

НОВЫЙ АЛЛЕЛЬ 5'-UTR *LcyE* КОРРЕЛИРУЕТ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ЛИКОПИН-ε-ЦИКЛАЗЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ ПОТОК ВЕТВИ β-ε ПУТИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ У КУКУРУЗЫ

© 2023 г. Д. Х. Архестова^{1,2}, Г. И. Ефремов¹ *, С. П. Аппаев², Е. З. Кочиева¹, А. В. Щенникова¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт сельского хозяйства — филиал Кабардино-Балкарского научного центра Российской академии наук, Нальчик, 360004 Россия

*e-mail: gleb_efremov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

После доработки 26.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Окраска зерна кукурузы *Zea mays* L. определяется содержанием и составом каротиноидов, в том числе провитамина А, являющегося продуктом ветвей β-β (β-каротин, β-криптоксантин) и β-ε (α-каротин) каротиногенеза. Соотношение потоков ветвей зависит от активности ликопин-ε-циклазы *LcyE*, определяющей ветвь β-ε. В данной работе проведен анализ аллельных вариантов гена *LcyE*, потенциально эффективных для повышения биосинтеза β-каротина, у 20 инбредных линий кукурузы отечественной селекции, различающихся окраской зерна. Амплифицированы и секвенированы участки 5'-UTR гена *LcyE*. Анализ фрагментов показал присутствие аллеля “2” у четырех линий и нового аллеля “5” у 16 линий. Охарактеризован полиморфизм нового аллеля “5” — четыре мононуклеотидных полиморфизма и две делеции. Проведенное сравнение цис-регуляторных элементов в анализируемой области 5'-UTR аллелей “2” и “5” обнаружило различие в сайтах связывания с транскрипционными факторами. Экспрессия гена *LcyE* определена в листьях двух линий с аллелем “2” и трех — с аллелем “5”. Показана прямая зависимость между присутствием аллеля “5” и снижением экспрессии гена: уровень транскрипции гена в случае аллеля “2” в 10–15 раз выше, чем в случае аллеля “5”. Предполагаем, что наличие в геноме кукурузы аллеля “5” гена *LcyE* коррелирует со снижением или подавлением экспрессии данного гена и, при стабильной активности других ферментов каротиногенеза, с окраской зерна. Использование доноров аллеля “5” в комбинации с известной темно-желтой или оранжевой окраской зерна может быть использовано в селекции кукурузы с повышенным синтезом провитамина А в зерне.

Ключевые слова: *Zea mays* L., инбредные линии кукурузы, биосинтез каротиноидов, провитамины А, ликопин-ε-циклаза, экспрессия гена, 5'-UTR-полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675823030025, **EDN:** INSQAK

Окраска зерна является важной характеристикой инбредных линий кукурузы *Zea mays* L., так как свидетельствует о наличии диетически ценных вторичных метаболитов — каротиноидов, и определяется содержанием и соотношением преимущественно лютеина, зеаксантина, β-каротина, β-криптоксантина и α-каротина [1]. Отсутствие каротиноидов или только цветных каротиноидов соответствует белой окраске зерна, тогда как обогащение зеаксантином или лютеином — оранжевой или желтой соответственно [2, 3].

В традиционных сортах кукурузы каротиноиды, являющиеся предшественниками дефицитного витамина А (β-каротин, β-криптоксантин и α-каротин), составляют всего 0.5–2.5 мкг/г сырого веса зерна [1, 4, 5]. β-Каротин и β-криптоксантин яв-

ляются производными метаболической ветви β-β пути биосинтеза каротиноидов (рис. 1,а), когда под действием ликопин β-циклазы (*LcyB*) на обоих концах линейной молекулы ликопина формируются β-иононовые кольца (β-каротин, продукты гидроксирования β-каротина — ксантофиллы, включая зеаксантин и β-криптоксантин) [6, 7]. α-Каротин является продуктом ветви β-ε (рис. 1,а) и представляет собой молекулу с β-иононовым кольцом на одном конце и ε-иононовым кольцом на другом конце изопреноидной цепи, образующуюся в результате совместного действия *LcyB* и ликопин-ε-циклазы (*LcyE*) (конечный продукт ветви β-ε — лютеин) [6, 7]. Благодаря присутствию в структуре двух β-иононовых колец окислительное расщепление β-каротина дает две молекулы вита-

