

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.) ПО СОДЕРЖАНИЮ КАРОТИНОИДОВ И ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ КАРОТИНОГЕНЕЗА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДОВ КОРМОВОГО НАПРАВЛЕНИЯ*

А.Х. ГЯУРГИЕВ, Д.Х. АРХЕСТОВА[✉], Р.А. ГАЖЕВА, А.И. САРБАШЕВА, А.Д. ХАУДОВ

Кукуруза (*Zea mays* L.) широко используется в кормопроизводстве. Один из важнейших вторичных метаболитов, определяющих питательную ценность кормов и физиологическое состояние растений, — каротиноиды, которые тесно связаны с хлорофиллом и участвуют во многих клеточных процессах растений. Каротиноиды способны поглощать свет в тех областях видимого спектра, где хлорофилл не очень эффективен. Они передают часть световой энергии хлорофиллам и защищают растения от необратимой фотодеструкции. Каротиноиды также служат липофильными антиоксидантами, которые защищают клеточные мембраны от окислительного стресса посредством поглощения синглетного кислорода. Растения с повышенным содержанием каротиноидов более стрессоустойчивы и характеризуются увеличением вегетативной массы. Корма, богатые каротиноидами, способствуют улучшению состояния иммунной системы крупного рогатого скота, снижают заболеваемость и положительно влияют на продуктивность. В представленном исследовании в коллекции Института сельского хозяйства — филиала ФГБНУ ФНИЦ Кабардино-Балкарский научный центр РАН (ИСХ КБНЦ РАН) были впервые выявлены селекционные линии кукурузы с высоким содержанием в листьях каротиноидов, а также показана взаимосвязь между их накоплением и экспрессией ключевых генов каротиногенеза. Целью работы стало определение содержания каротиноидов и экспрессии ключевых генов каротиногенеза в селекционных линиях кукурузы ИСХ КБНЦ РАН для выделения образцов, которые будут использоваться в селекционной работе для получения новых сортов и гибридов кормовой направленности. Для анализа были отобраны 150 селекционных линий кукурузы из коллекции ИСХ КБНЦ РАН. Растения были выращены на опытных участках ИСХ КБНЦ РАН (с. Опытное, Терский р-н, Кабардино-Балкарская Республика) в 2023 году. Площадь участка — 2,0 га, предшественник — соя. Почва опытного участка — чернозем обыкновенный. Содержание каротиноидов в листовой ткани определяли с использованием реактива Фолча на спектрофотометре УФ-1100 («Эковью», Россия). Экспрессию генов определяли в тех же тканях, гомогенизированных в жидком азоте, которые использовали для измерения содержания каротиноидов. Суммарную РНК выделяли из 50 мг листовой ткани (RNeasy Plant Mini Kit, «QIAGEN GmbH», Германия) и очищали от ДНК-контаминации (RNase-free DNase set, «QIAGEN GmbH», Германия). Полученную мРНК использовали для синтеза кДНК с праймером oligo-dT (GoScript Reverse Transcription System, «Promega Corporation», США). Экспрессию генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad Laboratories», США). Результаты биохимического анализа листьев анализируемых образцов показали значительную вариабельность в содержании каротиноидов, что позволило разделить линии на группы с высоким, средним и низким содержанием пигментов. Для экспрессионного анализа ключевых генов каротиногенеза (фитоинсинтаз *PSY* и ликопин-циклаз *Lcy*) были отобраны четыре линии с контрастным содержанием каротиноидов в листьях. Транскрипционный анализ показал, что линии 944 и 726 с высоким содержанием каротиноидов характеризовались повышенной экспрессией генов биосинтеза каротиноидов *PSY1*, *PSY2*, *LcyB* и *LcyE* по сравнению с низкокаротиноидными линиями 804 и 849. Это может свидетельствовать о том, что повышение экспрессии генов биосинтеза каротиноидов способствует увеличенному накоплению этих пигментов в листьях кукурузы. Различия в содержании каротиноидов и экспрессии соответствующих генов у исследованных линий кукурузы, вероятно, были обусловлены генетически. Такая генетическая вариабельность служит важным фактором для селекционных программ, направленных на повышение питательной ценности кукурузы. Выделенные линии с повышенным содержанием каротиноидов (линии 8007, 931, 944, 726, 760, 847, 728) имеют большой потенциал для использования в селекционных программах по созданию гибридов кукурузы с улучшенным содержанием каротиноидов, особенно в рамках биофортификации, направленной на повышение питательной и диетической ценности кукурузы.

