мешках и эндосперме после опыления. Через семь дней после опыления в зародышах обеих линий экспрессия всех исследованных (кроме *chr106*) генов была подавлена. А в эндосперме партеногенетической линии АТ-3 спустя семь дней после опыления зарегистрирована экспрессия четырех (*dmt103*, *hdt104*, *hon101*, *chr106*) из шести исследованных генов.

Ключевые слова: кукуруза; *Zea mays*; женский гаметофит; гены метилирования ДНК; хроматин-моделирующие белки; матроклинный партеногенез; гиногенез

Цитирование: Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гуторова О.В., Гусев Ю.С., Чумаков М.И. Анализ экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК у партеногенетической кукурузы. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С. 187-192. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-26

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF DNA METHYLATION GENES AT PARTHENOGENETIC MAIZE LINE

Volokhina I.V., Moiseeva Ye.M., Gutorova O.V., Gusev Yu.S., Chumakov M.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. E-mail: chumakovmi@gmail.com

Resume

This article is devoted to the expression of DNA methylation genes in the parthenogenetic (AT-3) and control (DDH-1) maize lines. We obtained for the first time experimental data on the DNA methylation gene expression in the parthenogenetic AT-3 maize line embryo sac before and after pollination. In particular, the data on the expression of DNA methylation genes (*dmt102*, *dmt103*, *hdt104*, *hon101*, and *chr106*) in the maize female generative tissue (before and after fertilization) of the AT-3 and DDH-1 maize lines, were observed. We not observed any differences in the DNA methylation genes expression in the maize ovaries (except *dmt102* gene), and in the embryo sacs (except *hdt104* gene) during 3-7 days delayed pollination for AT-3 and control maize lines. Surprisingly, the expression of all investigated genes (excluding *chr106*) were suppressed in AT-3 and DDH-1 maize lines proembryos at the 3-7th days after pollination. The *dmt103*, *hdt104*, *hon101*, *chr106* genes expression was registered in the AT-3 maize endosperm during the seven days after pollination. The *dmt102*, *dmt105*, *hdt104* genes was repressed in the control maize endosperm during the seven days after pollination.

Keywords: *Zea mays*; embryo development, DNA methylation genes; chromatin-modeling proteins; matroclinal parthenogenesis; gynogenesis

Citation: Volokhina I.V., Moiseeva Ye.M., Gutorova O.V., Gusev Yu.S., Chumakov M.I. Analysis of the expression of DNA methylation genes at parthenogenetic maize line. *Biomcs*. 2018. V.10(2). P. 187-192. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-26 [In Russian]

Введение

Покрытосеменные растения размножаются половым и бесполом (апомиктичным) путями. Хотя половое размножение является доминирующим у покрытосеменных, оно не является единственным способом размножения, и бесполое существует у многих видов растений. Апомиктические растения «обходят» мейоз и оплодотворение яйцеклетки, развивая партеногенетические зародыши, являющиеся генетическими клонами материнского растения [Grimanelli, 2012]. Хотя апомиксис контролируется генетически, многие локусы, способствующие его проявлению, до сих пор не определены. Считается, что у современных сортов и линий кукурузы апомиксис отсутствует, однако саратовскими селекционерами была получена линия кукурузы АТ-1 и ее производные (линии АТ-3, АТТМ), у которых автономный (без опыления) эмбрио- и эндоспермогенез (матроклинный партеногенез или гиногенез) наблюдались с повышенной (6-50% и более) частотой [Тырнов, Еналеева (Tyrnov, Enaleeva), 1983; Enaleeva, Tyrnov, 1997; Гуторова и др. (Gutorova et al.), 2016]. Линия АТ-1 выделена в самоопыленном потомстве гибрида, полученного после скрещивания линии Stock 6 [Coe, 1959] и линии Коричневый маркер (КМ), имеет антоциановую окраску [Тырнов, Еналиева (Турнов, Enaleeva), 2003]. Для линии АТ-1 характерен наследуемый тип партеногенеза, этот признак является ядерным и передается через пыльцу и яйцеклетку из поколения в поколение. Линия АТ-3 была получена скрещиванием линии АТ-1 и линии ГПЛ, имеет зеленую окраску [Тырнов, Еналеева (Tyrnov, Enaleeva), 1983; Enaleeva, Tyrnov, 1997]. В потомстве линии АТ-3 были отобраны растения, склонные к наследуемому партеногенезу, однако природа этого явления и генетический контроль не ясны до настоящего времени.

