

## ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛИКОПИН- $\epsilon$ -ЦИКЛАЗЫ *LcyE* С СОДЕРЖАНИЕМ $\beta$ -КАРОТИНА И ХЛОРОФИЛЛОВ В ВЕГЕТАТИВНОЙ ТКАНИ КУКУРУЗЫ\*

Д.Х. АРХЕСТОВА<sup>1, 2</sup>, А.В. КУЛАКОВА<sup>1</sup> ✉, Э.Б. ХАТЕФОВ<sup>3</sup>,  
А.В. ЩЕННИКОВА<sup>1</sup>, Е.З. КОЧИЕВА<sup>1</sup>

Кукуруза (*Zea mays* L.) — важная сельскохозяйственная культура, одним из ценных признаков которой считается биосинтез предшественников витамина А в зерне и фотосинтезирующей ткани. Количество провитамина А в зерне находится в зависимости от экспрессии гена ликопин- $\epsilon$ -циклазы *LcyE*, катализирующей образование  $\alpha$ -каротина и участвующей в регуляции соотношения ветвей  $\beta$ - $\beta$  и  $\beta$ - $\epsilon$  пути метаболизма каротиноидов. В настоящей работе впервые выявлено отсутствие ассоциаций между окраской зерна и содержанием суммы каротиноидов и  $\beta$ -каротина в листьях кукурузы, установлено наличие положительной связи между количеством  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b, определена обратная зависимость между содержанием  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b и уровнем экспрессии гена *LcyE*. Целью работы был анализ корреляционной связи содержания суммы каротиноидов,  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b с экспрессией гена *LcyE* в листьях инбредных линий кукурузы отечественной селекции. В работе использовали четыре инбредные линии кукурузы: три белозерные (6097-1, МБК, Тетраплоид Шумного) и одну (5580-1) с желтой окраской зерна. Зерна проращивали в увлажненной почве при 23/25 °С и режиме 16/8 ч (день/ночь) до появления 4-го настоящего листа. Суммарную РНК выделяли из 50-100 мг ткани листьев и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, «Promega», США). Экспрессию гена *LcyE* в листьях определяли методом количественной ПЦР в реальном времени с нормализацией данных по референсному гену *Zea mays polyubiquitin* (NM\_001329666.1; праймеры ZmUBI-rtF: 5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3', ZmUBI-rtR: 5'-GCTGCAGAAGAGTTTGGG-TACA-3'). Для реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F: 5'-TTTACGTGCAAATGCAGTCAA-3', 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). Проводили количественное определение содержания суммы каротиноидов, хлорофиллов а и b и  $\beta$ -каротина в листьях. Растительную ткань (0,2 г) гомогенизировали в растворе Фолча (хлороформ:метанол, 2:1 v/v) в присутствии следовых количеств Mg<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, инкубировали 1 ч при 4 °С в водяной бане со льдом и центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и 4 °С (центрифуга Eppendorf 5418 R, «Eppendorf», Германия). Собирали хлороформную фазу и измеряли содержание ликопина,  $\beta$ -каротина, суммы каротиноидов, хлорофиллов а и b. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах Eppendorf BioSpectrometer® basic («Eppendorf», Германия) и Cary 50 («Agilent Technology», США). Количество пигментов рассчитывали по соответствующим формулам. Корреляции между содержанием пигментов и экспрессией гена *LcyE* оценивали с помощью статистических методов. Самое высокое содержание каротиноидов было выявлено в листьях линии Тетраплоид Шумного. Образцы остальных трех линий синтезировали меньшее количество каротиноидов и были сходны между собой по этому параметру. В листьях линии 6097-1 было обнаружено приблизительно в 2 раза больше  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b, чем у других анализируемых линий, несущественно различающихся между собой по количеству пигментов. Поскольку  $\beta$ -каротин служит предшественником ксантофиллов основного ксантофиллового цикла фотозащиты растений, можно говорить о повышенной скорости фотосинтеза в фотосинтезирующих тканях линии 6097-1 в сравнении с другими анализируемыми линиями. Соответственно, линия 6097-1 может обладать повышенной устойчивостью к оксидативному стрессу, а также служить донором признака повышенного содержания провитамина А (как силосная культура). Также установлено, что в листьях линий 5580-1 и Тетраплоид Шумного экспрессия гена *LcyE* в ~ 4-5 раз выше, чем у линий МБК и 6097-1. Корреляционный анализ показал обратную зависимость между содержанием  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b и уровнем экспрессии гена *LcyE*. На основании полученных результатов мы предполагаем, что данные экспрессии гена *LcyE* могут быть использованы в качестве экспрессионного молекулярного маркера количества провитамина А, синтезируемого в листьях кукурузы, а также при оценке степени устойчивости растения к фотоокислительному стрессу.