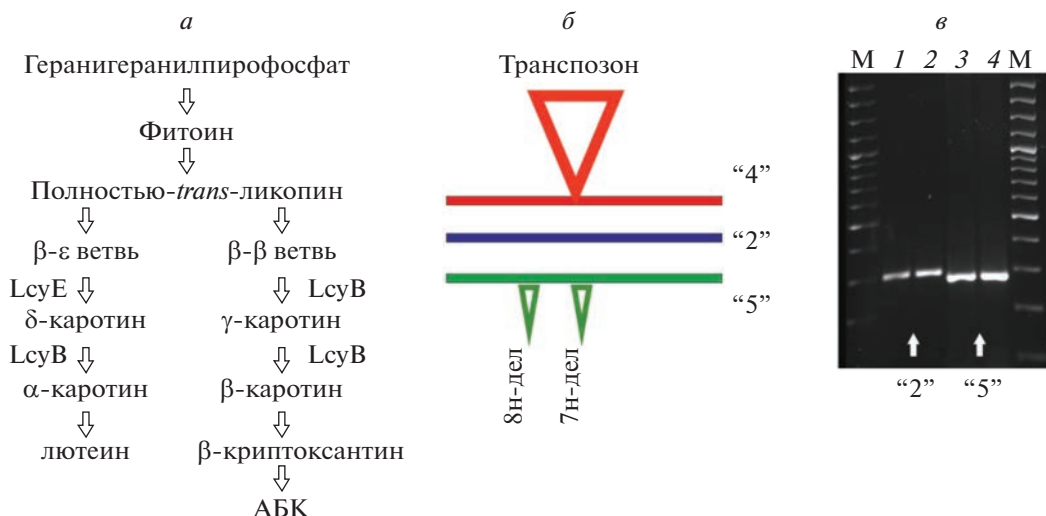


Рис. 1. *а* — схема биосинтеза каротиноидов. Ветвь β - β начинается с синтеза δ -каротина (LcyE), который далее преобразуется в α -каротин (LcyB). Ветвь β - ϵ начинается с синтеза γ -каротина (LcyB), который далее преобразуется в β -каротин (LcyB). *б* — схематичное изображение аллелей 5'-UTR *LcyE*. Аллель "2" — аллель дикого типа; аллель "4" — аллель со вставкой транспозона (650 или 993 пн), предпочтительный для синтеза провитамина А [1, 11]; новый аллель "5" отличается от аллеля "2" двумя делециями (8 и 7 пн) и четырьмя SNPs. *в* — электрофоретическое разделение продуктов ПЦР на геномной ДНК кукурузы различных инбредных линий, соответствующих аллелям "2" и "5".

мина А. Поэтому β -каротин считается наиболее значимым предшественником витамина А в сравнении с α -каротином и β -криптоксантином (по одному β -кольцу) [8–10].

Характерным признаком преобладания ветви β - β каротиногенеза и, одновременно, потенциально более высокого содержания провитамина А, является оранжевая окраска зерна кукурузы [1, 5, 11]. Интересно при этом, что в традиционных линиях кукурузы в тканях зародыша зерна преимущественно действует ветвь β - β , тогда как в эндосперме — ветвь β - ϵ , и это ассоциировано с дифференциальной экспрессией генов ликопин-циклаз *LcyB* и *LcyE* [1, 12, 13].

Ранее посредством ассоциативного картирования, в последовательности гена *LcyE* были описаны полиморфные варианты, связанные с пониженной экспрессией гена и, соответственно, повышенным содержанием провитамина А [1]. Доноры мутантных аллелей *lcyE* активно использовались в селекции линий кукурузы, продуцирующих обогащенное провитамином А зерно [5, 11, 14]. Наибольший эффект наблюдался в случае полиморфных вариантов в области 5'-UTR (*lcyE* 5'TE) по сравнению с мутациями в экзоне 1 (*lcyE* SNP216), интроне 4 (*lcyE* SNP2238) и делецией в 3'-UTR (*lcyE* 3'InDel) [1]. При этом инсерции мобильных элементов в 5'-UTR рядом с точкой инициации трансляции (аллели "1" и "4") были ассоциированы с самыми значительными изменениями соотношения синтеза каротиноидов у ветвей β - ϵ и β - β [1]. Последующие исследования подтвердили существенный рост накопления витамина А в

