

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Аллельные варианты 5'-UTR и экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* у инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. российской селекции

Д.Х. Архестова^{1,2}, Б.Р. Шомахов², А.В. Щенникова¹✉, Е.З. Кочиева^{1,3}

¹ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт сельского хозяйства – филиал Федерального научного центра «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук», Нальчик, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ shchennikova@yandex.ru

Аннотация. Селекционная биофортификация направлена на обогащение съедобных частей растения микроэлементами. В рамках данной стратегии молекулярный скрининг коллекций различных культур позволяет определять аллельные варианты генов, новые аллели и сцепленность аллельных вариантов с морфологическими признаками. Кукуруза *Zea mays* L. является важной зерновой и силосной культурой, а также источником основного предшественника витамина А – β-каротина, производного β,β-ветви пути биосинтеза каротиноидов. Параллельная β,ε-ветвь запускается ликопин-ε-циклазой *LCYE*, низкая экспрессия которой приводит к росту содержания провитамина А и связана с вариабельностью регуляторной последовательности 5'-UTR гена. В настоящем исследовании проведены скрининг коллекции 165 инбредных линий кукурузы российской селекции на варианты аллелей 5'-UTR *LCYE*, а также поиск зависимости уровня экспрессии гена *LCYE* от аллельного варианта 5'-UTR в листьях 14 коллекционных линий. Проанализированные 165 линий разделились на три группы, несущие аллели А2 (64 линии), А5 (31) и А6 (70). В сравнении с А2, аллель А5 содержал две делеции (в позициях -267–260 и -296–290 от АТГ-кодона) и замену G₂₅₁→Т, тогда как аллель А6 – одну делецию (-290–296) и две замены (G₂₅₁→Т, G₂₆₅→Т). Анализ экспрессии гена *LCYE* в листовой ткани проростков образцов 14 линий, различающихся аллельными вариантами, показал отсутствие ассоциаций варианта аллеля 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии гена. Четыре линии, несущие аллели А2 (образцы 6178-1, 6709-2, 2289-3) и А5 (образец 5677), имели значительно более высокий уровень экспрессии гена *LCYE* (~0.018–0.037) по сравнению с остальными десятью проанализированными линиями (~0.0001–0.004), среди которых были представлены все три аллельных варианта.

Ключевые слова: *Zea mays* L.; инбредные линии кукурузы; ликопин-ε-циклаза; аллели *LCYE*; экспрессия гена.

Для цитирования: Архестова Д.Х., Шомахов Б.Р., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Аллельные варианты 5'-UTR и экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* у инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. российской селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):440-446. DOI 10.18699/VJGB-23-53

5'-UTR allelic variants and expression of the lycopene-ε-cyclase *LCYE* gene in maize (*Zea mays* L.) inbred lines of Russian selection

D.Kh. Arkhestova^{1,2}, B.R. Shomakhov², A.V. Shchennikova¹✉, E.Z. Kochieva^{1,3}

¹ Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Agriculture – Branch of the Federal Scientific Center “Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Nalchik, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

✉ shchennikova@yandex.ru

Abstract. In breeding, biofortification is aimed at enriching the edible parts of the plant with micronutrients. Within the framework of this strategy, molecular screening of collections of various crops makes it possible to determine allelic variants of genes, new alleles, and the linkage of allelic variants with morphophysiological traits. The maize (*Zea mays* L.) is an important cereal and silage crop, as well as a source of the main precursor of vitamin A – β-carotene, a derivative of the β,β-branch of the carotenoid biosynthesis pathway. The parallel β,ε-branch is triggered by lycopene-ε-cyclase *LCYE*, a low expression of which leads to an increase in provitamin A content and is associated with the variability of the 5'-UTR gene regulatory sequence. In this study, we screened a collection of 165 maize inbred lines of Russian selection for 5'-UTR *LCYE* allelic variants, as well as searched for the dependence of *LCYE* expression levels on the 5'-UTR allelic variant in the leaves of 14 collection lines. 165 lines analyzed were divided into three groups carrying alleles A2 (64 lines), A5 (31) and A6 (70), respectively. Compared to A2, allele A5 contained two deletions (at positions -267–260 and -296–290 from the ATG codon) and a G₂₅₁→T substitution, while allele A6 contained one deletion (-290–296) and two SNPs (G₂₅₁→T, G₂₆₅→T). Analysis of *LCYE* expression in the leaf tissue of seedlings from accessions of 14 lines

differing in allelic variants showed no associations of the 5'-UTR *LCYE* allele type with the level of gene expression. Four lines carrying alleles A2 (6178-1, 6709-2, 2289-3) and A5 (5677) had a significantly higher level of *LCYE* gene expression (~0.018–0.037) than the other 10 analyzed lines (~0.0001–0.004), among which all three allelic variants were present.
Key words: *Zea mays* L.; maize inbred lines; lycopene- ϵ -cyclase; *LCYE* alleles; gene expression.