\* Работа выполнена при поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ (подпрограмма «Аграрная наука — шаг в будущее развитие АПК»).

**Ключевые слова:** *Zea mays* L., кукуруза, ликопин- $\epsilon$ -циклаза, LcyE, каротиноиды, хлорофиллы, экспрессия генов.

Фотосинтез сопровождается образованием в растениях активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженной реакционной способностью (1). Действие АФК направлено на метаболические модификации белков, нуклеиновых кислот и липидов, однако избыток АФК вызывает повышенную окислительную деструкцию химических соединений в клетках.

Защита от окислительного стресса достигается за счет регуляции количества АФК и нивелирования вызываемых ими повреждений, в том числе за счет хлорофиллов и каротиноидов (2). Каротиноиды поглощают энергию света и осуществляют синглет-синглетную передачу энергии возбуждения молекулам хлорофилла. В свою очередь, хлорофиллы отдают каротиноидам избыточную энергию посредством триплет-триплетного переноса. Возвращение каротиноидов из триплетного в исходное состояние происходит благодаря рассеиванию энергии в виде тепла (1).

Следовательно, каротиноиды играют роль антиоксидантов, связанную с гашением триплетного хлорофилла и синглетного кислорода (1). Речь идет о каротиноидах ксантофиллового цикла (3), который в основном задействован в регуляции перераспределения энергии света между виолаксантином, зеаксантином и хлорофиллом а. В ответ на световой стресс виолаксантин превращается в зеаксантин через антраксантин, который действует как липидозащитный антиоксидант и стимулирует нефотохимическое тушение в светособирающем хлорофилл-а/б-белковом комплексе (3). При недостаточном освещении виолаксантин действует как светособирающее соединение, служащее для хлорофилла донором энергии. Кроме основного, у высших растений имеется дополнительный, второй, тип ксантофиллового цикла — лютеин-5,6-эпоксидный, в основе которого лежит обратимое превращение лютеина в лютеин-5,6-эпоксид (3, 4).

Биосинтез каротиноидов начинается с образования предшественника всех каротиноидов — фитоина под действием фитоинсинтазы PSY. В последующих реакциях синтезируется ликопин. Далее метаболический путь разделяется на ветви  $\beta$ - $\beta$  и  $\beta$ - $\epsilon$ , приводящие к образованию ксантофиллов основного (зеаксантин, антраксантин, виолаксантин) и дополнительного (лютеин) типов ксантофиллового цикла. В цикле первого типа ксантофиллы представляют собой производные ветви  $\beta$ - $\beta$  метаболического пути биосинтеза каротиноидов, когда под действием ликопин- $\beta$ -циклазы (LcyB) на обоих концах линейной молекулы ликопина формируются  $\beta$ -иононовые кольца ( $\beta$ -каротин; продукты гидроксирования  $\beta$ -каротина — зеаксантин, антраксантин и виолаксантин) (5, 6). В цикле второго типа ксантофиллы — это производные ветви  $\beta$ - $\epsilon$  пути биосинтеза каротиноидов. Их синтез начинается с  $\alpha$ -каротина, который представляет собой молекулу с  $\beta$ -иононовым кольцом на одном конце и  $\epsilon$ -иононовым кольцом на другом конце изопреноидной цепи, образующуюся в результате совместного действия LcyB и ликопин- $\epsilon$ -циклазы (LcyE) (конечный продукт ветви  $\beta$ - $\epsilon$  — лютеин) (5, 6).

Интересно, что  $\beta$ -криптоксантин (ксантофилл ветви  $\beta$ - $\beta$ ), как и  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротины, не только выполняет фотозащитную функцию в отношении растения-хозяина, но и служит предшественником дефицитного витамина А. При этом наиболее значим  $\beta$ -каротин, поскольку в его структуре имеется два  $\beta$ -иононовых кольца, вследствие чего окислительное расщепление  $\beta$ -каротина приводит к образованию двух молекул витамина А (7-9).

Кукуруза (*Zea mays* L.) играет все большую роль в экономике Российской Федерации как источник пищевого и технического зерна, а также в качестве силосной культуры. В связи с широкой направленностью ис-

пользования растений кукурузы важно, чтобы предшественники витамина А содержались в повышенном количестве не только в зерне (диетическое питание), но и в фотосинтезирующей ткани (защита растения от стресса, силос с повышенной кормовой ценностью).