зернах кукурузы в случае аллеля "4" [5, 11]. Поэтому биофортификация кукурузы для получения линий с повышенным содержанием провитамина А сфокусирована главным образом на снижении экспрессии гена *LcyE* путем использования в селекции генотипов с соответствующими аллелями [1, 4, 11]. Подобная корреляция между присутствием определенных аллелей и синтезом провитамина А консервативна у высших растений, что продемонстрировано на примере модельного вида *Arabidopsis thaliana*, рапса *Brassica napus* и картофеля *Solanum tuberosum* [14–16]. В некоторых генотипах пшеницы *Triticum turgidum* также идентифицированы мутации в последовательности *LcyE*, которые потенциально могут приводить к повышению синтеза β -каротина [17].

Помимо гена *LcyE* к повышению синтеза провитамина А могут приводить мутации в гене β -каротин-гидроксилазы 1 (*CrtRB1*) — участнике ветви β - β . Сочетание у генотипа кукурузы мутантных аллелей *lcyE* и *crtRB1* увеличивает содержание β -каротина на порядок, поскольку выключение/снижение активности гена *LcyE* смещает равновесие в сторону ветви β - β , а выключение/снижение активности гена *CrtRB1* ограничивает гидроксилирование β -каротина до ксантофиллов [1, 11, 18–20].

В данной работе был проведен анализ инбредных линий кукурузы отечественной селекции на предмет наличия аллельных вариантов 5'-UTR гена *LcyE*, потенциально эффективных для повышения биосинтеза провитамина А.

Таблица 1. Линии кукурузы, использованные в работе

Номер линии	Окраска зерна	Аллель “2”	Аллель “5”
2137 ¹	Белая	+	+
2473 ²			
5254-1 ²			+
5320-5 ²			+
6097-1 ²			+
5127-4 ²	Бледно-желтая		+
6004-1 ²			+
6172-2 ²			+
6639-1 ²			+
2465 ²		+	
1543 ¹	Насыщенно-желтая		+
5692 ¹			+
5702 ¹			+
5057-8 ²		+	
5580-1 ²			+
5074-1 ²	Коричневый низ, желтый верх		+
5570-4 ²	Оранжевая		+
6466-1 ²			+
5272-6 ²			+
5677 ¹		+	

Примечание. ¹ ООО ИП АФ “ОТБОР”, ² ИСХ КБНЦ РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе использовали 20 инбредных линий кукурузы из коллекции ИСХ КБНЦ РАН и ООО ИП АФ “ОТБОР” (Кабардино-Балкария, Россия) (табл. 1). Растения выращивали в 2021 г. в полевых условиях (ИСХ КБНЦ РАН, КБР, Россия). Самоопыленные початки собирали, отдельные зерна проращивали до формирования 2–4 истинных листьев (23/25°C, 16/8 ч – день/ночь, ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН). Листовой материал использовали для анализа генной вариабельности и экспрессии.

Идентификация и анализ полиморфизмов в последовательности 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена *LcyE*. Для идентификации аллелей *LcyE*, из собранного листового материала выделяли геномную ДНК, согласно [21]. Полученные препараты затем использовали как матрицы для ПЦР-амплификации участка последовательности 5'-UTR гена *LcyE*. Программа амплификации: ис-

ходная денатурация в течение 5 мин при 95°C, далее 32 цикла (денатурация 1 мин при 95°C, отжиг 30 с при 60°C, синтез 45 с при 72°C).

Предположительные продукты амплификации с праймерами F2 (5'-AAGCATCCGACCAAAATAACAG-3') и R2 (5'-GAGAGGGAGACGACGAGACAC-3') – фрагменты ДНК 248 или 993 пн (в зависимости от аллельного варианта) в соответствии с [1].

Фрагменты ожидаемой длины вырезали из геля (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, “ZymoResearch”, США) и секвенировали с праймера F2 на автоматическом секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США; ЦКП “Биоинженерия” РАН).

Структурный анализ проводили с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 [22]. Поиск цис-регуляторных элементов в анализируемом участке 5'-UTR осуществляли с использованием PlantCARE [23].