For citation: Arkhestova D.Kh., Shomakhov B.R., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. 5'-UTR allelic variants and expression of the lycopene- ϵ -cyclase *LCYE* gene in maize (*Zea mays* L.) inbred lines of Russian selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):440-446. DOI 10.18699/VJGB-23-53

Введение

Кукуруза *Zea mays* L. является важной мировой сельскохозяйственной культурой. Климатические условия в России способствуют тому, что кукуруза преимущественно идет на силос (незрелые початки, листья и стебли), который составляет около 50 % сухого вещества основного корма сельскохозяйственных животных (Cabiddu et al., 2019; Graulet et al., 2019; Mitani et al., 2021). На зерно данная культура выращивается только в южных регионах Российской Федерации. По данным Минсельхоза, в 2021 г. было собрано 1.4 млн тонн зерна кукурузы, что примерно в 50 раз меньше в сравнении с пшеницей (<https://mcs.gov.ru/press-service/news/sbor-zernovykh-v-rossii-dostig-100-mln-tonn/>).

Как зерно, так и силос кукурузы причисляют к важным источникам антиоксидантов, включая провитамин А, представленный тремя каротиноидными соединениями: β -каротин (обеспечивает две единицы ретинола – активного витамина А, при окислительном расщеплении), β -криптоксантин (дает одну единицу ретинола, но с большей биодоступностью по сравнению с β -каротином) и α -каротин (одна единица ретинола) (LaPorte et al., 2022). Помимо диетической значимости, обогащение β -каротином и β -криптоксантином способствует существенному снижению загрязнения зерна кукурузы афлатоксином (Suwarno et al., 2019). В зерне наиболее популярных сортов и гибридов каротиноиды составляют, по разным данным, от 9.55 до 62.96 мкг/г (Trono, 2019), тогда как в листьях – уже около 200 мкг/г (Li et al., 2008; Suwarno et al., 2019).

β -Каротин и β -криптоксантин являются производными β, β -ветви пути биосинтеза каротиноидов (рис. 1), когда ликопин- β -циклаза (*LCYB*) катализирует на обоих концах молекулы полностью-*транс*-ликопина формирование β -иононовых колец с образованием β -каротина, гидроксирование которого приводит к синтезу ксантофиллов, включая β -криптоксантин (Rosas-Saavedra, Stange, 2016). Молекула α -каротина – продукт β, ϵ -ветви, запускаемой ликопин- ϵ -циклазой *LCYE* (см. рис. 1), содержит β -кольцо на одном и ϵ -кольцо на другом конце изопреноидной цепи (Rosas-Saavedra, Stange, 2016). Характерным признаком преобладания β, β - или β, ϵ -ветви считается оранжевая или светло-желтая соответственно окраска зерна кукурузы (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018).

В селекции, направленной на биообогащение кукурузы провитамином А, используются упомянутый выше ген ликопин- ϵ -циклазы (*LCYE*), а также ген β -каротингидроксилазы 1 (*CrtR1*), катализирующей превращение β -каротина в β -криптоксантин (LaPorte et al., 2022). Снижение уровня экспрессии первого, второго или одновременно обоих генов приводит к смещению метаболического пути в сторону биосинтеза β -каротина как наиболее перспек-

тивного источника провитамина А (Harjes et al., 2008; Yan et al., 2010; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Zunjare et al., 2018; LaPorte et al., 2022).

Одно из основных условий успешной селекции – наличие доноров аллельных вариантов, сцепленных с желаемыми хозяйственно ценными признаками. Образцы кукурузы, для которых характерна низкая экспрессия в зерне генов *LCYE* и/или *CrtR1*, используются в селекции, в том числе в биофортификации, кукурузы с повышенным содержанием провитамина А в зерне (Pixley et al., 2013; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Menkir et al., 2017; Prasanna et al., 2020). Показано, что пониженный уровень транскриптов гена *LCYE* может быть связан с полиморфизмами в последовательности 5'-UTR гена (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018).

При всей популярности аллелей *LCYE* в биофортификации современной кукурузы, а также широком использовании кукурузы на силос исследования активности гена ограничены зерном кукурузы и практически не затрагивают фотосинтезирующие органы. Ранее нами была показана обратная зависимость между содержанием β -каротина и уровнем экспрессии гена *LCYE* в ткани листа у проростков кукурузы (Архестова и др., 2022).



Рис. 1. Упрощенная схема биосинтеза ксантофиллов.

Под действием фитоинсинтазы PSY синтезируется фитоин, из которого в результате нескольких последовательных реакций образуется *транс*-ликопин. Далее метаболический путь разделяется на ветви β, β - и β, ϵ -, и происходит биогенез β -каротина и α -каротина соответственно, а затем β -криптоксантина и ксантофиллов – зеаксантина, антраксантина, виолаксантина (β, β -каротиноиды) и лютеина (β, ϵ -каротиноиды). Преобразование β -каротина и виолаксантина под действием каротиноид-расщепляющих диоксигеназ приводит к синтезу апокаротиноидов – стриголактонов и абсцизовой кислоты (АБК) соответственно.