Силос включает надземную часть растения (початки, листья, стебли) и в кормлении сельскохозяйственных животных обеспечивает около 50 % сухого вещества основного корма (10–12). Использование фотосинтезирующей ткани (особенно листьев) растений кукурузы в животноводстве может быть более выгодно экономически в сравнении с зерном. В зерне традиционных сортов и линий кукурузы каротиноиды составляют всего 0,5–2,5 мкг/г сырой массы (13–15), тогда как ксантофиллы в листьях — около 200 мкг/г сырой массы, что примерно в 100 раз больше (16).

У кукурузы идентифицированы и охарактеризованы обе ликопинциклазы — *LycE* и *LycB*, включая экспрессию кодирующих их генов в зерне (17–19). Однако данные об активности *LycE* и *LycB* в фотосинтезирующей ткани кукурузы отсутствуют. При этом полиморфизмы в последовательности гена *LycE* делают его одним из молекулярных маркеров, определяющих количество провитамина А в ткани (13, 15, 20, 21). Доноры мутантных аллелей *lcyE* активно используются в селекции линий кукурузы, продуцирующих обогащенное провитамином А зерно (14, 15, 22). Между экспрессией гена *LycE* и содержанием провитамина А существует обратная зависимость (13). Такая корреляция консервативна у высших растений, что продемонстрировано на примере листьев модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. (23).

В настоящей работе впервые выявлено отсутствие ассоциаций между окраской зерна и содержанием суммы каротиноидов и β-каротина в листьях кукурузы, установлено наличие положительной связи между количеством β-каротина и хлорофиллов а и b, определена обратная зависимость между содержанием β-каротина и хлорофиллов а и b и уровнем экспрессии гена *LycE*. Продемонстрирована возможность использования данных по экспрессии гена *LycE* в листе в качестве экспрессионного молекулярного маркера количества синтезируемого в листьях провитамина А, а также степени устойчивости растения к фотоокислительному стрессу.

Целью работы был анализ корреляционной связи содержания суммы каротиноидов, β-каротина и хлорофиллов а и b с экспрессией гена *LcyE* в листьях инбредных линий кукурузы отечественной селекции.

**Методика.** В работе использовали четыре инбредные линии кукурузы: три белозерные (6097-1, МБК, Тетраплоид Шумного) и одну (5580-1) с желтой окраской зерна. Семенной материал был любезно предоставлен Институтом сельского хозяйства филиала Кабардино-Балкарского научного центра РАН (ИСХ КБНЦ РАН, КБР, Россия). Зерна проращивали в увлажненной почве при 23/25 °С и режиме 16/8 ч (день/ночь) в условиях экспериментальной установки искусственного климата ЭУИК (ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия) до появления 4-го настоящего листа.

Суммарную РНК выделяли из 50–100 мг ткани листьев (RNeasy Plant Mini Kit, «QIAGEN», Германия), дополнительно очищали от примесей ДНК (RNase-free DNasey set, «QIAGEN», Германия) и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, «Promega», США) согласно протоколам производителей. Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Концентрацию РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 («Thermo Fisher Scientific», США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, «Invitrogen», США).

Экспрессию гена *LcyE* в листьях определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с нормализацией данных по референсному гену *Zea mays polyubiquitin* (NM\_001329666.1; праймеры ZmUBI-rtF: 5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3', ZmUBI-rtR: 5'-GCTGCAGAA-GAGTTTTGGGTACA-3'). Для реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F: 5'-TTTACGTGCAAATGCAG-TCAA-3', ZmLcyE-R: 5'-TGAСТCTGAAGСТАGAGAAAG-3'), набор Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I 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. Программа для РВ-ПЦР была следующей: 5 мин при 95 °С (исходная денатурация); 15 с при 95 °С (денатурация), 40 с при 60 °С (отжиг и синтез) (40 циклов).

Количественное определение содержания (мг/г сырой массы) суммы каротиноидов, хлорофиллов а и в и β-каротина в листьях проводили в трех технических и двух биологических повторах (24-26). Растительную ткань (0,2 г) гомогенизировали в растворе Фолча (хлороформ:метанол, 2:1 v/v) в присутствии следовых количеств Mg<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, инкубировали 1 ч при 4 °С в водяной бане со льдом и центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и 4 °С (центрифуга Eppendorf 5418 R, «Eppendorf», Германия). Собирали хлороформную фазу и измеряли содержание ликопина, β-каротина, суммы каротиноидов, хлорофиллов а и в. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах Eppendorf BioSpectrometer® basic («Eppendorf», Германия) и Cary 50 («Agilent Technology», США). Количество пигментов рассчитывали по соответствующим формулам (24, 25).