Ключевые слова: *Zea mays* L., кукуруза, каротиноиды, экспрессия генов, *PSY1*, *PSY2*, *LcyB*, *LcyE*.

* Работа выполнена в рамках Федерального проекта «Аграрная наука — шаг в будущее развитие агропромышленного комплекса», направление 4.1.1.

Кукуруза (*Zea mays* L.) — одна из основных зерновых культур и важнейшая кормовая культура. Повышение ее питательной ценности способствует стабилизации кормопроизводства и продуктивности животноводства (1). Однако большинство сортов и линий кукурузы характеризуются невысоким содержанием каротиноидов как в эндосперме зерна, так и в вегетативной массе, что ограничивает ее ценность, в том числе как кормовой культуры (2). В связи с этим селекция кукурузы с повышенным содержанием каротиноидов, особенно провитаминовых форм, представляет собой актуальное направление исследований (3).

В настоящее время для эффективного увеличения питательной ценности кормовой кукурузы в дополнение к традиционной селекции используется биофортификация — процесс повышения содержания микронутриентов в растениях посредством биохимических и молекулярных методов (4).

У растений каротиноиды задействованы во многих клеточных процессах. Одна из основных функций каротиноидов — участие в фотосинтезе. Они служат вспомогательными светособирающими пигментами, которые посредством передачи энергии в синглетном состоянии эффективно расширяют диапазон света, поглощаемого фотосинтетическим аппаратом (5). Другие функции — гашение и поглощение образующихся в хлоропластах триплетного хлорофилла и других токсичных форм кислорода, которые могут вызывать окислительное повреждение белков, липидов и пигментов фотосинтетического аппарата, а также участие в рассеивании избыточной энергии (5-7). Кроме того, каротиноиды играют важную роль в формировании и стабилизации клеточных структур (8). Будучи основой для синтеза одного из наиболее важных фитогормонов — абсцизовой кислоты, они опосредованно обеспечивают антистрессовую защиту растений (5).

Фитоинсинтаза, кодируемая генами *PSY1* и *PSY2*, считается одним из ключевых ферментов каротиногенеза и катализирует реакцию конденсации двух молекул геранилгеранилдифосфата с образованием фитоина, который служит субстратом для синтеза всех остальных каротиноидов (9). Анализ генома многих растений показал присутствие трех гомологичных генов *PSY*.

В процессе эволюции различные паралоги *PSY* приобрели тканеспецифические модели экспрессии и подверглись субфункционализации для тонкой регуляции биосинтеза каротиноидов в онтогенезе и в ответ на факторы окружающей среды (10). *PSY2* служит основным геном, экспрессирующимся в фотосинтетических тканях; *PSY1* отвечает преимущественно за синтез и накопление каротиноидов в запасующих органах; *PSY3*, как было показано для кукурузы, регулирует биосинтез абсцизовой кислоты в корнях в условиях абиотического стресса или микоризного симбиоза (11-14). При этом у большинства растений, в том числе кукурузы, синтез каротиноидов в вегетативной ткани контролируется как геном *PSY2*, так и геном *PSY1*, в отличие, например, от томатов, у которых в листовой ткани экспрессируется только ген *PSY2* (15). Таким образом, гены *PSY* считаются одними из главных регуляторов скорости биосинтеза каротиноидов, и их экспрессия напрямую влияет на общее накопление этих пигментов в клетках (16, 17).