В данной работе проведена оценка корреляций между уровнем экспрессии *LCYE* и аллельными вариантами регуляторной области 5'-UTR гена у коллекции из 165 инбредных линий кукурузы. Также проанализирована зависимость между уровнем экспрессии и аллельным вариантом гена ликопин-ε-циклазы в листьях 14 образцов, различающихся аллелями 5'-UTR *LCYE*. В исследовании были использованы линии кукурузы, полученные в результате селекционной деятельности двух организаций Кабардино-Балкарской Республики (КБР, Северо-Кавказский федеральный округ), занимающей, благодаря климатическим условиям, первое место в РФ по выращиванию кукурузы, согласно выделяемым посевным площадям (данные Росстата за 2021 г.; https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Census_agr_2021.pdf).

Материалы и методы

Для исследования использовали 165 образцов инбредных линий кукурузы *Z. mays* двух селекционных организаций (ООО ССЦ «ОТБОР» и ИСХ КБНЦ РАН). Линии в настоящее время проходят тестирование и приведены в работе под номерами, присвоенными им селекционерами (см. Приложение)¹.

Семенной материал растений, выращенных в полевых условиях в 2022 г. (КБР, Россия), был любезно предоставлен сотрудниками ООО ССЦ «ОТБОР» (КБР, Россия) и Института сельского хозяйства филиала Кабардино-Балкарского научного центра РАН (ИСХ КБНЦ РАН, КБР, Россия). Согласно данным оригинаторов (ООО ССЦ «ОТБОР», ИСХ КБНЦ РАН), линии различаются окраской зерна (рис. 2, см. Приложение). Зерна проращивали до появления четвертого истинного листа в увлажненной почве, в условиях экспериментальной установки искусственного климата (23/25 °C, 16/8 ч – день/ночь; ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН). Листовой материал собирали и использовали для анализа аллельных вариантов гена *LCYE* и генной экспрессии.

Для идентификации аллельных вариантов из листового материала выделяли геномную ДНК, согласно (Филлюшин и др., 2023), и использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации участка последовательности 5'-UTR гена *LCYE* при следующих условиях: исходная денатурация (5 мин, 95 °C), 32 цикла (денатурация 1 мин, 95 °C; отжиг 30 с, 60 °C; синтез 45 с, 72 °C). Последовательности праймеров для амплификации: F2 (5'-AAG CATCCGACCAAAATAACAG-3') и R2 (5'-GAGAGGG AGACGACGAGACAC-3') (Harjes et al., 2008). Нарботанные фрагменты вырезали из геля (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, ZymoResearch, США) и секвенировали (праймер F2) на секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США; ЦКП «Биоинженерия» РАН, Россия). Структурный анализ проводили с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016).

Для анализа экспрессии гена суммарную РНК выделяли из 50–100 мг листовой ткани проростков с помощью RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия), чистили от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN)

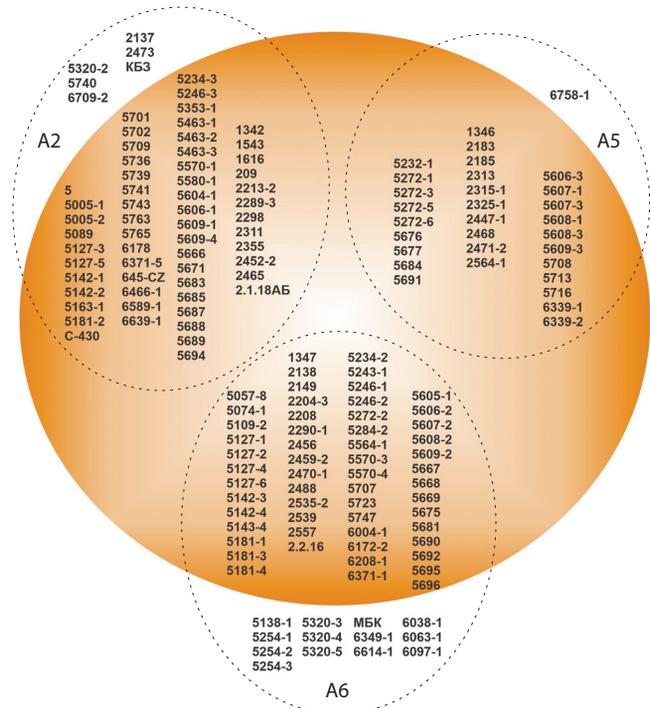


Рис. 2. Распределение 165 инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. отечественной селекции, использованных в работе, по окраске зерна и аллельному варианту 5'-UTR гена *LCYE*.

Разграничено эллипсами; внутри каждого указан соответствующий аллель – A2, A5 или A6. Белозерные образцы помещены в неокрашенную часть эллипсов; линии с окраской зерна в различных оттенках желтого, оранжевого и красного расположены в окрашенной части.

и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Качество РНК оценивали электрофорезом в 1.5 % агарозном геле. Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли флуориметрически: прибор Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США); реактивы Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США).

Уровень транскриптов гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* в листьях проростков кукурузы определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Данные нормализовали на уровень транскриптов гена *Zea mays polyubiquitin* (NM_001329666.1; праймеры ZmUBI-rf 5'-ATCG TGGTTGTGGCTTCGTTG-3' и ZmUBI-rtR 5'-GCTGCA GAAGAGTTTTGGGTACA-3'). Для реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F: 5'-TTTACGTGCAAATGCAGTCAA-3' и ZmLcyE-R: 5'-TGACTCTGAAGCTAGAGAAAG-3'), набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в трех технических и двух биологических повторах в следующих условиях: предварительная денатурация (5 мин, 95 °C); 40 циклов (15 с, 95 °C; 50 с, 62 °C).