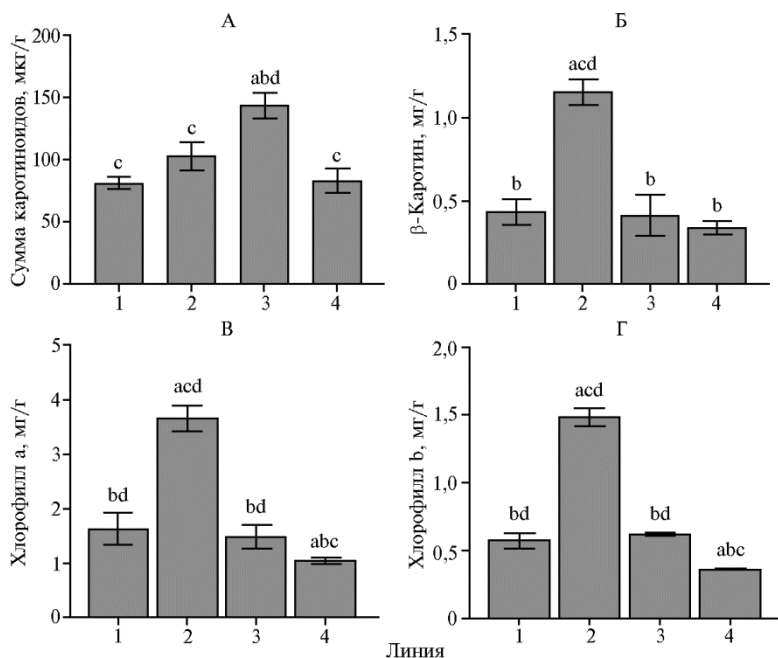
Полученные результаты обрабатывали с помощью GraphPad Prism v.8 («GraphPad Software Inc.», США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как средние значения (*M*) со стандартными отклонениями ( $\pm$ SD). Для оценки достоверности различий в экспрессии гена или в содержании пигментов между линиями кукурузы использовали *t*-критерий Уэлча (unequal variance, Welch's *t*-test) (при *p* < 0,05 различия статистически значимы). Корреляции между содержанием пигментов и экспрессией гена *LcyE* в листьях линий кукурузы также оценивали с помощью GraphPad Prism v.8. Корреляция однозначно присутствовала при  $R^2 > 0,7$ , была высоковероятна при  $R^2 = 0,4-0,7$  и отсутствовала при  $R^2 < 0,4$ .

**Результаты.** Разные оттенки окраски зерна кукурузы (от желтого до оранжевого) зависят от состава и количественного соотношения каротиноидов (27). Поэтому белозерные линии 6097-1, МБК и Тетраплоид Шумного были взяты в качестве образцов с предположительно нарушенным синтезом цветных каротиноидов (ликопина, каротинов, ксантофиллов). Желтозерная линия 5580-1 с сохраненным биосинтезом цветных каротиноидов служила контролем. Мы также определяли возможные соответствия между особенностями биосинтеза каротиноидов в зерне и фотосинтезирующей ткани. Темно-зеленая окраска листьев у всех четырех анализируемых линий свидетельствовала об успешном фотосинтезе и фотозащите, то есть в листьях осуществлялся биосинтез ксантофиллов (3).

Наибольшее содержание каротиноидов в листьях наблюдалось у линии Тетраплоид Шумного (рис. 1, А). Остальные линии синтезировали меньшее количество каротиноидов и были схожи между собой по этому показателю. В листьях линии 6097-1 было приблизительно в 2 раза больше β-каротина, чем у других анализируемых образцов (см. рис. 1, Б). В случае

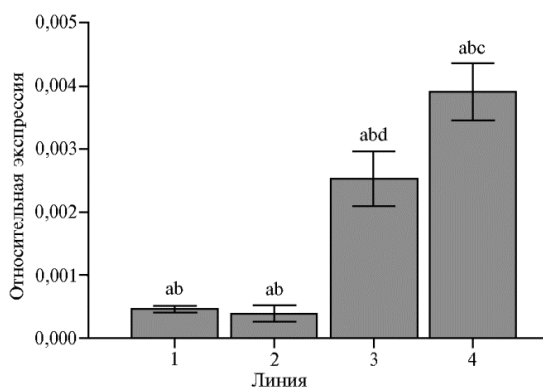
хлорофиллов а и b наблюдался сходный с  $\beta$ -каротином количественный профиль (см. рис. 1, В, Г).