После образования фитоина происходит серия реакций десатурации, ведущих к формированию ликопина — центрального соединения каротиноидного пути и предшественника различных каротиноидов; его дальнейшая трансформация определяет разнообразие синтезируемых пигментов (18, 19). Циклизация ликопина осуществляется двумя ферментами: ликопин β-циклазой (*LcyB*) и ликопин ε-циклазой (*LcyE*), кодируемыми соответственно генами *LcyB* и *LcyE*, (20). *LcyE* участвует в синтезе α-каротина посредством

формирования ϵ - и β -колец, тогда как LcyB катализирует образование β -каротина через добавление β -колец с обеих сторон ликопина с дальнейшим образованием ксантофиллов (18, 20). Соотношение активности этих ферментов влияет на качественный и количественный состав накапливаемых каротиноидов и их провитаминовую активность (21).

Каротиноиды — важные микронутриенты в рационе человека и животных, поскольку они не только служат сильными антиоксидантами, но и превращаются в организме в витамин А (ретинол) посредством окислительного расщепления (22). Потребность животных и человека в витамине А может быть удовлетворена за счет либо готового витамина А, либо каротиноидов с активностью провитамина А (β -каротина).

Каротиноиды, в том числе провитамины А, необходимы для нормального развития и функционирования зрительной, иммунной и репродуктивной систем, а также для поддержания целостности эпителиальной ткани млекопитающих (23). Так, у крупного рогатого скота β -каротин поддерживает репродуктивную функцию на молекулярном уровне, особенно в лютеиновую фазу, защищая ферменты, связанные с выработкой половых стероидных гормонов, за счет своих антиоксидантных свойств (24). Это особенно важно в молочном животноводстве, где высокая продуктивность тесно связана с эффективностью воспроизводства стада.

Использование силосной кукурузы с повышенным содержанием каротиноидов представляет особый интерес для животноводства (25). Такой корм не только обеспечивает животных необходимой энергией и питательными веществами, но и обогащает рацион полезными микронутриентами/антиоксидантами, что положительно сказывается на их здоровье и продуктивности (26). Кормление крупного рогатого скота силосом, богатым каротиноидами, способствует улучшению функций иммунной системы, снижает заболеваемость и улучшает общее состояние организма (27). Включение в рацион силоса с высоким содержанием каротиноидов отражается также на качестве продукции животноводства. Мясо и молоко животных, получавших такой корм, характеризуются повышенной питательной ценностью и улучшенными органолептическими свойствами. Например, в молоке увеличивается содержание β -каротина, за счет чего улучшаются его антиоксидантные свойства, и оно приобретает более насыщенный цвет (28-30).

Применение силоса с повышенным содержанием каротиноидов может привести к снижению необходимости использования синтетических витаминных добавок в рационах. Это способствует уменьшению затрат на кормление и делает продукцию более натуральной, экологически чистой и привлекательной для потребителей (31). Получены данные о том, что каротиноиды могут влиять на устойчивость животных к стрессовым факторам, улучшая адаптивные способности и повышая выживаемость молодняка (32). Это открывает дополнительные перспективы для использования, обогащенного каротиноидами силоса в условиях интенсивного животноводства.

Использование в селекции линий с повышенным содержанием каротиноидов обеспечит создание гибридов кукурузы с высокой питательной ценностью и свойствами, которые будут способствовать улучшению здоровья животных за счет повышения антиоксидантного статуса их организма и укрепления иммунной системы (4, 33). Поэтому селекция кукурузы с высоким содержанием каротиноидов как в зерне, так и вегетативной массе имеет потенциал для повышения эффективности животноводства и улучшения качества продукции, что делает исследования в этой области актуальными и востребованными (27).

Использование биохимических и молекулярных методов исследования вариабельности содержания каротиноидов в различных селекционных линиях кукурузы позволяет выявить генотипы с повышенной способностью к синтезу и накоплению этих соединений (33). Определение содержания каротиноидов и экспрессии ключевых генов их биосинтеза, таких как *PSY1*, *PSY2*, *LcyB* и *LcyE*, помогает понять механизмы регуляции этого процесса и разработать стратегии для повышения содержания каротиноидов в зерне и в вегетативной массе (34).