Результаты РВ-ПЦР статистически обрабатывали с помощью GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Дан-

¹ Приложение см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx15.pdf>

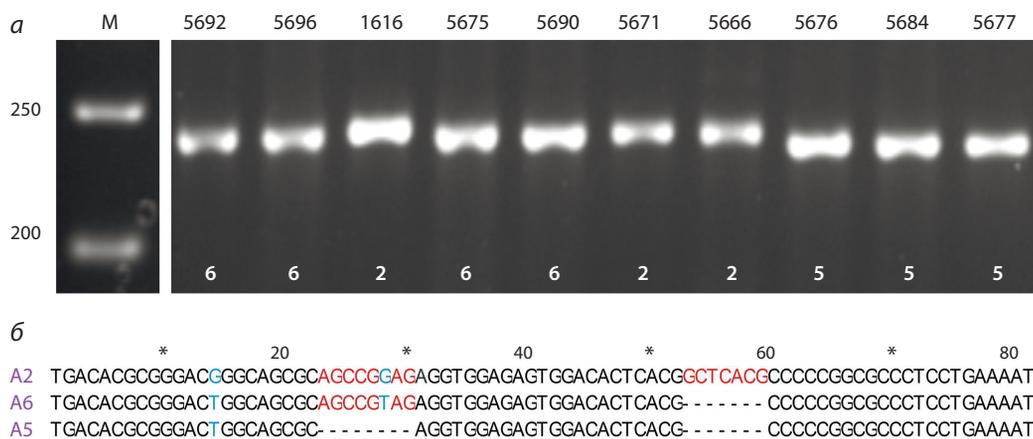


Рис. 3. Пример электрофоретического разделения фрагментов ПЦР-амплификации (а), соответствующих аллельным вариантам 5'-UTR *LCYE* A2 (248 п.н.), A5 (233 п.н.) и A6 (240 п.н.), в 2,5% агарозном геле (М – маркер длин Thermo Fisher GeneRuler 50 bp) и сравнительное выравнивание варибельного участка аллелей A2, A5 и A6 (б). Красным выделены индели, синим – SNP.

ные выражали как среднее значение со стандартным отклонением (\pm SD) на основе трех технических и двух биологических повторов. Для оценки достоверности различий в экспрессии гена между линиями кукурузы использовали *t*-test ($p < 0.05$ указывает на статистическую значимость различий).

Результаты

Исследование было сфокусировано на характеристике аллельной варибельности последовательности 5'-UTR гена *LCYE* в инбредных линиях кукурузы отечественной селекции, а также анализе уровня транскриптов гена в листовой ткани проростков образцов линий, различающихся аллельными вариантами 5'-UTR гена *LCYE*.

Для определения аллельных вариантов гена ликопин-ε-циклазы была проведена амплификация и секвенирование участка 5'-UTR гена *LCYE* (рис. 3). Ожидаемые размеры фрагментов: аллели A2 (248 п.н., согласно (Narjes et al., 2008)), A5 (233 п.н., согласно (Архестова и др., 2023)) и A4 (993 п.н., согласно (Narjes et al., 2008)).

По результатам исследований вариантов A4 не обнаружено. У анализируемых образцов были выявлены аллели A2 и A5. Кроме этих вариантов, выявлен новый, не охарактеризованный ранее аллель A6 (240 п.н.) (см. рис. 3). Всего из проанализированных 165 образцов кукурузы 64 линии содержали аллель A2, 31 линия (наименьшее число образцов) – аллель A5, 70 образцов (наибольшее число) – аллель A6 (см. рис. 2).

Определено, что, в отличие от A2, 5'-UTR аллеля A5 содержит две делеции (в позициях -267–260 и -296–290 от ATG-кодона), тогда как у нового аллеля A6 присутствует только одна из этих делеций (в позиции -290–296 от ATG-кодона) (см. рис. 3). Кроме того, были найдены аллель-специфические однонуклеотидные замены в сравнении с A2: G₂₅₁→T (в последовательностях A5 и A6); G₂₆₅→T (только у A6) (см. рис. 3). Позиции делеций и замен приведены в соответствии с доступной в базе данных NCBI последовательностью гена *LCYE* (NCBI Gene ID OK032387.1).

Варианты аллелей A2/A5/A6 были найдены у 59/30/57 беззерных и 5/1/13 образцов с пигментированным зерном соответственно. Для того чтобы понять, связан ли вариант (A2, A5 или A6) аллеля 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии гена в фотосинтезирующей ткани, в листовой ткани проростков образцов 14 линий, различающихся аллельными вариантами, был проанализирован уровень транскриптов гена *LCYE* (рис. 4). Образцы для РВ-ПЦР отбирали, исходя из двух предпосылок. Первое – в анализе должны были быть представлены все три типа аллелей (A2, A5 и A6) гена *LCYE*. Второе – предпочтение отдавалось наиболее интересным для селекционеров образцам кукурузы.