Таким образом, было подтверждено отсутствие ассоциаций между окраской зерна и содержанием суммы каротиноидов и  $\beta$ -каротина в листьях кукурузы. Мы предполагаем, что это может быть связано с активностью других генов пути биосинтеза каротиноидов, например гена фитоинсинтазы *PSY*, которая катализирует синтез предшественника всех каротиноидов — фитоина. Геном кукурузы содержит три паралога *PSY*: синтез каротиноидов в эндосперме зерна запускает *PSY1*, тогда как каротиногенез в листьях зависит прежде всего от активности *PSY2* (16).



**Рис. 1.** Содержание суммы каротиноидов (А),  $\beta$ -каротина (Б), хлорофилла а (В) и хлорофилла б (Г) в листьях инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.): 1 — МБК, 2 — 6097-1, 3 — Тетраплоид Шумного, 4 — 5580-1 (лабораторный опыт,  $n = 3$ ,  $N = 2$ ).

a, b, c, d Различия между образцами статистически значимы при  $p < 0,001$ .



**Рис. 2.** Относительная экспрессия гена *LcyE* в листьях инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.): 1 — МБК, 2 — 6097-1, 3 — Тетраплоид Шумного, 4 — 5580-1 (лабораторный опыт,  $n = 3$ ,  $N = 2$ ).

a, b, c, d Различия между образцами статистически значимы при  $p < 0,001$ .

Данные анализа позволяют также предположить наличие положительной связи между количеством  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b. Поскольку  $\beta$ -каротин служит предшественником ксантофиллов основного ксантофиллового цикла фотозащиты растений (3), можно говорить о повышенной скорости фотосинтеза в фотосинтезирующих тканях линии 6097-1 в сравнении с другими анализируемыми линиями. Соответственно, линия 6097-1 может обладать повышенной устойчивостью к оксидативному стрессу, а также быть донором

признака повышенного содержания провитамина А как силосная культура.

Известно, что тип каротинов и ксантофиллов определяется соотношением ветвей  $\beta$ - $\epsilon$  и  $\beta$ - $\beta$  пути биосинтеза каротиноидов, зависящим от уровней экспрессии генов *LcyE* и ликопин- $\beta$ -циклазы *LcyB*. Кроме того, на накопление  $\beta$ -каротина влияет активность гена  $\beta$ -каротингидроксилазы 1 ( $\beta$ -*CH*, или *crtRBI*) (28).

В тех же тканях листа мы определили экспрессию гена ликопин- $\epsilon$ -циклазы *LycE* (рис. 2). Экспрессия оказалась наибольшей в листьях у линии 5580-1 и немного ниже — у линии Тетраплоид Шумного. В листьях линий МБК и 6097-1 транскрипция гена была в  $\sim 4$ -5 раз ниже (см. рис. 2). Такой межобразцовый профиль соответствует показанной ранее обратной зависимости между экспрессией *LycE* и содержанием провитамина А (13, 22). Высокая экспрессия *LycE* предположительно означает смещение биосинтеза каротиноидов в сторону ветви  $\beta$ - $\epsilon$  с наработкой  $\alpha$ -каротина и ксантофиллов неосновного (второго) типа ксантофиллового цикла с образованием лютеина и его производных.