Ряд авторов считает, что апомиксис может возникнуть в результате изменения регуляции транскрипционных программ, которые контролируют половое размножение у растений и осуществляются с использованием эпигенетической регуляции [Grimanelli et al., 2003; Koltunow, Grossniklaus, 2003; Bicknell, Koltunow, 2004; Bradley et al., 2007; Grimanelli, 2012; García-Aguilar, Gillmor, 2015]. Так, при сравнении экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *chr106*, *hon101*) у кукурузы и апомиктичного гибрида кукурузы и трипсакума

(С38) было выявлено, что у гибрида экспрессия четырех (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *chr106*) из шести выше указанных генов была подавлена на трех стадиях развития (спорогенез, зрелый зародышевый мешок до оплодотворения, ранний эмбриогенез (три дня после оплодотворения)), а еще два гена (*hon101*, *hdt104*) имели гетерохронную экспрессию [García-Aguilar et al., 2010].

В связи с вышеописанным, целью данной работы был анализ экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК в завязях, зародышевых мешках, эндосперме, проэмбрио и зародыше партеногенетической кукурузы линии АТ-3 при экспериментальной задержке опыления и после оплодотворения.

Материалы и методы

Выделение РНК из растительных образцов.

Опытные растения кукурузы партеногенетической линии АТ-3 (производная от линии АТ-1 [Тырнов, Еналеева (Tyrnov, Enaleeva), 1983] выращивали на полях ФГБНУ РосНИИСК «Россорго» (Саратов). В качестве контроля для линии АТ-3 использовали линию ГПЛ-1 (дигаплоидизированный гаплоид), не обладающую способностью к матроклинному партеногенезу (гиногенезу). В период цветения (конец июля - начало августа) початки до появления рылец помещали под пергаментные изоляторы для предотвращения опыления. Выделение мРНК проводили из завязей, зародышевых мешков, зародышей и эндосперма, извлеченных из предварительно замороженных при – 20°C початков партеногенетической (АТ-3) и контрольной линий кукурузы, как было ранее описано [Волохина и др. (Volokhina et al.), 2017; Moiseeva et al., 2017]. Образцы препаратов извлекали препаративными иглами под стереоскопическим микроскопом МБС-9 (Россия) в капле охлажденного глицерина на охлажденном предметном стекле и сразу помещали в пробирку эппендорф (на льду) с экстракционным буферным раствором (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS, 10 mM β-меркаптоэтанол).

Анализ экспрессии генов метилирования ДНК у кукурузы.

С мРНК получали кДНК с олиго-Т праймерами (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя ревертазы (Fermentas, Литва) и проводили ОТ-ПЦР

анализ экспрессии генов с использованием специфических праймеров на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия).

Таблица

Аmplified with PCR fragments of several genes

Table. Fragments of several genes amplified by PCR

Гены Genes	Праймеры / Primers (5'→3')		ПЦР-продукт (п.н.) PCR-product (bp)
	Прямой / Forward	Обратный / Reverse	
<i>dmt102</i>	CCGTTGGTTCTTCCGAGCAG	GGTATCACTGTCTGACTGCC	292
<i>dmt103</i>	TGAAGACGAGGCTGCACTGGC	ACTTCCCTGTGCTTGGCCTCCA	202
<i>dmt105</i>	TACTTGCCGTTGGTTTTC	GCTTTCTCATTTCGCACCTC	535
<i>chr106</i>	GAGCGGATCATCAAGAAAGC	TGGATCATCCGATCTTCCTC	161
<i>hdt104</i>	GTAGTTGGCAAGAAGAGGGC	ACTGCCGAAAGATTTGCTGC	225
<i>hon101</i>	CTTCGAGATGATCAAGGAGG	CGAAGCCTTGACCTTCACGA	184

Праймеры (табл.) подбирали с помощью ресурса Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Условия проведения ПЦР для генов *dmt102*, *dmt103*, *dmt105*: денатурация 95 °C – 3 мин; затем 35 циклов по 95 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 1 мин. Для генов *chr106*, *hdt104*, *hon101*: денатурация 95 °C – 3 мин; а затем 35 циклов по 95 °C – 30 сек, 58 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек. В качестве внутреннего контроля использовали мРНК гена актина (*act1*) (прямой 5'-CCTGAAGATCACCTGTGCT-3', обратный 5'-GCAGTCTCCAGCTCCTGTTTC-3') 95 °C – 30 сек, 63 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин. ПЦР-продукт с кДНК фрагмента гена *act1* – 398 п.н. Результаты ПЦР визуализировали с помощью гель-электрофореза в

1,5% агарозном геле. Экспрессией гена считали варианты, где наблюдали полосу с ПЦР-продуктом, с соответствующей молекулярной массой; подавлением экспрессии гена считали варианты, где полосу с ПЦР-продуктом, с соответствующей молекулярной массой не наблюдали (рис. 1, 2).