В представленном исследовании в коллекции Института сельского хозяйства — филиала ФГБНУ ФНЦ Кабардино-Балкарский научный центр РАН (ИСХ КБНЦ РАН) были впервые выявлены селекционные линии кукурузы с высоким содержанием каротиноидов в листьях, а также показана взаимосвязь между их накоплением и экспрессией ключевых генов каротиногенеза.

Целью работы стало определение содержания каротиноидов и экспрессии ключевых генов каротиногенеза в селекционных линиях кукурузы ИСХ КБНЦ РАН для выделения образцов, которые будут использоваться в селекционной работе для получения новых сортов и гибридов кормовой направленности.

Методика. Для анализа были отобраны 150 селекционных линий кукурузы (*Zea mays* L.) из коллекции ИСХ КБНЦ РАН, которые используются для получения сортов и гибридов зернового и универсального назначения. Растения выращивали на опытных участках ИСХ КБНЦ РАН (43,628604° N, 44,135084° W; с. Опытное, Терский р-н, Кабардино-Балкарская Республика) в 2023 году. Площадь участка — 2,0 га, предшественник — соя, площадь одной делянки — 3,9 м².

Почва опытного участка — чернозем обыкновенный, род почвы — карбонатный. Агрохимическая характеристика почвы опытного участка (по Чирикову): Р₂О₅ подвижн. — 9,8 мг/100 г почвы, К₂О обмен. — 7,2 мг/100 г почвы, гумус (по Тюрину) — 4,4 %; рН 7,2. В пахотном горизонте содержалось 3,9-4,2 % гумуса, 18-27 мг азота, 27-34 мг подвижного фосфора и 230-250 мг обменного калия.

Содержание каротиноидов в листовой ткани определяли с использованием реактива Фолча (35) на спектрофотометре УФ-1100 («Эковью», Россия). Листья пятого яруса второго растения в ряду собирали на стадии 5-6 сут после опыления около полудня, чтобы минимизировать возможное влияние интенсивности света. Отбирали три растения из трех рядов делянки одной линии (три биологических повторности). Листовые диски вырезали из средней части листа, избегая центральных жилок, гомогенизировали в жидком азоте и замораживали при -80 °С для последующего анализа методом Фолча (35). Все измерения проводили в трех аналитических повторностях.

Содержание каротиноидов рассчитывали по формулам:

$$\text{Chlorophyll } a \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 11.47(A_{666} - A_{750}) - 2(A_{648} - A_{750}),$$

$$\text{Chlorophyll } b \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 21.85(A_{648} - A_{750}) - 4.53(A_{666} - A_{750}),$$

$$\text{Total carotenoids} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = [1000(A_{480} - A_{750}) - 1.33\text{Chl } a - 23.93\text{Chl } b]/202.$$

Экспрессию генов определяли в тех же тканях, гомогенизированных в жидком азоте, которые использовали для измерения содержания каротиноидов. Суммарную РНК выделяли из 50 мг листовой ткани (RNeasy Plant Mini Kit, «QIAGEN GmbH», Германия) и очищали от ДНК-контаминации

(RNase-free DNase set, «QIAGEN GmbH», Германия). Качество мРНК проверяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, а количество определяли флуориметрически (Qubit® Fluorometer, «Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Полученную мРНК использовали для синтеза кДНК с праймером oligo-dT (GoScript Reverse Transcription System, «Promega Corporation», США).

Экспрессию генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad Laboratories», США) в двух биологических и трех аналитических повторностях. Реакцию проводили с использованием 3,0 нг кДНК и смеси для ПЦР-РВ с SYBR Green (НПК «Синтол», Россия). Условия реакции были следующими: 5 мин при 95 °С (начальная денатурация); 15 с при 95 °С (денатурация), 40 с при 60 °С (отжиг/синтез цепи) (40 циклов).

