

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ТРАНЗИТНОГО ПЕПТИДА ФИТОИНСИНТАЗЫ ZMPSY1 СВЯЗАНА С БЕЛОЙ ОКРАСКОЙ ЭНДОСПЕРМА ЗЕРНА У ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

© 2024 г. Д. Х. Архестова^{1, 2}, А. Д. Хаудов², А. В. Щенникова^{1, *}, Е. З. Кочиева^{1, 3}

¹Федеральный 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

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия
*e-mail: shchennikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 10.04.2024 г.

Желто-оранжевая окраска зерна кукурузы *Zea mays* L. определяется присутствием каротиноидов, первым ферментом пути биосинтеза которых является фитоинсинтаза PSY. В данной работе проведен анализ аллельных вариантов гена *ZmPSY1* у образцов желтозерных и белозерных инбредных линий кукурузы отечественной селекции. У четырех линий с разной окраской зерна амплифицированы и секвенированы полноразмерные кДНК *ZmPSY1* и охарактеризована их вариабельность. В последовательности кДНК *ZmPSY1* белозерных линий обнаружено четыре несинонимичных однонуклеотидных полиморфизма (SNP), которые приводят к замещениям остатков четырех аминокислот (L47I, W52S, E53D и A54V) в N-концевом транзитном пептиде, ответственном за пластидную локализацию фермента. Разработана система праймеров для ПЦР-идентификации типа аллеля *ZmPSY1* у образцов кукурузы. Тестирование праймеров на 44-х линиях кукурузы показало присутствие аллеля *ZmPSY1* дикого типа и отсутствие мутантного аллеля в геноме всех анализируемых 22 желтозерных линий; также выявили, что мутантный аллель *ZmPSY1* встречается с частотой 41%. Использование разработанной системы праймеров может иметь перспективы в селекции кукурузы с измененным содержанием каротиноидов в эндосперме зерна.

Ключевые слова: *Zea mays* L., инбредные линии кукурузы, биосинтез каротиноидов, фитоинсинтаза PSY1, полиморфизм, окраска эндосперма.

DOI: 10.31857/S0016675824090057 **EDN:** AEKKNK

Вариабельность растительного генома – это не только инструмент эволюционной адаптации и возникновения новых видов, но и значимый фактор влияния при селекции сельскохозяйственных растений. Среди наиболее важных признаков, по которым ведется селекция культурных растений, находятся характеристики, ассоциированные со стрессоустойчивостью, урожайностью и качеством продукции. Часто признаки разной направленности взаимосвязаны. Особенно это касается содержания различных метаболитов, определяющих вкусовые, питательные и/или диетические свойства продукта и одновременно являющихся средствами защиты растения от стрессовых факторов.

Все известные хозяйственно-ценные признаки определяются генетически, и их экспрессивность связана с вариабельностью конкретных геномных локусов и/или генов. Определение аллельных вариантов генов и доноров этих аллелей

способствует значительному ускорению процесса селекции улучшенных сортов агрокультур.

В качестве примера можно привести работы по поиску генов/локусов, сцепленных с хозяйственно-ценными признаками, с дальнейшей разработкой молекулярных маркеров на значимые аллельные варианты у важнейшей злаковой культуры – кукурузы *Zea mays* L. [1, 2]. Эта культура имеет самый высокий генетический потенциал урожайности среди зерновых и выращивается в различных агроэкологических регионах мира как на зерно, так и на силос. Зерно кукурузы является источником крахмала (65–70%), белка (16.5%), масел (3–5%), клетчатки (3%), растворимых сахаров (до 2%), а также каротиноидов (провитамина А и других каротиноидов) [1, 2]. Кукуруза – теплолюбивое растение преимущественно короткого дня и подвержена негативному влиянию различных стрессовых факторов [3–5]. Соответственно ведется поиск

геномных локусов, мутаций и аллелей, которые сцеплены с качественными характеристиками зерна (включая содержание каротиноидов (в том числе провитамина А), зеинов, масел, амилопектинового крахмала и др.) и устойчивостью к патогенам и абиотическим стрессовым факторам.

На основе получаемых данных разрабатываются и используются в селекции молекулярные маркеры, ассоциированные с целевыми признаками у кукурузы. Так, выявлены аллельные варианты генов метаболизма крахмала *waxy*, *amylose extender1* и *sugary1*, которые приводят к значительному увеличению содержания амилозы в составе крахмала [6]. Охарактеризован плейотропный эффект мутантного аллеля *opaque2 (o2)*, присутствие которого увеличивает содержание незаменимых аминокислот лизина и триптофана в белковой фракции эндосперма зерна, однако снижает урожайность и повышает восприимчивость к болезням [1, 2]. В рамках работ по стрессоустойчивости разработаны маркеры признаков резистентности к фузариозной гнили початков (*Fusarium verticillioides*) и стеблей (*F. graminearum*) [3, 4]. Определена дифференциальная экспрессия генов транскрипционных факторов семейства DREB2 у растения кукурузы в ответ на воздействие различных абиотических факторов [5].