По данным РВ-ПЦР анализируемые образцы четко разделились на две группы, значительно различающиеся по уровню экспрессии гена *LCYE* (см. рис. 4). Первая группа объединила четыре линии с высоким уровнем экспрессии (~0.018–0.037), который был в 4.5–370 раз выше, чем у десяти образцов второй группы (~0.0001–0.004). Среди четырех линий с высокой экспрессией три (образцы 6178-1, 6709-2 и 2289-3) несли аллель A2 и одна линия (образец 5677) – аллель A5. При этом уровень транскриптов *LCYE* в случае линии 5677 (A5) был в 1.5–2.0 раза ниже, чем у трех линий с аллелем A2 (см. рис. 4).

В группе линий с низкой экспрессией представлены все рассматриваемые аллельные варианты 5'-UTR *LCYE* (см. рис. 4). Интересно, что сюда вошли три взятых на анализ образца с аллелем A6 (МБК, 6097-1, 5254-3). На фоне общей низкой активности гена в этой группе была характерна повышенная активность *LCYE* для образцов линий 5580-1 и 645CZ (аллельный вариант A2) (см. рис. 4).

Отметим, что образцы линий, несущих аллельный вариант A2 или A5, присутствовали как в первой, так и во второй группе (см. рис. 4).

Таким образом, на примере 14 линий, представляющих все три варианта аллеля 5'-UTR *LCYE*, показано отсутствие какой-либо зависимости уровня транскриптов гена *LCYE* от аллеля (A2, A5 или A6) в фотосинтезирующей ткани листа проростков.

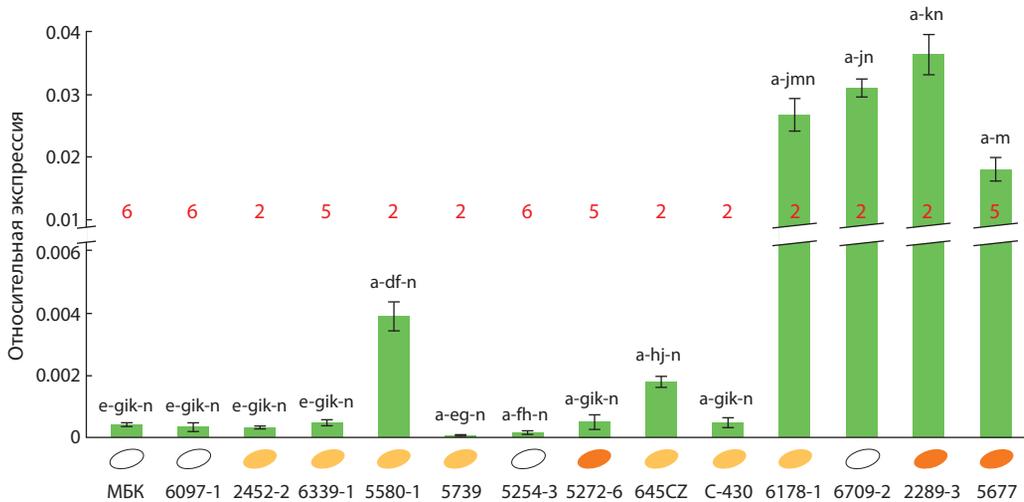


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *LCYE* в листовой ткани проростков образцов 14 инбредных линий кукурузы.

Буквами над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения экспрессии гена от значений для других образцов (образцам с 1-го по 14-й соответствуют буквы от а до п). Аллельный вариант (A2 – 2, A5 – 5, A6 – 6) указан красным шрифтом для каждого образца. Окраска зерен (белая, ярко-желтая или оранжевая) обозначена цветным эллипсом рядом с названием образца.

Обсуждение

В последние десятилетия одной из наиболее перспективных тенденций в селекции стала биофортификация (комплекс мер по улучшению питательных качеств культурных растений методами селекции с использованием ряда биотехнологий), направленная на обогащение съедобных частей растения микронутриентами (витамины, минеральные вещества и микроэлементы) (Medina-Lozano, Díaz, 2022). Такой подход в совокупности с молекулярными методами выявления родительских форм и анализа гибридного потомства позволил получить большое количество высокоурожайных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, в том числе гибридов кукурузы с высоким содержанием провитамина А (Pixley et al., 2013; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Menkir et al., 2017; Prasanna et al., 2020).

В этой связи интерес представляет молекулярный скрининг коллекций различных культур, который эффективен для определения аллельных вариантов генов, новых аллелей и сцепленности аллельных вариантов с морфофизиологическими признаками (Langridge, Fleury, 2011; Pasala, Pandey, 2020). С научной точки зрения совокупность получаемых результатов способствует более точному пониманию функции конкретных генов. Вместе с тем скрининг коллекций является важным этапом селекционной работы, так как дает возможность оценить представленность в селекционном материале конкретного аллельного варианта, определяющего искомый хозяйственно значимый признак, а также выявить доноров этого признака для введения в селекционный процесс (Langridge, Fleury, 2011).