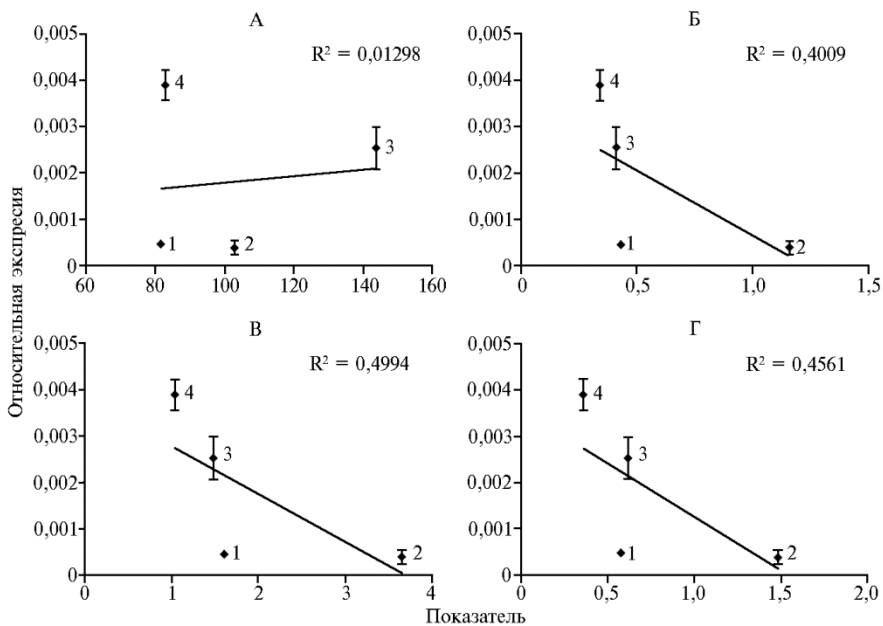


Рис. 3. Оценка корреляции между относительной экспрессией гена *LcyE* и содержанием суммы каротиноидов (мкг/г) (А),  $\beta$ -каротина (мг/г) (Б), хлорофилла а (мг/г) (В) и хлорофилла b (мг/г) (Г) в листьях инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.): 1 — МБК, 2 — 6097-1, 3 — Тетраплоид Шумного, 4 — 5580-1 (лабораторный опыт,  $n = 3$ ,  $N = 2$ ).

Корреляционный анализ подтвердил наши предположения. В то время как не наблюдалось зависимости между уровнем экспрессии гена *LycE* и содержанием суммы каротиноидов (рис. 3, А), обратная корреляция между экспрессией гена *LycE* и количеством  $\beta$ -каротина, хлорофиллов а и b (см. рис. 3, Б-Г) была предсказана с высокой вероятностью. Это согласуется с ранее полученными данными для фотосинтезирующей ткани *A. thaliana* (23).

Таким образом, окраска зерна кукурузы не коррелирует с содержанием суммы каротиноидов и  $\beta$ -каротина в листьях. При этом в листьях обнаружена положительная связь между количествами  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b. Кроме того, показана обратная зависимость между содержанием  $\beta$ -каротина и хлорофиллов а и b и уровнем экспрессии гена *LycE*.

На основании полученных результатов мы предполагаем, что данные по экспрессии гена *LycE* могут быть использованы в качестве экспрессионного молекулярного маркера количества провитамина А, синтезируемого в листьях кукурузы, а также при оценке степени устойчивости растения к фотоокислительному стрессу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 2020, 74(1): 1-16 (doi: 10.1007/s11418-019-01364-x).
2. Barolli I., Niyogi K.K. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 2000, 355(1402): 1385-1394 (doi: 10.1098/rstb.2000.0700).
3. Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2012, 1817(1): 182-193 (doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012).
4. Ладыгин В.Г. Лютеин-5,6-эпоксидный цикл — новый ксантофилловый цикл в хлоропластах растений. *Биологические мембраны*, 2008, 25(3): 163-172.
5. Cunningham F.X. Jr, Pogson B., Sun Z., McDonald K.A., DellaPenna D., Gantt E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell*, 1996, 8: 1613-1626 (doi: 10.1105/tpc.8.9.1613).
6. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. In: *Carotenoids in nature. Subcellular biochemistry, vol. 79* /C. Stange (ed.). Springer, Cham, 2016: 35-69 (doi: 10.1007/978-3-319-39126-7\_2).
7. Wong J.C., Lambert R.J., Wurtzel E.T., Rocheford T.R. QTL and candidate genes phytoene synthase and zeta-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(2): 349-359 (doi: 10.1007/s00122-003-1436-4).
8. Krinsky N.I., Johnson E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(6): 459-516 (doi: 10.1016/j.mam.2005.10.001).
9. Nagao A., Olson J.A. Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene. *The FASEB Journal*, 1994, 8(12): 968-973 (doi: 10.1096/fasebj.8.12.8088462).
10. Cabiddu A., Delgado-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*, 2019, 9(10): 771 (doi: 10.3390/ani9100771).
11. Graulet B., Cirié 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. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(7): 6210-6225 (doi: 10.3168/jds.2018-16138).
12. 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. *Journal of Animal Science*, 2021, 92(1): e13570 (doi: 10.1111/asj.13570).
13. 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).
14. Yadav O.P., Hossain F., Karjagi C.G., Kumar B., Zaidi P.H., Jat S.L., Chawla J.S., Kaul J., Hooda K.S., Kumar P., Yadava P., Dhillon B.S. Genetic improvement of maize in India: retrospect and prospects. *Agricultural Research*, 2015, 4(4): 325-338 (doi: 10.1007/s40003-015-0180-8).
15. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F., Baveja A., Muthusamy V., Gupta H.S. Molecular characterization of 5' UTR of the lycopene epsilon cyclase (*lycE*) 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).
16. 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 Physiology*, 2008, 147(3): 1334-1346 (doi: 10.1104/pp.108.122119).
17. Bai L., Kim E.-H., DellaPenna D., Brutnell T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant Journal*, 2009, 59(4): 588-599 (doi: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03899.x).
18. Luo H., He W., Li D., Bao Y., Riaz A., Xiao Y., Song J., Liu C. Effect of methyl jasmonate on carotenoids biosynthesis in germinated maize kernels. *Food Chemistry*, 2020, 307: 125525 (doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125525).
19. He W., Wang Y., Dai Z., Liu C., Xiao Y., Wei Q., Song J., Li D. Effect of UV-B radiation and a supplement of CaCl<sub>2</sub> on carotenoid biosynthesis in germinated corn kernels. *Food Chemistry*, 2019, 278: 509-514 (doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.089).