Другое современное направление в селекции кукурузы – увеличение содержания в эндосперме зерна каротиноидов, в том числе провитамина А (α -каротин, β -каротин и β -криптоксантин), количество которого у большинства желтозерных сортов/линий кукурузы в 10 раз меньше по сравнению с целевым уровнем (в рамках существующей программы биофортификации) [1, 2]. Выявлены аллельные варианты генов ликопин- ϵ -циклазы (*LCYE*) и β -каротингидроксилазы 1 (*crtRBI*), влияющие на концентрацию β -каротина. Маркеры, сцепленные с такими аллелями, способствуют выявлению доноров среди образцов кукурузы и ускорению селекции на повышенное содержание провитамина А в зерне. Более того, известны успешные попытки пирамидирования – объединения при отборе признаков увеличения количества провитамина А и незаменимых аминокислот лизина и триптофана в зерне [1, 2].

От присутствия и состава каротиноидов зависит окраска зерна. Обогащение эндосперма зерна зеаксантином или лютеином приводит соответственно к оранжевой или желтой окраске, в то время как отсутствие каротиноидов или только цветных каротиноидов – к белой окраске [7–9]. Хотя из-за дефицита каротиноидов в зерне пищевая ценность сортов белозерной кукурузы считается ниже, чем желтозерной, по другим качествам различий практически не выявлено. При этом именно мука и крупа белозерных сортов являются необходимым компонентом некоторых продуктов (чипсы, лепешки)

и основой многих национальных блюд, особенно американской, мексиканской и кавказской кухни.

В связи с этим наметилась тенденция к увеличению сортимента и селекции сортов с различным содержанием каротиноидов (и соответственно различной окраской зерна). Для этого проводится анализ варибельности генов каротиногенеза. Синтез каротиноидов начинается с активации гена фитинсинтазы *PSY* и образования предшественника всех каротиноидов – 15-*цис*-фитоина [10]. Показано, что белая окраска зерна связана с различными мутациями в последовательности геномного локуса, содержащего ген *ZmPSY1*, которые приводят к дефициту каротиноидов в эндосперме, но не в зародыше [7, 11, 12]. К примеру, рецессивный мутантный аллель гена *ZmPSY1* – *yellow endosperm 1 (y1)* оказывает упомянутый эффект на зерно, будучи и в гетерозиготном состоянии: эндосперм накапливает каротиноиды, но в незначительном количестве в сравнении с желтым и оранжевым зерном [9, 12, 13].

В настоящей работе были идентифицированы последовательности гомологов гена *ZmPSY1* у четырех инбредных линий кукурузы отечественной селекции, контрастных по окраске зерна (белая и желтая). Проведенное структурное сравнение выявило полиморфный участок в экзоне I, различающий белозерные и желтозерные образцы. Соответствие аллельных вариантов окраски зерна было протестировано на 44 инбредных линиях кукурузы, включающих белозерные и желтозерные образцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали образцы 44 инбредных линий кукурузы отечественной селекции (ООО ИПА “Отбор”, Институт сельского хозяйства (ИСХ) КБНЦ РАН (КБР), ВИР (С.-Петербург)), 22 из которых белозерные и 22 – желтозерные (табл. 1). Зерна урожая 2020 г. (все 44 образца) проращивали в увлажненной почве и растили до стадии 3–4 листа в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16 ч/8 ч, 22 °С/16 °С; освещенность 190 мкМ/(м²с)).

Из 50–100 мг листовой ткани проростков, предварительно растертой в жидком азоте, выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) с последующей очисткой от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия). Полученные препараты РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). 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).

Кодирующие последовательности гена *Zm-PSY1* амплифицировали с помощью ПЦР на препаратах кДНК двух белозерных и двух желтозерных образцов. Специфичные праймеры (forward 5'-tggtctgctgactgggtctca-3'; reverse 5'-aacaacaattcaccaggttgctc-3') подбирали на основе данных Генбанков NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MaizeGDB (<https://maizegdb.org/>). ПЦР проводили в следующих условиях: предварительная денатурация (95°C – 5 мин), амплификация в течение 35 циклов (95°C – 60 с, 60°C – 60 с, 72°C – 90 с), финальная достройка фрагментов (72°C – 5 мин). Ампликоны (ожидаемый размер 1419 пн) секвенировали с использованием тех же праймеров на ABI Prism 3730 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Для ПЦР-амплификации полиморфного участка последовательности кДНК *ZmPSY1* с разработанными праймерами использовали следующую программу: предварительная денатурация (15 мин при 95°C), 35 циклов (99°C – 45 с, 62°C – 45 с, 72°C – 45 с) и финальная достройка фрагментов (72°C – 2 мин).