Использовали следующие праймеры: PSY1-F (5'-CATCTTCAAA-GGGGTCGTCA-3') и PSY1-R (5'-CAGGATCTGCCTGTACAACA-3'), PSY2-F (5'-TCACCCATCTCGACTCTGCTA-3') и PSY2-R (5'-GATGTGATCTACGGATGGTTCAT-3'), LcyE-F (5'-TTTACGTGCAAATGCAGTCAA-3') и LcyE-R (5'-TGACTCTGAAGCTAGAGAAAG-3') (36). В качестве референсного гена для нормализации данных использовали ZmUbi (NM_001329666.1) с праймерами ZmUBI-rtF (5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3') и ZmUBI-rtR (5'-GCTGCAGAAGAGTTTTGGGTACA-3').

Статистическую обработку результатов биохимических исследований проводили в программной среде Microsoft Excel 2013. Для сравнения средних значений между двумя группами использовали двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Количественное определение общих каротиноидов осуществляли по методу двухфазной экстракции Фолча с последующим расчетом средних значений (M) и стандартных отклонений ($\pm SD$) (35). Статистическую обработку данных по экспрессии генов выполняли в программе Graph Pad Prism v. 9 (<https://www.graphpad.com>, США).

Результаты. Проведенные измерения выявили значительную разницу у линий кукурузы из коллекции ИСХ КБНЦ РАН в содержании общих каротиноидов — от 25,98 до 120,87 мкг/г (рис. 1). Такой же значительный разброс был показан ранее для этих же образцов при определении содержания хлорофиллов а и b (37).

По содержанию каротиноидов анализируемые линии кукурузы можно было разделить на три группы: с высоким (> 90 мкг/г; 17 линий), средним (40-90 мкг/г; 103 линии) и низким (< 40 мкг/г; 30 линий) содержанием каротиноидов. Максимальное содержание каротиноидов мы выявили у линии 8007 (120,87 мкг/г), минимальное — у линии 849 (25,98 мкг/г). Разница между максимальным и минимальным значениями содержания общих каротиноидов в анализируемых линиях кукурузы составляла ~4,7 раза, что согласуется с результатами аналогичных исследований на кукурузе (38). Интересно, что некоторые линии (726, 728, 760, 944, 8007), выделенные ранее как высокохлорофильные (37), также характеризовались высоким содержанием каротиноидов. Это подтверждает показанную ранее положительную корреляцию между содержанием хлорофиллов и каротиноидов (39, 40).

Если рассматривать наиболее представительную группу со средним содержанием каротиноидов (103 линии), то разница между минимальным и максимальным значениями показателя в листьях также была довольно высока (в среднем более чем в 2,1 раза). Однако с практической точки зрения для селекции представляют интерес именно линии с существенно повышенным содержанием каротиноидов (например, 8007, 931, 944, 726).