Результаты и обсуждение

Установлено, что при экспериментальной задержке опыления на 3 дня (3 дня после появления пестичных рылец, 3ДППР) в тканях завязей кукурузы экспрессируются все исследованные гены, за исключением гена, кодирующего хромметилтрансферазу (*dmt102*) у линии АТ-3 (рис. 1).

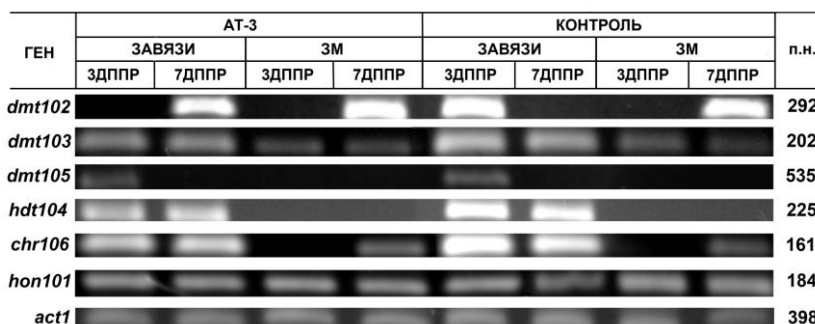


Рис. 1. Анализ экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК кукурузы, в тканях женского гаметофита при искусственной задержке опыления на 3, 7 ДППР.

Примечание: Первые сутки задержки опыления определяли со дня появления пестичных рылец (ДППР) на початках. Данные получены по 3-7 независимым экспериментам. В каждом эксперименте для анализа использовали 5 завязей и зародышевых мешков (ЗМ).

Fig. 1. Maize DNA methylation genes expression in female gametophyte tissues during 3 and 7 days of the appearance of the pestle stigmas (DAPS).

Note: * - the first day of the delay of pollination was determined from the day of the appearance of the pestle stigmas (DAPS) on the cob. The data were obtained for 3-7 independent experiments.

In each experiment were used for the analysis 5 pieces of ovaries and embryo sacs.

Через 7ДППР в тканях завязей контрольной линии кукурузы наблюдалась экспрессия всех генов,

за исключением гена *dmt102* (рис. 1). В те же сроки искусственной задержки опыления (3,7 ДППР) в

зародышевом мешке (ЗМ) экспрессия генов *dmt102*, *dmt105*, *hdt104* у АТ-3 и контрольной линий подавлена, поскольку мы не наблюдали соответствующих ПРЦ-продуктов с кДНК (рис. 1). Т.е., картина экспрессии генов, кодирующих хромметилтрансферазы (*dmt102*, *dmt105*) и гистоновую деацетилазу (*hdt104*), в завязях и в зародышевых мешках может отличаться. В связи с этим, проведение анализа экспрессии этих генов только в завязях или семяпочках, как в работе [García-Agular et al., 2010], недостаточно, необходим анализ экспрессии генов в ЗМ, хотя операция по извлечению ЗМ очень трудоемка. Различия в экспрессии исследованных нами генов, связанных с метилированием ДНК, в ЗМ партеногенетической (АТ-3) и контрольной линиях к 7ДППР проявляются только по гену *hdt104*, экспрессия которого у АТ-3 подавлена, поскольку мы не наблюдали соответствующего ПРЦ-продукта (рис. 1). Интересно отметить, что у трех (*dmt103* (метилтрансфераза), *chr106* (хроматин-модулирующий фактор), *hon101* (гистоновый линкер)) из шести исследованных генов наблюдается экспрессия и в завязях, и в ЗМ как через 3ДППР, так и через 7ДППР (рис. 1).