Сравнительное выравнивание последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.26 (<https://www.megasoftware.net/>). Транзитный и сигнальный пептиды, консервативные домены и мотивы в белках определяли с помощью SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>), NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), а также литературных данных. Влияние замещений аминокислот на структуру белка предсказывали, используя PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php; default threshold = -2.5>).

Суммарное количество каротиноидов (мкг/г сырого веса) определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, полученных из ~0.5 г предварительно измельченной в жидком азоте ткани эндосперма зерна белозерного и желтозерного образцов, согласно [14]. Спектры поглощения регистрировали с помощью Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

Часть оборудования для данного исследования была обеспечена Программой развития МГУ им. М. В. Ломоносова (ПРМ-10) (комплект оборудования для геномных исследований).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления возможных SNP в последовательности гена *ZmPSY1*, связанных с биосинтезом каротиноидов в эндосперме зерна, в работе были использованы инбредные линии кукурузы с белой и желтой/оранжевой окрасками зерна (табл. 1).

Поскольку желтый и оранжевый эндосперм накапливает в 5–100 раз больше каротиноидов, чем белый [8, 9], мы предварительно сравнили содержание каротиноидов в эндосперме желтого (образец 2452-2) и белого (6097-1) зерна. В результате было подтверждено почти полное отсутствие каротиноидов у белозерного образца и в то же время их присутствие в количестве 34.6 ± 2.4 мкг/г сырого веса у желтозерного образца.

Идентификация и структурный анализ кодирующей последовательности гена ZmPSY1 у белозерных и желтозерных инбредных линий кукурузы

С использованием доступных геномных данных кукурузы *Z. mays* ssp. *mays* var. B73 была извлечена последовательность гена фитоинсинтазы *ZmPSY1* (другие названия *y1*, *pb1*; идентификаторы – LOC100136882, GRMZM2G300348, Zm00001eb271860). Ген локализован на хромосоме 6 в позиции 91643180..91646525 (по текущей версии сборки генома Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0; NCBI) или 82179486..82185345/85060410..85065755 (предыдущие версии сборки; MaizeGDB). На основе последовательности мРНК гена были подобраны праймеры для амплификации и секвенирования полной кДНК.

Кодирующая последовательность *ZmPSY1* была определена у двух желтозерных (2452-2, 5580-1) и двух белозерных (5254-3, 6097-1) инбредных линий кукурузы. Было показано, что кДНК гена у всех четырех образцов одинакова по длине (1233 пн). Последовательности кодируемых белков-гомологов (410 ао) содержат N-концевой транзитный пептид (в положении 1–62 ао, с сайтом отщепления V61/Y62, согласно UniProt), ответственный за пластидную локализацию фитоинсинтазы, а также консервативный домен head-to-head (HH)-IPPS (в положении 69–402 или 63–410 ао, согласно NCBI-CDD или UniProt). Присутствие сигнального пептида, определяющего транслокацию белка в пластиды и отщепляемого после прохождения мембраны оргanelл, было маловероятно (согласно SignalPeptide). Однако по версии [15] сигнальный пептид соответствует участку 1–19 ао на N-конце фермента и инвариантен между образцами (рис. 1).

В последовательности гомологов *ZmPSY1* были также идентифицированы два высоко консервативных консенсуса – скваленсинтазный (SQS) и фитоинсинтазный (PSY) (по [15]), подтверждающих функциональную принадлежность анализируемых белков. У четырех тестируемых образцов кукурузы консенсус SQS (CYVAGTVGLMSVPVM, положение 238–253 ао) содержал одно замещение ао – G243A (у желтозерного образца 2452-2), а PSY (GIANQLTNILRDVGEDARRGRIYLPQ, положение 274–299 ао) имел один полиморфизм – G274R (у белозерного образца 6097-1). Участки YAKTF

Таблица 1. Инбредные линии кукурузы, использованные в работе

№	Линия	Окраска эндосперма зерна	Аллель <i>ZmPSY1</i> дикого типа	Аллель <i>ZmPSY1</i> мутантного типа
1	МБК*	Белая		+
2	КБЗ*	Белая		+
3	5740*	Белая с красными полосками	+	
4	5254-1***	Белая		+
5	6614-1***	Белая	+	
6	6063-1***	Белая		+
7	6758-1***	Белая	+	
8	6349-1***	Белая	+	
9	5320-3***	Белая		+
10	6038-1***	Белая	+	
11	5138-1***	Белая	+	
12	5254-3***	Белая		+
13	5320-2***	Белая		+
14	6097-1***	Белая		+
15	5320-4***	Белая		+
16	К-5933**	Белая	+	
17	К-6734**	Белая	+	
18	К-6705**	Белая	+	
19	К-6696**	Белая	+	
20	К-6709**	Белая	+	
21	К-5935**	Белая	+	
22	К-5914**	Белая	+	
23	5676*	Светло-желтая	+	
24	1616*	Светло-желтая	+	
25	5675*	Светло-желтая	+	
26	5666*	Матовая светло-желтая	+	
27	5739*	Матово-желтая	+	
28	5692*	Матово-желтая	+	
29	5696*	Желтая	+	

Таблица 1. Окончание.