Анализ экспрессии гена *LcyE*. 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%-ном 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 линий кукурузы определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с нормализацией данных по референсному гену *Zea mays polyubiquitin* (NM_001329666.1; праймеры ZmUBI-rtF 5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3' и ZmUBI-rtR 5'-GCTGCAGAAGAGTTTGGGTACA-3'). Для проведения реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F 5'-TTTACGTGCAATGCAGTCAA-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 двух биологических и трех технических повторах. Программа амплификации: исходная денатурация в течение 5 мин при 95°C, далее 40 циклов (денатурация 15 с при 95°C; отжиг и синтез 40 с при 60°C).

Результаты РВ-ПЦР статистически обрабатывали с помощью GraphPadPrismv.8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение со стандартным отклонением ($\pm$ SD) на основе двух биологических и трех технических повторов. Для оценки достоверности различий в экспрессии гена между линиями кукурузы использовали *t*-критерий Уэлча (unequal variance, Welch's *t*-test) (при $p < 0.05$ различия статистически значимы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Идентификация и структурный анализ участка последовательности 5'-UTR гена *LcyE* у инбредных линий кукурузы*

Для выявления возможных полиморфных вариантов участка 5'-UTR гена *LcyE*, потенциально влияющих на уровень экспрессии *LcyE*, в работе использованы 20 инбредных линий кукурузы, различающихся окраской зерна (табл. 1), что говорит о вариациях в содержании и составе каротиноидов.

Основываясь на приведенных данных, 20 инбредных линий кукурузы были протестированы на возможное присутствие либо аллеля “2”, либо аллеля “4” гена *LcyE* (рис. 1,б), где последний ассоциирован с повышенным накоплением провитамина А [1]. Амплификация соответствующего участка 5'-UTR и электрофоретический анализ ПЦР-продуктов показали отсутствие фрагментов, соответствующих аллелю “4” [1]. При этом, независимо от окраски зерна, в геномах анализируемых линий присутствовал один из двух типов фрагментов размером ~230 или ~250 пн (рис. 1,в). Фрагмент длиной ~230 пн ранее не был описан. Размер ~250 пн теоретически соответствует аллелю “2” (248 пн) *LcyE*, неблагоприятному для повышенного синтеза провитамина А, согласно [1].

Секвенирование полученных фрагментов обнаружило, что четыре линии из 20 (по одной из каждой группы, различающейся по окраске зерна) содержат аллель “2” (табл. 1). Секвенирование фрагмента 5'-UTR *LcyE* длиной 233 пн, обозначенного как аллель “5” и присутствующего у оставшихся 16 линий, выявило две делеции (размером 8 и 7 нуклеотидов) и четыре мононуклеотидных полиморфных варианта (рис. 2,а).

Сравнительный анализ последовательности аллеля “5” с доступными данными в базе GenBank NCBI обнаружил последовательности 5'-UTR *LcyE*, гомологичные по первой и/или второй делеции. Таким образом, аллель “5” встречается с большой частотой (табл. 1), что может свидетельствовать о родственном происхождении линий и косвенно подтверждается общностью их ординаторов (ИСХ КБНЦ РАН или ООО ИП АФ “ОТБОР”; КБР, Россия).

*Уровень экспрессии гомологов гена *LcyE* у линий кукурузы коррелирует с присутствием аллеля “5”*

Ранее было показано, что полиморфные варианты последовательности гена *LcyE* часто имеют критическое значение для работы фермента, и, в основном, это варианты, влияющие на уровень транскрипции гена [1, 11]. При этом предполагается высокий функциональный консерватизм *LcyE* для всех типов тканей, где может идти синтез каротиноидов, поскольку в геноме кукурузы отсутствуют другие гены, паралоги *LcyE*, в отличие, к примеру, от ключевого фермента биосинтеза каротиноидов – фитоинсинтазы PSY, имеющей три паралога (PSY1–3) с функциональной и тканевой специфичностью [24, 25].