В настоящей работе образцы 165 инбредных линий кукурузы отечественной селекции были охарактеризованы по аллельному варианту 5'-UTR гена *LCYE*. Активность ликопин-ε-циклазы считается обратной связанной с биоге-незом β-каротина и соответствующих β,β-ксантофиллов,

что, в свою очередь, определяет окраску зерна (бледно-желтая и оранжевая свидетельствуют о сдвиге в сторону β,ε- и β,β-ветвей соответственно, см. рис. 1) (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018). Снижение активности гена *LCYE* и, как следствие, значительные изменения соотношения β,ε- и β,β-каротиноидов тесно связаны с мутациями в области 5'-UTR гена, а именно со вставками мобильных элементов рядом с точкой инициации трансляции (аллели A1 и A4) (Harjes et al., 2008). Наибольшая эффективность накопления провитамина А в зерне сцеплена с аллелем A4 (Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018). С учетом этого разработаны молекулярные маркеры для определения различных аллельных вариантов последовательности 5'-UTR гена *LCYE* (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013). Скрининг коллекций *Z. mays* с помощью данных маркеров способствовал выявлению доноров аллеля A4, которые были введены в селекционные программы для получения линий и гибридов кукурузы с повышенным содержанием провитамина А (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013).

Проведенный нами анализ 165 инбредных линий не выявил образцов, несущих аллель A4, сцепленный с накоплением провитамина А. Это свидетельствует о том, что для биофортификации на повышенное содержание провитамина А следует привлекать иные источники, отличающиеся от образцов данной коллекции. Однако, кроме аллеля A2, скрининг позволил детектировать два других варианта последовательности данного участка 5'-UTR – аллель A5 (Архестова и др., 2023), а также ранее не описанный аллель A6 (см. рис. 3).

Далее мы протестировали возможность зависимости между вариантом аллеля 5'-UTR *LCYE* (A2, A5 или A6) и уровнем транскриптов гена *LCYE*. Для анализа были использованы фотосинтезирующие ткани проростков. Это объясняется тем, что, во-первых, известные исследования

гена *LCYE* кукурузы ограничены в основном данными по корреляции аллельных вариантов с содержанием каротиноидов в зерне, а во-вторых, наличие анализируемой корреляции могло бы послужить основой для выявления образцов кукурузы, являющихся донорами признака повышенного биосинтеза провитамина А в фотосинтезирующей ткани (силосе). В случае явной ассоциации какого-либо аллеля с уровнем экспрессии гена *LCYE* доноры этого аллеля могли бы быть использованы в селекции силосной кукурузы с повышенным содержанием провитамина А, что представляет интерес, учитывая популярность использования в РФ кукурузы на силос.

РВ-ПЦР была проведена на 14 образцах из 165 исследованных в данной работе. Среди этих 14 линий присутствовали все три варианта аллеля 5'-UTR *LCYE*: А2, А5 и А6. Поскольку в результате было показано отсутствие ассоциаций обнаруженных аллельных вариантов 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии *LCYE* в листе (см. рис. 4), можно предположить, что такой ассоциации нет и для всей проанализированной коллекции. Отсутствие искомой зависимости отчасти можно объяснить тем, что соотношение количества синтезируемых β,ε- и β,β-каротиноидов зависит от уровня экспрессии не только *LCYE*, но также гена ликопин-β-циклазы *LCYB* (Bai et al., 2009) или же других генов каротиногенеза, например генов фитоинсинтаз *PSY* (Орловская и др., 2016).

Данные РВ-ПЦР показали четкое разделение образцов на две группы – с высокой и низкой экспрессией *LCYE*. Принимая во внимание известную антиоксидантную роль ксантофиллов в фотозащите растения (Jahns, Holzwarth, 2012), можно предположить, что у десяти линий с низкой экспрессией *LCYE* (см. рис. 4) фотозащита осуществляется каротиноидами преимущественно основного ксантофиллового цикла (β,β-ветвь). В то же время у оставшихся четырех линий с высокой экспрессией *LCYE*, предположительно синтезирующих существенные количества β,ε-каротиноидов, такая защита может активно задействовать дополнительный лютеин-5,6-эпоксидный цикл (β,ε-ветвь).

Возможно также, что линии с низкой экспрессией *LCYE* (см. рис. 4) и предположительным смещением пути биосинтеза каротиноидов в сторону β,β-ветви синтезируют больше (в сравнении с линиями с высоким уровнем экспрессии гена) фитогормонов – стриголактонов и абсцизовой кислоты, получаемых при действии каротиноид-расщепляющих диоксигеназ (Dhar et al., 2020). Так, АБК образуется с помощью 9-цис-эпоксикаротиноид диоксигеназ NCED из 9-цис-виолаксантина и 9-цис-неоксантина (производных виолаксантина), а стриголактоны синтезируются при расщеплении β-каротина диоксигеназами CCD (Nambara, Marion-Poll, 2005; Cutler et al., 2010; Dhar et al., 2020). АБК играет решающую роль в приспособляемости растений, в том числе *Z. mays*, к различным условиям окружающей среды, опосредуя рост, развитие, стрессовый ответ и распределение питательных веществ (Huang et al., 2017; Yue et al., 2021). Стриголактоны принимают активное участие в стрессовом ответе растений (López-Ráez et al., 2010). С учетом сказанного предполагаемый повышенный синтез апокаротиноидов может свидетельствовать о большей адаптивности линий кукурузы с низкой экспрессией *LCYE* в вегетативной ткани.