№	Линия	Окраска эндосперма зерна	Аллель <i>ZmPSY1</i> дикого типа	Аллель <i>ZmPSY1</i> мутантного типа
30	5683*	Желтая	+	
31	5684*	Желтая	+	
32	5694*	Желтая	+	
33	5674*	Желтая	+	
34	5580-1***	Желтая	+	
35	2452-2***	Желтая с красным кончиком	+	
36	1543*	Насыщенно-желтая	+	
37	5690*	Насыщенно-желтая	+	
38	6339-1***	Ярко-желтая	+	
39	5671*	Темно-желтая	+	
40	5677*	Оранжевая	+	
41	5681*	Оранжевая	+	
42	5272-6***	Оранжевая	+	
43	2138***	Оранжевая	+	
44	5687*	Оранжевая	+	

Примечание. Окраска зерна определялась оригинаторами инбредных линий: *ООО ИПА «Отбор»; **ВИР им. Н.И. Вавилова; ***ИСХ КБНЦ РАН.

(129–133 ао) и RAYV (379–382 ао), ограничивающие каталитически активный сайт, у гомологов были идентичны (рис. 1, б).

Выравнивание идентифицированных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в сравнении с кДНК *ZmPSY1* и соответствующим белком *Z. mays* var. В73 выявило высокий уровень консерватизма. Всего было обнаружено 19 SNPs, восемь из которых были специфичны для обоих белозерных образцов (g114→а, с139→а, g155→с, с161→т, t162→с, t168→с, с183→а, а798→g) (рис. 1, а). Оставшиеся SNPs были характерны для индивидуальных образцов: 6097-1 (с529→а, t753→а, а769→т, g819→а, g852→т), 2452-2 (g728→с), 5254-3 (а769→с, t811→с, g820→а, g852→с) и 2452-2/5580-1 (с1031→а).

В результате несинонимичных SNPs в последовательности кодируемых гомологов *ZmPSY1* произошло замещение остатков восьми аминокислот (рис. 1, б). Четыре нейтральных (согласно PROVEAN) замещения L47I, W52S, E53D и A54V присутствовали только у анализируемых белозерных образцов кукурузы. Другие замещения были специфичны для одной желтозерной линии 2452-2

(G243A; радикальное), белозерного образца 5254-3 (нейтральное T257P и радикальное G274R) и двух желтозерных линий 2452-2 и 5580-1 (T344N; нейтральное). Радикальное замещение G243A в середине консенсуса SQS (рис. 1, б), судя по сохранению желтой окраски зерна, не повлияло на синтез каротиноидов.

Несмотря на нейтральный статус замещения треонина на пролин T257P у белозерного образца 5254-3 (рис. 1, б), данный полиморфизм (или его вариант T257S) ранее охарактеризован как сцепленный с внутриклеточной локализацией *ZmPSY1* у 70% тестируемых белозерных линий [16]. Присутствие Pro-257 в сочетании с Asn-168 меняет не только локализацию *ZmPSY1*, но и морфологию 30% пластид [16]. Аллель Y1, который связывают с желтой окраской эндосперма, в 99% кодирует белок с Thr-257 в сочетании с Asn-168 [7, 15]. Можно предположить, что присутствие Pro-257/Asn-168 в последовательности *ZmPSY1* в нашем исследовании может быть связано с белой окраской эндосперма у образца 5254-3. Интересно, что данный образец содержал и специфичное ему радикальное

замещение G274R, которое соответствовало первому остатку консенсуса PSY (рис. 1, б). Ранее данный полиморфизм описан не был, но также может быть связан с белой окраской зерна у линии 5254-3.

Заметим, что в работе [16] авторами также обнаружены различия в последовательности транзитного пептида в положениях с 52 по 55. Однако данные в статье не приведены, поскольку транзитный пептид процессируется после импорта в хлоропласты и не должен влиять на активность фермента [16]. По всей вероятности, речь шла о замещениях

W52S, E53D и A54V, которые были обнаружены нами в гомологах ZmPSY1 обоих анализируемых белозерных образцов (рис. 1, б).