Для оценки влияния типа аллеля на уровень экспрессии гена *LcyE* проанализированы образцы пяти линий, две из которых содержат аллель “2” и три – новый аллель “5”. Обнаружено, что уровень транскрипции гена в листьях образцов с аллелем “2” в 10–15 раз выше, чем у образцов с

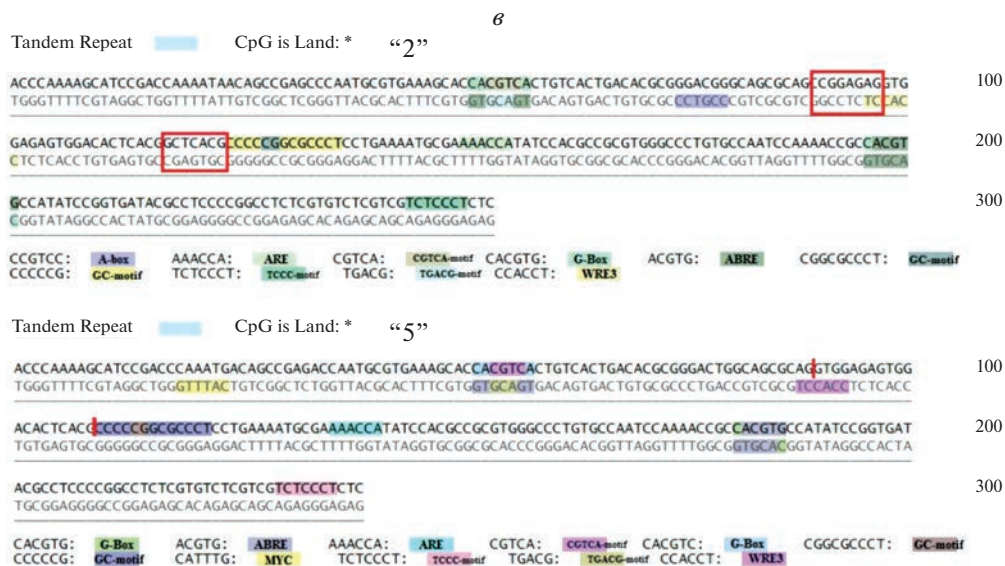
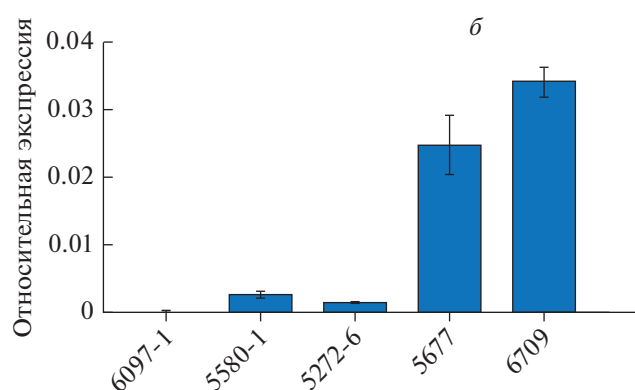


Рис. 2. *а* – сравнение последовательностей аллеля “2” (GeneID: OK032387.1) и нового аллеля “5” 5'-UTR гена *LcyE*; красным выделены мононуклеотидные полиморфизмы и делеции. *б* – профиль экспрессии гена *LcyE* в проростках линий кукурузы 6097, 5580-1, 5272-6 (аллель “5”), 5677 и 6709 (аллель “2”); буквами над столбиками указаны достоверные различия ($P < 0.01$) в уровне экспрессии *LcyE* между отдельными органами внутри одного вида. *в* – регуляторные мотивы в последовательности аллеля “2” и нового аллеля “5” 5'-UTR гена *LcyE*; красной рамкой выделены области аллеля “2”, делетированные в последовательности аллеля “5”.

аллелем “5”, где экспрессия носит следовый характер (рис. 2,б). Таким образом, наблюдается прямая зависимость между присутствием аллеля “5” и снижением экспрессии гена.

Для ранее описанных четырех типов полиморфизмов была показана ассоциация с 58% имеющимися вариациями подавления синтеза каротиноидов ветви β - ϵ [1, 11]. Можно предположить, что описанный нами полиморфизм аллеля “5” (четыре SNPs и две 7/8-пн делеции в области 5'-UTR) может быть связан с частью из оставшихся 42% вариаций.