Заключение

В настоящей работе проведен анализ вариантов аллеля 5'-UTR гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* в геноме 165 инбредных линий кукурузы российской селекции. В результате выделены три группы образцов, несущих аллели А2 (64 линии), А5 (31) или А6 (70). Самый короткий из них, аллель А5, отличался одной и двумя делециями от А6 и А2 соответственно. Для оценки возможной зависимости уровня мРНК *LCYE* в листьях от аллельного варианта 5'-UTR была определена экспрессия гена у 14 линий, различающихся аллельными вариантами. На основании полученных данных можно утверждать отсутствие искомым ассоциаций. Мы полагаем, что линии кукурузы с низкой экспрессией гена *LCYE* могут послужить источником признаков повышенной стрессоустойчивости растений и усиления синтеза провитамина А в фотосинтезирующей ткани. При этом маркером будет не аллельный вариант 5'-UTR *LCYE*, а уровень экспрессии гена *LCYE*. Подтверждение достоверности такой возможности потребует дальнейших исследований на большем количестве образцов.

Список литературы / References

- Архестова Д.Х., Кулакова А.В., Хатефов Э.Б., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LcyE* коррелирует с содержанием β-каротина и хлорофиллов в вегетативной ткани кукурузы. *С.-х. биология*. 2022;57(5):945-953. DOI 10.15389/agrobiology.2022.5.945rus.
- [Arkhestova D.Kh., Kulakova A.V., Khatefov E.B., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Expression of the lycopene-ε-cyclase *LcyE* gene correlates with the content of β-carotene and chlorophylls in maize vegetative tissues. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2022;57(5):945-953. DOI 10.15389/agrobiology.2022.5.945rus. (in Russian)]
- Архестова Д.Х., Ефремов Г.И., Аппаев С.П., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Новый аллель 5'-UTR *LcyE* коррелирует с повышенной экспрессией гена ликопин-ε-циклазы, определяющей поток ветви β-ε пути биосинтеза каротиноидов у кукурузы. *Генетика*. 2023;59(4):417-424. DOI 10.31857/S0016675823030025.
- [Arkhestova D.Kh., Efremov G.I., Appaev S.P., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. A new 5'-UTR *LcyE* allele correlates with increased expression of the lycopene-ε-cyclase gene determining the flow of the β-ε branch of the carotenoid biosynthesis pathway in maize. *Genetika = Genetics*. 2023;59(4):417-424. DOI 10.31857/S0016675823030025. (in Russian)]
- Орловская О.А., Вакула С.И., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Ассоциация уровня общего содержания каротиноидов в зерне кукурузы (*Zea mays* L.) с аллельным полиморфизмом сайта InDel1 гена *PSY1*. *Экол. генетика*. 2016;14(3):28-34. DOI 10.17816/ecogen14328-34.
- [Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Association of total carotenoid level in maize grain (*Zea mays* L.) with polymorphic site InDel1 in *PSY1* gene. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2016;14(3):28-34. DOI 10.17816/ecogen14328-34. (in Russian)]
- Филиюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов. *Генетика*. 2023; 59(5):517-529. DOI 10.31857/S0016675823050041.
- [Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Anthocyanin content in the *Capsicum* species fruits correlates with expression levels of flavonoid pathway structural and regulatory genes. *Russ. J. Plant Physiol*. 2023;70:4. DOI 10.1134/S1021443722602324.]
- Babu R., Rojas N.P., Gao S., Yan J., Pixley K. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on pro-

- vitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126:389-399. DOI 10.1007/s00122-012-1987-3.
- Bai L., Kim E.H., DellaPenna D., Brutnell T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J.* 2009;59(4):588-599. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2009.03899.x.
- Cabiddu A., Delgadillo-Puga C., Decandia M., Molle A.G. Extensive ruminant production systems and milk quality with emphasis on unsaturated fatty acids, volatile compounds, antioxidant protection degree and phenol content. *Animals (Basel).* 2019;9(10):771. DOI 10.3390/ani9100771.
- Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010;61:651-679. DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- Dhar M.K., Mishra S., Bhat A., Chib S., Kaul S. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism. *Brief. Funct. Genomics.* 2020;19(1):1-9. DOI 10.1093/bfpg/elz037.
- Graulet B., Cirić C., Martin B. Contrasted effects of dietary extruded linseed supplementation on carotenoid and liposoluble vitamin status in lactating Holstein or Montbéliarde cows fed hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 2019;102(7):6210-6225. DOI 10.3168/jds.2018-16138.
- Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L., Brutnell T.P., Kandianis C.B., Sowinski S.G., Stapleton A.E., Vallabhaneni R., Williams M., Wurtzel E.T., Yan J., Buckler E.S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science.* 2008;319(5861):330-333. DOI 10.1126/science.1150255.
- Huang X., Shi H., Hu Z., Liu A., Amombo E., Chen L., Fu J. ABA is involved in regulation of cold stress response in Bermudagrass. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1613. DOI 10.3389/fpls.2017.01613.
- Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1817(1):182-193. DOI 10.1016/j.bbabi.2011.04.012.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(7):1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Langridge P., Fleury D. Making the most of 'omics' for crop breeding. *Trends Biotechnol.* 2011;29(1):33-40. DOI 10.1016/j.tibtech.2010.09.006.
- LaPorte M.F., Vachev M., Fenn M., Diepenbrock C. Simultaneous dissection of grain carotenoid levels and kernel color in biparental maize populations with yellow-to-orange grain. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda).* 2022;12(3):jkac006. DOI 10.1093/g3journal/jkac006.
- Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., Wurtzel E.T. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol.* 2008;147(3):1334-1346. DOI 10.1104/pp.108.122119.
- Liu L., Jeffers D., Zhang Y., Ding M., Chen W., Kang M.S., Fan X. Introgression of the *crTRB1* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers. *Mol. Breed.* 2015;35(8):154. DOI 10.1007/s11032-015-0349-7.
- López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A.K., Sergeant M.J., Verstappen F., Bugg T.D.H., Thompson A.J., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol.* 2010;187(2):343-354. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03291.x.
- Medina-Lozano I., Díaz A. Applications of genomic tools in plant breeding: crop biofortification. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(6):3086. DOI 10.3390/ijms23063086.
- Menkir A., Maziya-Dixon B.B., Mengesha W., Rocheford T., Alamu E.O. Accruing genetic gain in pro-vitamin A enrichment from harnessing diverse maize germplasm. *Euphytica.* 2017;213(5):105. DOI 10.1007/s10681-017-1890-8.
- Mitani T., Kobayashi K., Ueda K., Kondo S. Regional differences in the fatty acid composition, and vitamin and carotenoid concentrations in farm bulk milk in Hokkaido, Japan. *J. Anim. Sci.* 2021;92(1):e13570. DOI 10.1111/asj.13570.
- Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N., Choudhary M., Saha S., Bhat J.S., Prasanna B.M., Gupta H.S. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS One.* 2014;9(12):e11583. DOI 10.1371/journal.pone.0113583.
- Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005;56:165-185. DOI 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.
- Pasala R., Pandey B.B. Plant phenomics: high-throughput technology for accelerating genomics. *J. Biosci.* 2020;45:111. DOI 10.1007/s12038-020-00083-w.
- Pixley K., Rojas N.P., Babu R., Mutale R., Surlis R., Simpungwe E. Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: Tanumihardjo S.A. (Ed.) Carotenoids and Human Health. Nutrition and Health. Totowa, NJ: Humana Press, 2013;271-292. DOI 10.1007/978-1-62703-203-2_17.
- Prasanna B.M., Palacios-Rojas N., Hossain F., Muthusamy V., Menkir A., Dhlwayo T., Ndhlela T., San Vicente F., Nair S.K., Vivek B.S., Zhang X., Olsen M., Fan X. Molecular breeding for nutritionally enriched maize: status and prospects. *Front. Genet.* 2020;10:1392. DOI 10.3389/fgene.2019.01392.
- Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. In: Stange C. (Ed.) Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry. Vol. 79. Cham: Springer, 2016;35-69. DOI 10.1007/978-3-319-39126-7_2.
- Suwarno W.B., Hannok P., Palacios-Rojas N., Windham G., Crossa J., Pixley K.V. Provitamin A carotenoids in grain reduce aflatoxin contamination of maize while combating vitamin A deficiency. *Front. Plant Sci.* 2019;10:30. DOI 10.3389/fpls.2019.00030.
- Trono D. Carotenoids in cereal food crops: composition and retention throughout grain storage and food processing. *Plants (Basel).* 2019;8(12):551. DOI 10.3390/plants8120551.
- Yan J., Kandianis B.C., Harjes E.C., Bai L., Kim E.H., Yang X., Skinner D.J., Fu Z., Mitchell S., Li Q., Fernandez M.G., Zaharieva M., Babu R., Fu Y., Palacios N., Li J., Dellapenna D., Brutnell T., Buckler E.S., Warburton M.L., Rocheford T. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta carotene in maize grain. *Nat. Genet.* 2010;42(4):322-327. DOI 10.1038/ng.551.
- Yue K., Lingling L., Xie J., Coulter J.A., Luo Z. Synthesis and regulation of auxin and abscisic acid in maize. *Plant Signal. Behav.* 2021;16(7):1891756. DOI 10.1080/15592324.2021.1891756.
- Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F., Hossain F., Baveja A., Muthusamy V., Gupta H.S. Molecular characterization of 5' UTR of the *lycopene epsilon cyclase (lcyE)* gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification. *3 Biotech.* 2018;8(1):75. DOI 10.1007/s13205-018-1100-y.

ORCID ID

D.Kh. Arkhestova orcid.org/0000-0003-1239-3641
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ «Аграрная наука – шаг в будущее развитие АПК».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.02.2023. После доработки 12.05.2023. Принята к публикации 12.05.2023.