Мы предположили, что замещения L47I, W52S, E53D и A54V могут быть сцеплены с белой окраской эндосперма зерна, хотя их нейтральный статус не предполагает каких-либо существенных нарушений фолдинга белка. Однако локализация замещений в С-концевой части транзитного пептида могла повлиять на корректность пластидной локализации фермента, а именно на его связывание с

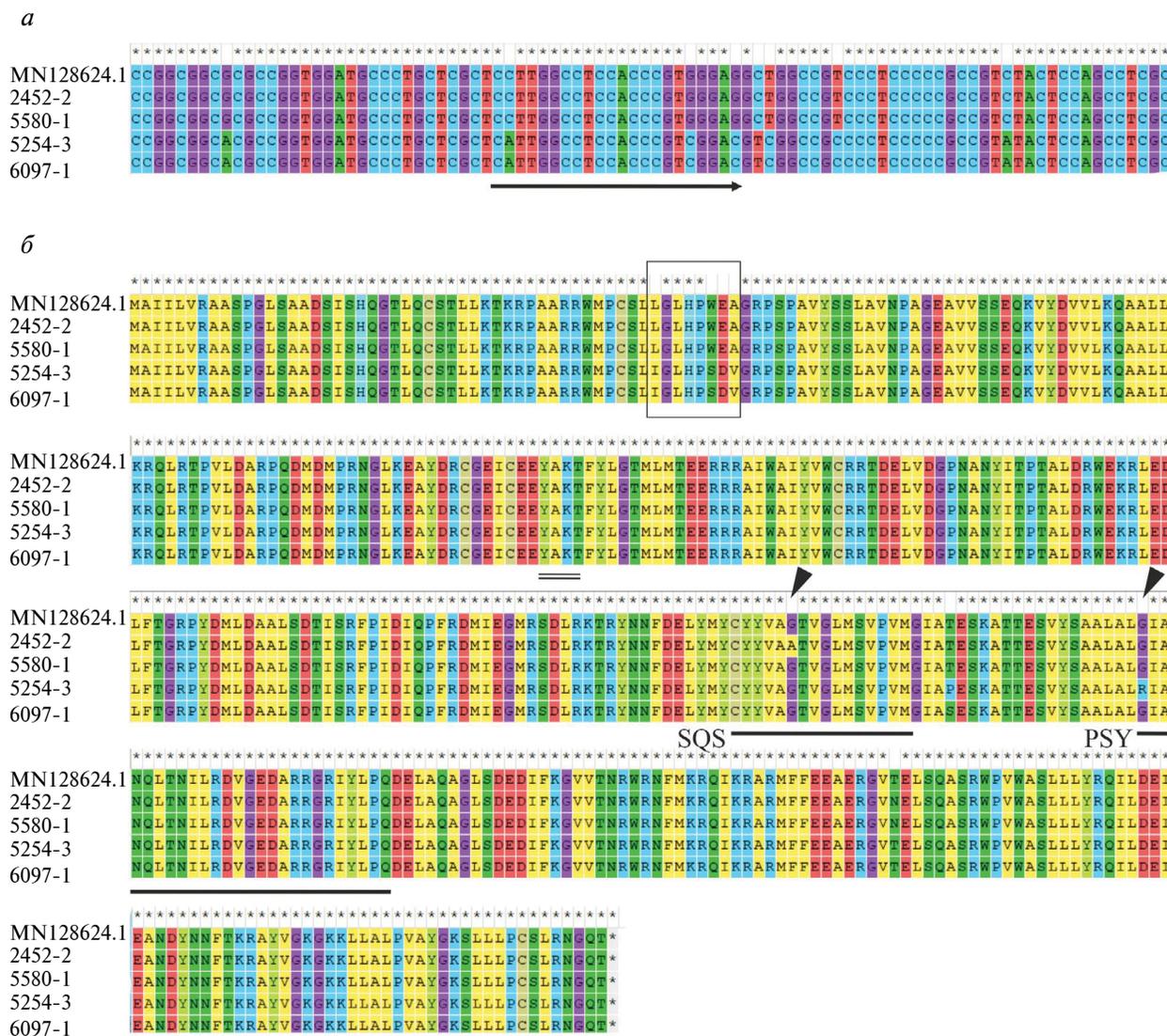


Рис. 1. Выравнивание участка кДНК *ZmPSY1* (а) и аминокислотной последовательности гомологов *ZmPSY1* (б) у двух желтозерных (2452-2, 5580-1) и двух белозерных (5254-3, 6097-1) инбредных линий кукурузы в сравнении с референтом *Z. mays* var. B73 (LOC100136882; MN128624.1). Стрелкой указан участок нуклеотидной последовательности, выбранный для прямого праймера (на анализ аллельного варианта гена *ZmPSY1*). В аминокислотной последовательности выделен рамкой полиморфный участок транзитного пептида, содержащий замещения ао L47I, W52S, E53D и A54V, подчеркнуты консенсусы SQS и PSY (сплошными линиями) и участки YAKTF и RAYV, ограничивающие каталитически активный сайт (двойными линиями), а также указаны радикальные замещения ао (стрелками).