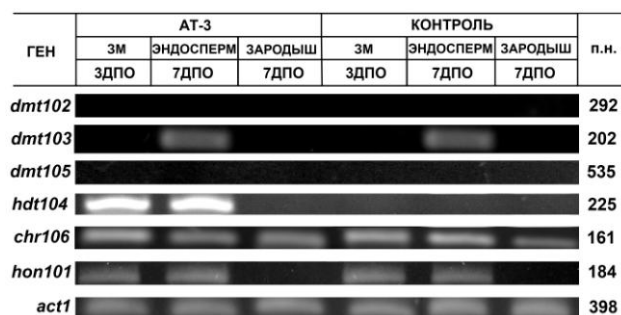


Рис. 2. Анализ экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК кукурузы в тканях женского гаметофита через 3 и 7 дней после опыления (3,7 ДПО).

Примечание: данные получены по 3-7 независимым экспериментам. В каждом эксперименте для анализа использовали по 5 образцов зародышей и 7 шт. эндосперма.

Fig. 2. Maize DNA methylation genes expression in female gametophyte tissues during 3 and 7 days after pollination (DAP).

Note: The data were obtained for 3 and 7 independent experiments. In each experiment, 5, 7 samples were used for the embryos and endosperm analysis.

В ЗМ спустя три дня после опыления (3ДПО) у партеногенетической линии АТ-3 синтез метилтрансфераз, кодируемых генами *dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, подавлен, а у контрольной линии в дополнение к указанным трем генам не обнаружена

экспрессия гистоновой диацетилазы, кодируемой геном *hdt104*. Через 7ДПО в зародышах обеих линий экспрессия всех генов, связанных с метилированием ДНК (кроме *chr106*) подавлена (рис. 2).

В это же время в эндосперме партеногенетической (АТ-3) линии через 7ДПО зарегистрирована экспрессия всех исследованных генов (кроме *dmt102*, *dmt105*, рис. 2). В эндосперме контрольной линии через 7ДПО наблюдается экспрессия генов *dmt103*, *chr106*, *hon101*, поскольку были обнаружены соответствующие ПРЦ-продукты с кДНК (рис. 2). Различие между исследованными линиями зарегистрировано в завязях: у контрольной линии через 3ДППР наблюдается экспрессия гена *dmt102*, в то время как у линии АТ-3 его экспрессия подавлена (рис. 2). Обусловлено ли это различие партеногенетически развивающимся проэмбрио предстоит выяснить. Во всех исследованных ЗМ картина экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК, у исследованных линий при задержке опыления на 3 и 7 дней выглядит одинаково (рис. 2). После опыления (7ДПО) наблюдается различие в экспрессии гена *hdt104*, кодирующего гистоновую деацетилазу: в эндосперме линии АТ-3 наблюдается экспрессия *hdt104*, в то время как у контрольной линии этот ген репрессирован (рис. 2).

Закключение

Таким образом, установлено, что в экспрессии исследованных генов, связанных с метилированием ДНК (*dmt102*, *dmt103*, *dmt105*, *hdt104*, *chr106*, *hon101*), наблюдаются отличия у партеногенетической линии АТ-3 и контрольной линий в зародышевых мешках до опыления (ген *dmt102*), и в зародышах через 7 дней после опыления (ген *hdt104*). Спустя 3 и 7 дней после опыления в зародышах у исследованных партеногенетической (АТ-3) и контрольных линий кукурузы экспрессия всех генов, связанных с метилированием ДНК (кроме *chr106*), подавляется. Спустя семь дней после опыления разница между партеногенетической (АТ-3) и контрольной линиями наблюдается в экспрессии гена *hdt104* в эндосперме – у линии АТ-3 наблюдается экспрессия гена *hdt104*, в то время как в эндосперме контрольной линии ген *hdt104* репрессирован.

Благодарности

Статья посвящена памяти В.С. Тырнова, начавшего работы по апомиксису кукурузы более 40 лет назад и стимулировавшему наш интерес к данной тематике и к линии кукурузы АТ-3, полученной в его лаборатории. Авторы признательны Ю.В. Смолькиной за предоставленную возможность

работать с линиями АТ-3 и ГПЛ-1. И.Б. Иванову мы благодарим за помощь в получении образцов завязей кукурузы. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-016-00155.