Можно предположить, что уровень экспрессии гена *LcyE* в листьях коррелирует с синтезом каротиноидов/провитамина А не только в листьях, но и в зернах кукурузы. Проведенный сравнительный поиск цис-регуляторных элементов в последовательности аллелей “2” и “5” обнаружил, что два аллеля различаются сайтами связывания с транскрипционными факторами (ТФ) (рис. 2,в). Так, в сравнении с аллелем “2”, у аллеля “5” отсутствует А-бокс (сайт связывания с ТФ семейства bZIP) и присутствует элемент CATTG (сайт связывания с ТФ семейства MYC). Оба семейства ТФ вовлечены в ответ растений на стресс. Помимо этого, bZIP-белки также участвуют в регуляции экспрессии генов, связанной с возрастом растения [26], а MYC-белки связаны с регуляцией генов фотоморфогенеза [27]. Если говорить о выявленных мотивах в контексте экспрессии *LcyE* в зернах, то регуляция генов может быть ассоциирована, скорее, с возрастными процессами, чем с чувствительностью к световым сигналам (зерна в початке полностью защищены от освещения). Это является вероятным косвенным свидетельством стимулирующего эффекта аллеля “2” по отношению к уровню транскрипции гена *LcyE* в сравнении с аллелем “5”.

Проанализированные в работе линии кукурузы характеризуются четырьмя типами окраски зерна (табл. 1). А именно: белой (предположительно, цветные каротиноиды отсутствуют); светло-желтой (за счет лютеина; преимущество ветви β - ϵ); насыщенно желтой (соотношение каротиноидов ветвей β - ϵ и β - β может быть эквивалентным); оранжевой (за счет β -каротина и зеаксантина; преимущество ветви β - β). Интересно, что среди выявленных образцов как с аллелем “2”, так и с аллелем “5” есть линии с окраской зерна всех четырех типов (табл. 1). Светло-желтая, желтая и оранжевая окраски могут объясняться различными вариациями в уровнях экспрессии генов *LcyE* (между аллелями “2” и “5”) и ликопин- β -циклазы *LcyB* (между анализируемыми генотипами), совместно определяющими силу и соотношение потоков β - ϵ и β - β , а также в экспрессии

вышестоящих генов каротиногенеза (определяющих уровень синтеза и накопление окрашенных каротиноидов). У линий с зерном белой окраски (табл. 1) можно предположить нарушение экспрессии вышестоящих генов каротиногенеза, либо эффективную утилизацию каротиноидов (к примеру, переработку ксантофиллов ветви β - β с образованием абсцизовой кислоты).

Рассматривая полученные данные, можно сделать вывод о том, что наличие в геноме кукурузы нового аллеля “5” гена *LcyE* коррелирует со снижением или подавлением экспрессии данного гена и, при стабильной активности других ферментов каротиногенеза, с окраской зерна. Доноры аллеля “5”, формирующие зерно темно-желтой или оранжевой окраски, могут быть использованы в селекции кукурузы с повышенным синтезом провитамина А в зерне.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№ 21-16-00008) и Министерства науки и высшего образования РФ.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification // Science. 2008. V. 319. P. 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.1150255>
2. Kurilich A.C., Juvik J.A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays* // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 1948–1955. <https://doi.org/10.1021/jf981029d>
3. O'Hare T.J., Martin I., Fanning K.J. et al. Sweetcorn colour change and consumer perception associated with increasing zeaxanthin for the amelioration of age-related macular degeneration // Acta Horticulturae. 2014. V. 1040. P. 221–226. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1040.30>
4. Yadav O.P., Hossain F., Karjagi C.G. et al. Genetic improvement of maize in India: Retrospect and prospects // Agric. Res. 2015. V. 4. № 4. P. 325–338. <https://doi.org/10.1007/s40003-015-0180-8>
5. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F. et al. 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. V. 8. № 1. P. 75. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1100-y>