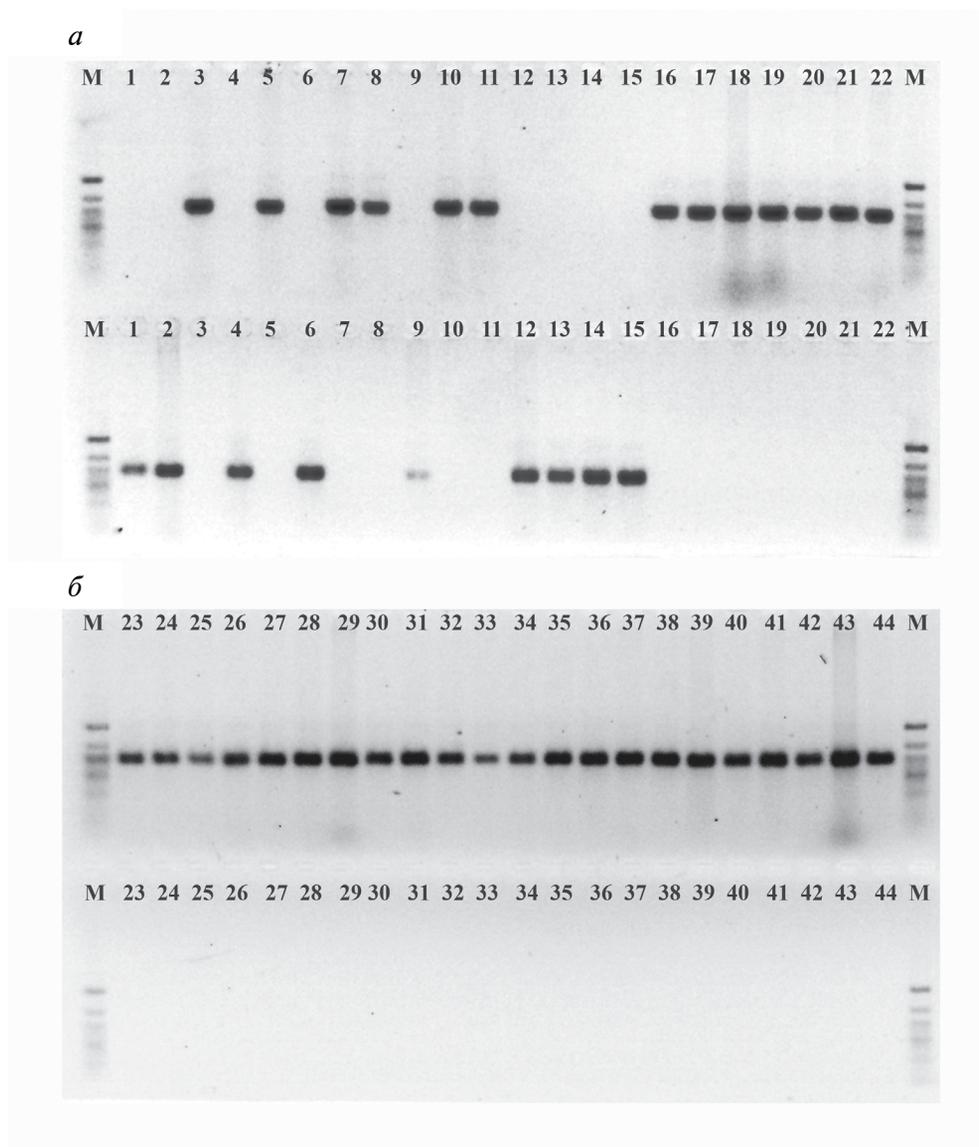


Рис. 2. Электрофорез в 2.5%-ном агарозном геле продуктов (394 пн) ПЦР-амплификации на геномной ДНК 44 инбредных линий кукурузы с праймерами, разработанными для аллелей дикого (PSY155R/PSY155FG; верх каждого геля) и мутантного (PSY155R/PSY155FC; низ каждого геля) типа. а – белозерные линии (1–22). У девяти образцов обнаружен аллель *ZmPSY1* дикого типа, и 13 образцов содержали мутантный аллель; б – желтозерные линии (23–44). У всех 22 образцов показано присутствие аллельного варианта *ZmPSY1* дикого типа. Нанесение образцов соответствует порядковым номерам линий в таб. 1; М – маркер длин ДНК GeneRuler Low Range (первые четыре полосы сверху вниз: 700, 500, 400, 300 пн).

белками, узнающими транзитный пептид и участвующими в переносе фитоинсинтазы в пластиды.