Литература

1. Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуторова О.В., Чумаков М.И. Анализ генов, контролирующих процесс слияния гамет, у гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-П. *Онтогенез*. 2017. Т. 48(2). С. 134-139. doi:10.7868/S0475145017020094
2. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2016. Т. 18(2). С. 341-344.
3. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы. *Доклады Академии Наук*. 1983. Т. 272. С. 722-725.
4. Хохлов С.С., Малышева Н.А. Распространение и формы апомиксиса у злаков. Апомиксис и селекция. М.: Наука. 1970. С. 21-55.
5. Koltunow A.M., Grossniklaus U. Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. V. 54. P. 547-574. doi:10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842
6. Bicknell R., Koltunow A. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 228-245. doi:10.1105/tpc.017921
7. Bradley J., Carman J., Jamison M., Naumova T. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (*Andropogoneae*, *Poaceae*). *Sexual Plant Reproduction*. 2007. V. 20. P. 9-17. doi:10.1007/s00497-006-0038-0
8. Coe E.H. A line of maize high haploid frequency. *American Naturalist*. 1959. V.93. P.381-382.
9. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1997. V. 71. P. 74-75.
10. 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(10). P. 3249-3267. doi:10.1105/tpc.109.072181
11. Garcia-Aguilar M., Gillmor C.S. Zygotic genome activation and imprinting: parent-of-origin gene regulation in plant embryogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 27. P. 29-35. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.020
12. Grimanelli D., Garcia M., Kaszas E., Perotti E., Leblanc O. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics*. 2003. V. 165(3). P. 1521-1531.
13. Grimanelli D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15(1). P. 57-62. doi:10.1016/j.pbi.2011.10.002
14. Moiseeva Ye.M., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Chumakov M.I. Analysis of the gamete-fusion genes in the haploid-inducing ZMS-P maize line. *Rus. J. Dev. Biol.* 2017. V. 48(2). P. 117-121. doi:10.1134/S1062360417020096
15. Perotti E. 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(4). P. 585-596. doi:10.1387/ijdb.082813ol

References

1. Bicknell R., Koltunow A. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 228-245. doi:10.1105/tpc.017921
2. Bradley J., Carman J., Jamison M., Naumova T. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (*Andropogoneae*, *Poaceae*). *Sexual Plant Reproduction*. 2007. V. 20. P. 9-17. doi:10.1007/s00497-006-0038-0
3. Coe E.H. A line of maize high haploid frequency. *American Naturalist*. 1959. V.93. P.381-382.
4. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 1997. V. 71. P. 74-75.
5. 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(10). P. 3249-3267. doi:10.1105/tpc.109.072181
6. Garcia-Aguilar M., Gillmor C.S. Zygotic genome activation and imprinting: parent-of-origin gene regulation in plant embryogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 27. P. 29-35. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.020
7. Grimanelli D., Garcia M., Kaszas E., Perotti E., Leblanc O. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic

- development in *Tripsacum*. *Genetics*. 2003. V. 165(3). P. 1521-1531.
8. Grimanelli D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15(1). P. 57–62. doi:10.1016/j.pbi.2011.10.002
9. Gutorova O.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Sozdanie geneticheski markirovannyh linij kukuruzy s nasleduemym i inducirovannym tipami partenogeneza. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2016. V. 18(2). S. 341-344. [Creation the genetic marked corn lines with heritable and nonheritable types of haploid parthenogenesis] (In Russian).
10. Khokhlov S.S., Malysheva N.A. Rasprostranenie i formy apomiksisa u zlakov. Apomiksisa i selekcija. M.: Nauka. 1970. S. 21-55. [Distribution and forms of apomixis in cereals] (In Russian).
11. Koltunow A.M., Grossniklaus U. Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. V. 54. P. 547–574. doi:10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842
12. Moiseeva Ye.M., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Chumakov M.I. Analysis of the gamete-fusion genes in the haploid-inducing ZMS-P maize line. *Rus. J. Dev. Biol.* 2017. V. 48(2). P. 117–121. doi:10.1134/S1062360417020096
13. Perotti E. 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(4). P. 585-596. doi:10.1387/ijdb.082813ol
14. Tyrnov V.S., Enaleeva N.Kh. Avtonomnoe razvitie zarodysha i endosperma u kukuruzy. *Doklady Akademii Nauk*. 1983. V. 272. S. 722-725. [Autonomous development of embryo and endosperm in corn] (In Russian).
15. Volokhina I.V., Moiseeva E.M., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Chumakov M.I. Analiz genov, kontroliruyushchikh protsess sliyaniya gamet, u gaploindutsiruyushchey linii kukuruzy ZMS-P. *Ontogenez*. 2017. T. 48(2). S. 134-139. [Analysis of the gamete-fusion genes in the haploid-inducing ZMS-P maize line] (In Russian).