20. Zunjare R.U., Hossain F., Muthusamy V., Baveja A., Chauhan H.S., Bhat J.S., Thirunavukkarasu N., Saha S., Gupta H.S. Development of biofortified maize hybrids through marker-assisted stacking of *β-carotene hydroxylase*, *lycopene-ε-cyclase* and *opaque2* genes. *Frontiers in Plant Sciences*, 2018, 9: 178 (doi: 10.3389/fpls.2018.00178).
21. Baveja A., Muthusamy V., Panda K.K., Zunjare R.U., Das A.K., Chhabra R., Mishra S.J., Mehta B.K., Saha S., Hossain F. Development of multinutrient-rich biofortified sweet corn hybrids through genomics-assisted selection of *shrunk2*, *opaque2*, *lcyE* and *crtrB1* genes. *Journal of Applied Genetics*, 2021, 62(3): 419-429 (doi: 10.1007/s13353-021-00633-4).
22. Babu R., Rojas N.P., Gao S., Yan J., Pixley K. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtrB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(2): 389-399 (doi: 10.1007/s00122-012-1987-3).
23. Pogson B.J., Rissler H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 2000, 355(1402): 1395-1403 (doi: 10.1098/rstb.2000.0701).
24. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001: F4.3.1-F4.3.8 (doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01).
25. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum section Lycopersicon*). *Plants*, 2020, 9(9): 1169 (doi: 10.3390/plants9091169).
26. Филюшин М.А., Джос Е.А., Шенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов. *Физиология растений*, 2020, 67(6): 644 (doi: 10.31857/S0015330320050048).
27. Owens B.F., Mathew D., Diepenbrock C.H., Tiede T., Wu D., Mateos-Hernandez M., Gore M.A., Rocheford T. Genome-wide association study and pathway-level analysis of kernel color in maize. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2019, 9(6): 1945-1955 (doi: 10.1534/g3.119.400040).
28. Mehta B.K., Chhabra R., Muthusamy V., Zunjare R.U., Baveja A., Chauhan H.S., Prakash N.R., Chalam V.C., Singh A.K., Hossain F. Expression analysis of *β-carotene hydroxylase1* and *opaque2* genes governing accumulation of provitamin-A, lysine and tryptophan during kernel development in biofortified sweet corn. *3 Biotech*, 2021, 11(7): 325 (doi: 10.1007/s13205-021-02837-1).

<sup>1</sup>ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,  
Институт биоинженерии,  
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2,  
e-mail: Khavpacheva.dzhenet@mail.ru, kulakova\_97@mail.ru ✉,  
shchennikova@yandex.ru, ekochieva@yandex.ru;

<sup>2</sup>Институт сельского хозяйства,  
ФНЦ Кабардино-Балкарский научный центр РАН,  
360004 Россия, Кабардино-Балкарская Республика, г. Нальчик,  
ул. Кирова, 224/21А;

<sup>3</sup>ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт  
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,  
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44,  
e-mail: haed1967@rambler.ru

Поступила в редакцию  
15 июля 2022 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, V. 57, № 5, pp. 945-953

## EXPRESSION OF THE LYCOPENE-ε-CYCLASE *LcyE* GENE CORRELATES WITH THE CONTENT OF β-CAROTENE AND CHLOROPHYLLS IN MAIZE VEGETATIVE TISSUE

D.Kh. Arkhestova<sup>1, 2</sup>, A.V. Kulakova<sup>1</sup> ✉, E.B. Khatefov<sup>3</sup>,  
A.V. Shchennikova<sup>1</sup>, E.Z. Kochieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology RAS, 33/2, Leninsky prospect, Moscow, 119071 Russia, e-mail Khavpacheva.dzhenet@mail.ru, kulakova\_97@mail.ru (✉ corresponding author), shchennikova@yandex.ru, ekochieva@yandex.ru;

<sup>2</sup>Institute of Agriculture, Federal Kabardino-Balkarian Scientific Center RAS, 224/21A, ul. Kirova, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, 360004 Russia;

<sup>3</sup>Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail haed1967@rambler.ru

ORCID:

Arkhestova D.Kh. orcid.org/0000-0003-1239-3641

Kulakova A.V. orcid.org/00000000-0002-3124-525X

Khatefov E.B. orcid.org/00000000-0001-5713-2328

Shchennikova A.V. orcid.org/00000000-0003-4692-3727

Kochieva E.Z. orcid.org/00000000-0002-6091-0765



The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Agriculture of the Russian Federation (subprogram “Agrarian Science — a Step into the Future Development of the Agro-Industrial Complex”).