При каротиногенезе происходит транслокация фитоинсинтазы в пластоглобулы пластид с помощью транзитного пептида, что показано на примере анализа работы транзитного пептида изофермента PSY2 в хлоропластах риса (*Oryza sativa* L.) [17]. В запасующих органах происходит преобразование хлоропластов в хромопласты и значительное увеличение количества белка PSY1 в пластоглобулах, что показано на примере плодов томата

(*Solanum lycopersicum* L.) [18]. Поэтому отсутствие *ZmPSY1* в пластоглобулах эндосперма зерна из-за замещений ао в транзитном пептиде может привести к отсутствию каротиноидов. При этом в фотосинтезирующей ткани или зародыше зерна данный эффект может нивелироваться активностью хлоропласт-специфичного изофермента *ZmPSY2*, геномный локус которого не содержит известных замещений ао, сцепленных с различиями (белый vs. желтый) в окраске эндосперма [7].

*Разработка и тестирование праймеров
на присутствие аллельных вариантов
ZmPSY1 дикого и мутантного типов*

С учетом замещений ао, специфичных для белозерных образцов кукурузы, была разработана система из трех праймеров. Последовательность обратного праймера (PSY155R: 5'-gccgctcctctgtcatcaac-3', положение 512–531 в последовательности гена) была общей для аллеля дикого типа (желтозерные образцы) и мутантного аллеля (белозерные образцы). Последовательности двух прямых праймеров основывались на полиморфном участке кДНК PSY1 желтозерных (PSY155FG: 5'-ccttgccctccaccctg-3', положение 138–155 в последовательности гена) и белозерных (PSY155FC: 5'-cattggcctccaccctg-3', 138–155) образцов (рис. 1, а). Ожидаемый размер ПЦР-фрагмента – 394 пн. При амплификации с парами праймеров PSY155R/PSY155FG и PSY155R/PSY155FC на геномной ДНК растений кукурузы будет нарабатываться фрагмент, соответствующий аллелю дикого типа или мутантному аллелю ZmPSY1 соответственно.

Анализ аллельных вариантов с использованием разработанных праймеров проводили на образцах 44 линий (22 белозерных и 22 желтозерных) кукурузы (табл. 1). В результате было показано, что фрагмент, соответствующий мутантному аллелю, нарабатывается у девяти образцов из 22 тестируемых белозерных линий; остальные 13 показывают присутствие в геноме аллеля дикого типа (рис. 2, а). У всех тестируемых желтозерных линий амплифицировался фрагмент аллеля дикого типа (рис. 2, б). Секвенирование ампликонов подтвердило, что амплифицируются ожидаемые варианты последовательности ZmPSY1.

Отдельно отметим, что белок ZmPSY1 белозерного образца 5254-3, который содержит выше дискутируемые замещения T257P и G274R (рис. 1, б), ассоциированные согласно [16] с белой окраской эндосперма, одновременно характеризуется мутантным типом аллеля (рис. 2, а). В связи с этим белая окраска зерна линии 5254-3 может быть связана как с тестируемыми нами замещениями ао в транзитном пептиде, так и с замещениями T257P и G274R.

Таким образом, идентифицированный и рассматриваемый в настоящем исследовании ранее не описанный мутантный аллель ZmPSY1 был характерен только для белозерных линий кукурузы, что свидетельствует о его возможной связи с дефицитом каротиноидов в эндосперме зерна. Присутствие аллеля дикого (по целевому участку кДНК/транзитному пептиду) типа у половины тестируемых белозерных линий может объясняться наличием в геномном локусе ZmPSY1 данных образцов

других замещений ао, сцепленных с дефицитом каротиноидов в зерне [7, 16].

Работа выполнена при финансовой поддержке подпрограммы ФНТП «Развитие селекции и семеноводства кукурузы».

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 об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandrasekharan N., Ramanathan N., Pukalenth B. et al. Development of β -carotene, lysine, and tryptophan-rich maize (*Zea mays*) inbreds through marker-assisted gene pyramiding // Sci. Rep. 2022. V. 12(1). 8551. doi: 10.1038/s41598-022-11585-y
2. Singh J., Sharma S., Kaur A. et al. Marker-assisted pyramiding of lycopene- ϵ -cyclase, β -carotene hydroxylase1 and opaque2 genes for development of biofortified maize hybrids // Sci. Rep. 2021. V. 11(1). 12642. doi: 10.1038/s41598-021-92010-8
3. Abdel-Rahman M.M., Bayoumi S.R., Barakat M.N. Identification of molecular markers linked to *Fusarium* ear rot genes in maize plants *Zea mays* L. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2016. V. 30(4). P. 692–699. doi: 10.1080/13102818.2016.1181987
4. Yang D.E., Zhang C.L., Zhang D.S. et al. Genetic analysis and molecular mapping of maize (*Zea mays* L.) stalk rot resistant gene Rfg1 // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108(4). P. 706–711. doi: 10.1007/s00122-003-1466-y
5. Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Zm-DREB2.9 gene in maize (*Zea mays* L.): genome-wide identification, characterization, expression, and stress response // Plants (Basel). 2022. V. 11(22). doi: 10.3390/plants11223060
6. Yu J.K., Moon Y.S. Corn starch: quality and quantity improvement for industrial uses // Plants (Basel). 2021. V. 11(1). doi: 10.3390/plants11010092
7. Palaisa K.A., Morgante M., Williams M. et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci // Plant Cell. 2003. V. 15(8). P. 1795–1806. doi: 10.1105/tpc.012526
8. Ranilla L.G., Zolla G., Afaray-Carazas A. et al. Integrated metabolite analysis and health-relevant in vitro functionality of white, red, and orange maize (*Zea mays* L.) from the Peruvian Andean race Cabanita at