6. Cunningham F.X., Jr., Pogson B., Sun Z. et al. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1613–1626. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1613>
7. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: Enzymes and color // Subcell Biochem. 2016. V. 79. P. 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
8. 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 // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. № 2. P. 349–359. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1436-4>
9. Krinsky N.I., Johnson E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // Mol. Aspects of Med. 2005. V. 26. № 6. P. 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
10. Nagao A., Olson J.A. Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene // Faseb J. 1994. V. 8. № 12. P. 968–973. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.12.8088462>
11. Babu R., Rojas N.P., Gao S. et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRBI* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 389–399. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1987-3>
12. Baveja A., Muthusamy V., Panda K.K. et al. Development of multinutrient-rich biofortified sweet corn hybrids through genomics-assisted selection of *shrunk2*, *opaque2*, *lcyE* and *crtRBI* genes // J. Appl. Genet. 2021. V. 62. № 3. P. 419–429. <https://doi.org/10.1007/s13353-021-00633-4>
13. 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. V. 59. № 4. P. 588–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03899.x>
14. Yu B., Lydiate D.J., Young L.W. et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // Transgenic Res. 2008. V. 17. № 4. P. 573–585. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9131-x>
15. Diretto G., Tavazza R., Welsch R. et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase // BMC Plant Biol. 2006. V. 6. P. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-6>
16. Pogson B.J., Rissler H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2000. V. 355. № 1402. P. 1395–1403. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0701>
17. Richaud D., Stange C., Gadaleta A. et al. Identification of lycopene epsilon cyclase (*lcyE*) gene mutants to potentially increase β -carotene content in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) through TILLING // PLoS One. 2018. V. 13. № 12: e0208948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208948>
18. Yan J., Kandianis B.C., Harjes E.C. et al. Rare genetic variation at *Zea mays crtRBI* increases beta carotene in maize grain // Nat. Genet. 2010. V. 42. P. 322–327. <https://doi.org/10.1038/ng.551>
19. Liu L., Jeffers D., Zhang Y. et al. Introgression of the *crtRBI* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers // Mol. Breed. 2015. V. 35. № 8: 154. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0349-7>
20. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele // PLoS One. 2014. V. 9. № 12. P. e11583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113583>
21. Дьяченко Е.А., Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм гена сахарозсинтазы *Sus1y* образцов *Pisum sativum* L. // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 108–114. <https://doi.org/10.18699/VJ18.338>
22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
23. Lescot M. PlantCARE, a database of plant cis – acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences // Nucl. Ac. Res. 2002. V. 30. P. 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
24. Li F., Vallabhaneni R., Wurtzel E.T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress – induced root carotenogenesis // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 1333–1345. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111120>
25. Dibari B., Murat F., Chosson A. et al. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 221. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-221>
26. Vatov E., Ludewig U., Zentgraf U. Disparate dynamics of gene body and cis-regulatory element evolution illustrated for the senescence-associated cysteine protease gene *SAG12* of plants // Plants (Basel). 2021. V. 10. № 7: 1380. <https://doi.org/10.3390/plants10071380>
27. Bai J.F., Wang Y.K., Guo L.P. et al. Genomic identification and characterization of MYC family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. Article 1032. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6373-y>

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

D. H. Arkhestova^{a, b}, G. I. Efremov^{a, *}, S. P. Appaev^b, E. Z. Kochieva^a, and A. V. Shchennikova^a

^a*Institute of Bioengineering, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Institute of Agriculture – a Branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, 360004 Russia*

*e-mail: gleb_efremov@mail.ru

The color of *Zea mays* L. kernel is determined by the content and composition of carotenoids, including provitamin A, which is a product of the β - β (β -carotene, β -cryptoxanthin) and β - ϵ (α -carotene) branches of carotenogenesis. The ratio of the fluxes of the branches depends on the activity of the lycopene- ϵ -cyclase *LcyE*, which determines the β - ϵ branch. In this work, we analyzed allelic variants of the *LcyE* gene, which are potentially effective for increasing the biosynthesis of β -carotene, in 20 maize inbred lines of domestic selection, which differ in grain color. The 5'-UTR region of the *LcyE* gene were amplified and sequenced. Fragment analysis showed the presence of allele "2" in four lines and a new allele "5" in 16 lines. The polymorphism of the new allele "5" was characterized – four mononucleotide polymorphisms and two deletions. The comparison of *cis*-regulatory elements in the analyzed region of the 5'-UTR of alleles "2" and "5" revealed a difference in binding sites with transcription factors. Expression of the *LcyE* gene was determined in the leaves of two lines with the allele "2" and three lines with the allele "5". A direct relationship was shown between the presence of the allele "5" and a decrease in gene expression: the level of gene transcription in the case of the allele "2" was 10–15 times higher than in the case of the allele "5". It has been suggested that the presence of allele "5" of the *LcyE* gene in the maize genome correlates with a decrease or suppression of the *LcyE* expression and, with stable activity of other carotenogenesis enzymes, with grain color. The use of allele "5" donors in combination with the known dark yellow or orange color of the grain can be used in the breeding of maize with increased synthesis of provitamin A in the grain.

Keywords: *Zea mays* L., maize inbred lines, carotenoid biosynthesis, provitamin A, lycopene- ϵ -cyclase, gene expression, 5'-UTR-polymorphism.