Received July 15, 2022

doi: 10.15389/agrobiology.2022.5.945eng

## Abstract

Maize (*Zea mays* L.) is an important world crop. One of the valuable traits of this plant is the biosynthesis of vitamin A precursors in kernel (dietary nutrition) and photosynthetic tissue (protection of the plant from stress; silage with increased dietary value). The amount of synthesized provitamin A in kernel depends on the level of expression of the lycopene- $\epsilon$ -cyclase *LycE* gene, which catalyzes the formation of  $\alpha$ -carotene and is involved in the regulation of the ratio of  $\beta$ - $\beta$  and  $\beta$ - $\epsilon$  fluxes of carotenoid metabolism. The aim of the study was to analyze the correlation between the content of the sum of carotenoids,  $\beta$ -carotene, and chlorophylls a and b with the expression of the *LycE* gene in the leaves of inbred maize lines of domestic selection. To achieve the goal, four inbred maize lines were used in the study: three white-grained (6097-1, MBK and Shumny's Tetraploid) and one (5580-1) with yellow grain color. Expression of the *LycE* gene in leaves was determined by quantitative real-time PCR. Quantitative determination of the amount of carotenoids, chlorophylls a and b, and  $\beta$ -carotene in leaves was carried out spectrophotometrically using the Folch method. Correlations between pigment content and *LycE* gene expression were evaluated using statistical methods. As a result, we assessed a possible correlation between the activity of the *LycE* gene and the content of carotenoids and chlorophylls in the photosynthetic tissue of four maize lines: three white-grained (6097-1, MBC and Shumnoy Tetraploid) and one (5580-1) with yellow-colored kernel. Quantification of carotenoids revealed the highest content of these pigments in the leaves of the Tetraploid Shumny line. The accessions of the remaining three lines synthesized a smaller amount of carotenoids and were similar to each other in this parameter. At the same time,  $\beta$ -carotene, as well as chlorophylls a and b, were most of all contained in the leaves of line 6097-1 — approximately 2 times more than in other analyzed lines, where the pigment content did not differ significantly. Thus, the absence of associations between the color of the kernel and the content of the  $\beta$ -carotene and sum of carotenoids in maize leaves was confirmed. On the other hand, the obtained data suggest a positive relationship between the amount of  $\beta$ -carotene and chlorophylls (a and b). It is possible to assume an increased rate of photosynthesis in the photosynthetic tissues of line 6097-1 in comparison with other analyzed maize lines. Accordingly, line 6097-1 may have an increased resistance to oxidative stress, as well as be a donor of a trait with an increased content of provitamin A (as a silage crop). The expression of the lycopene- $\epsilon$ -cyclase *LycE* gene was determined in the same leaf tissues. It was shown that the *LycE* gene was expressed ~ 4-5 times higher in the leaves of accessions of lines 5580-1 and Tetraploid Shumny than in the leaves of accessions of lines MBK and 6097-1. Correlation analysis showed an inverse relationship between the content of  $\beta$ -carotene and chlorophylls (a and b) and the level of *LycE* gene expression. Thus, in this study, for the first time, we assessed a possible correlation between the activity of the *LycE* gene and the content of carotenoids and chlorophylls in the photosynthetic tissue of white and yellow grain maize lines of domestic selection. No associations were found between grain color and the content of total carotenoids and  $\beta$ -carotene in maize leaves. A positive relationship was found between the amount of  $\beta$ -carotene and chlorophylls a and b. For the first time, an inverse relationship between the content of  $\beta$ -carotene and chlorophylls a and b and the level of *LycE* gene expression was determined. The possibility of using data on the expression of the *LycE* gene in the leaf as an expression molecular marker of the amount of provitamin A synthesized in the leaves, as well as the degree of plant resistance to photooxidative stress, was demonstrated. The data obtained can be used in maize breeding to search for donors of the trait of increased content of provitamin A in the leaves.

Keywords: *Zea mays* L., maize, lycopene- $\epsilon$ -cyclase, *LycE*, carotenoids, chlorophylls, gene expression.