- different maturity stages // *Front. Nutr.* 2023. V. 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1132228
9. Burt A.J., Grainger C.M., Smid M.P. et al. Allele mining of exotic maize germplasm to enhance macular carotenoids // *Crop Science*. 2011. V. 51(3). P. 991–1004. doi: 10.2135/cropsci2010.06.0335
 10. Sierra J., McQuinn R.P., Leon P. The role of carotenoids as a source of retrograde signals: Impact on plant development and stress responses // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73(21). P. 7139–7154. doi: 10.1093/jxb/erac292
 11. Buckner B., Kelson T.L., Robertson D.S. Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids // *Plant Cell*. 1990. V. 2(9). P. 867–876. doi: 10.1105/tpc.2.9.867
 12. Buckner B., Miguel P.S., Janick-Buckner D. et al. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase // *Genetics*. 1996. V. 143(1). P. 479–488. doi: 10.1093/genetics/143.1.479
 13. Egesel C.E.M., Wong J.C., Lambert R.J. et al. Gene dosage effects on carotenoid concentration in maize grain // *Maydica*. 2003. V. 48(3). P. 183–190.
 14. Филюшин М.А., Джос Е.А., Шенникова А.В. и др. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов // *Физиология растений*. 2020. Т. 67. С. 644–653. doi: 10.31857/S0015330320050048
 15. Fu Z., Yan J., Zheng Y. et al. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSY1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120(4). P. 709–720. doi: 10.1007/s00122-009-1188-x
 16. Shumskaya M., Bradbury L.M., Monaco R.R. et al. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 3725–3741. doi: 10.1105/tpc.112.10417
 17. You M.K., Kim J.H., Lee Y.J. et al. Plastoglobule-targeting competence of a putative transit peptide sequence from rice phytoene synthase 2 in plastids // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 18(1). doi: 10.3390/ijms18010018
 18. Zita W., Bressoud S., Glauser G. et al. Chromoplast plastoglobules recruit the carotenoid biosynthetic pathway and contribute to carotenoid accumulation during tomato fruit maturation // *PLoS One*. 2022. V. 17(12). doi: 10.1371/journal.pone.0277774

Polymorphisms in the Transit Peptide of Phytoene Synthase *ZmPSY1* Link to the White Color of Grain Endosperm in Maize Inbred Lines

D. Kh. Arkhestova^{1,2}, A. D. Khaudov², A. V. Shchennikova^{1,*}, E. Z. Kochieva^{1,3}

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow 119071

²Institute of Agriculture - branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Nalchik 360004

³Lomonosov, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: shchennikova@yandex.ru

The yellow and orange color of *Zea mays* L. grain is determined by the presence of carotenoids, the first enzyme of the biosynthesis pathway of which is phytoene synthase PSY. In this study, we analyzed allelic variants of the *ZmPSY1* gene in accessions of yellow-grain and white-grain maize inbred lines of domestic selection. In four lines with different grain colors, full-length *ZmPSY1* cDNAs were amplified and sequenced, and their variability was characterized. In the cDNA sequence of *ZmPSY1* from white-grain lines, nonsynonymous SNPs were found that lead to substitutions of four amino acid residues (L47I, W52S, E53D and A54V) in the N-terminal transit peptide responsible for the plastid localization of the enzyme. A primer system has been developed for PCR identification of the *ZmPSY1* allele type in maize accessions. Testing of primers on 44 maize lines showed the presence of the wild-type *ZmPSY1* allele and the absence of the mutant allele in the genome of all 22 yellow-grain lines analyzed. The mutant *ZmPSY1* allele was detected in the genome of 41% of the 22 tested white-grain lines. The use of the developed primer system may be promising in the selection of corn with altered carotenoid content in the grain endosperm.

Keywords: *Zea mays* L., maize inbred lines, biosynthesis of carotenoids, phytoene synthase PSY1, polymorphism, endosperm color.