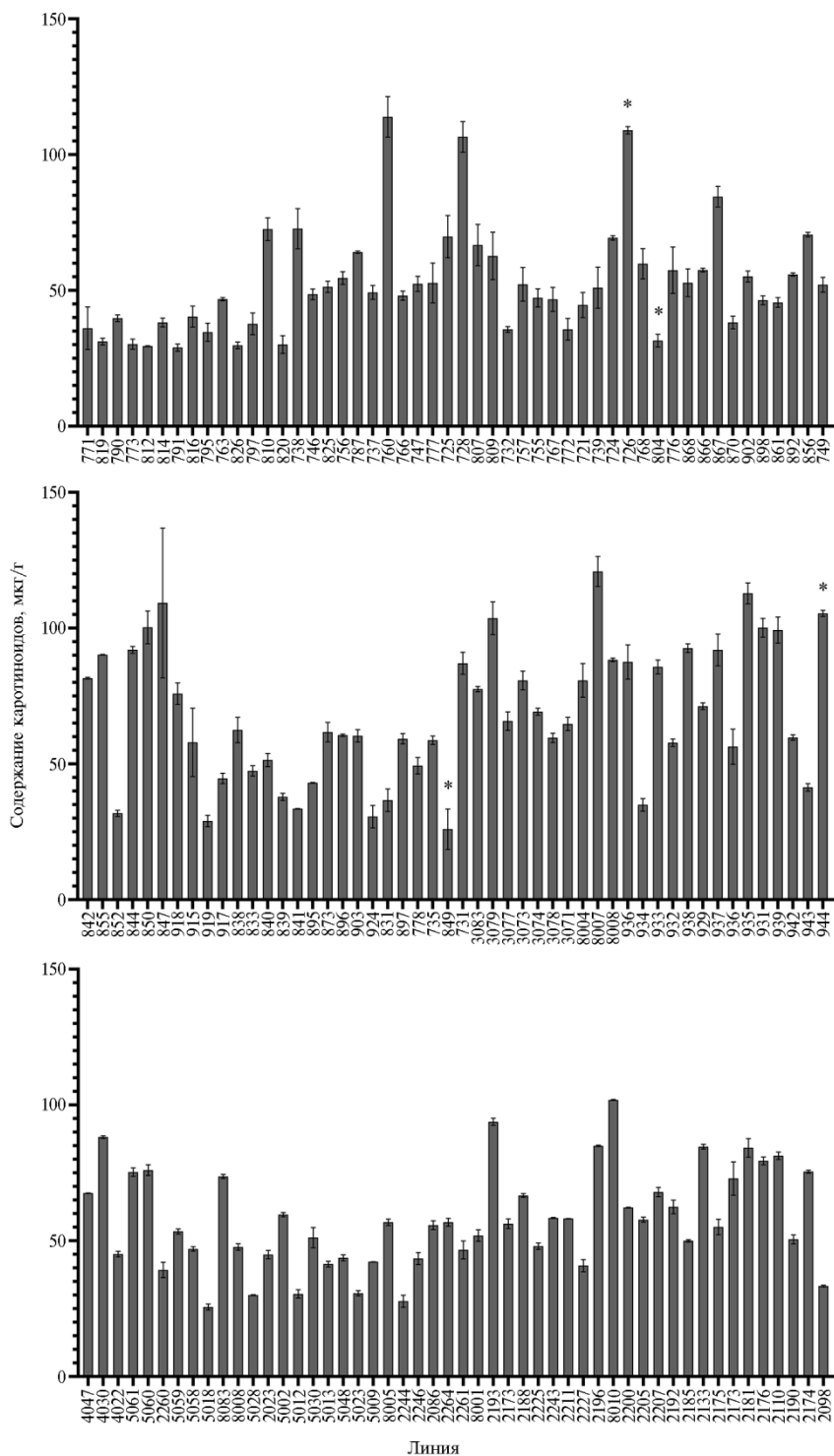


Рис. 1. Содержание общих каротиноидов в листьях у 150 селекционных линий кукурузы (*Zea mays* L.) из коллекции Института сельского хозяйства — филиала ФГБНУ ФНЦ Кабардино-Балкарский научный центр РАН. Звездочкой (*) отмечены линии, отобранные для анализа генной экспрессии ($n = 3$, $N = 3$, $M \pm SD$; опытное поле ИСХ КБНЦ РАН, с. Опытное, Терский р-н, Кабардино-Балкарская Республика, 2023 год).

Для анализа экспрессии ключевых генов каротиногенеза — фитоинсинтаз *PSY1*, *PSY2* и ликопинциклаз *LcyB* и *LcyE* — методом ПЦР в реальном

времени были выбраны линии 944, 726, 804 и 849, контрастные по содержанию каротиноидов в листьях. Линии 944 и 726 были выбраны из-за их высокого содержания общих каротиноидов (соответственно 105,44 и 111,35 мкг/г), тогда как линии 804 и 849 характеризовались низким содержанием каротиноидов (соответственно 31,96 и 25,98 мкг/г).

Экспрессия гена *PSY1* у линий 944 и 726 была примерно в 2 раза выше, чем у линии 849 ($p < 0,01$), и почти в 20 раз выше, чем у линии 804 (рис. 2). У линий 944 и 726 наблюдалась существенно более высокая экспрессия *PSY2*, в то время как у линий 804 и 849 экспрессия этого гена была в 2 раза меньше.

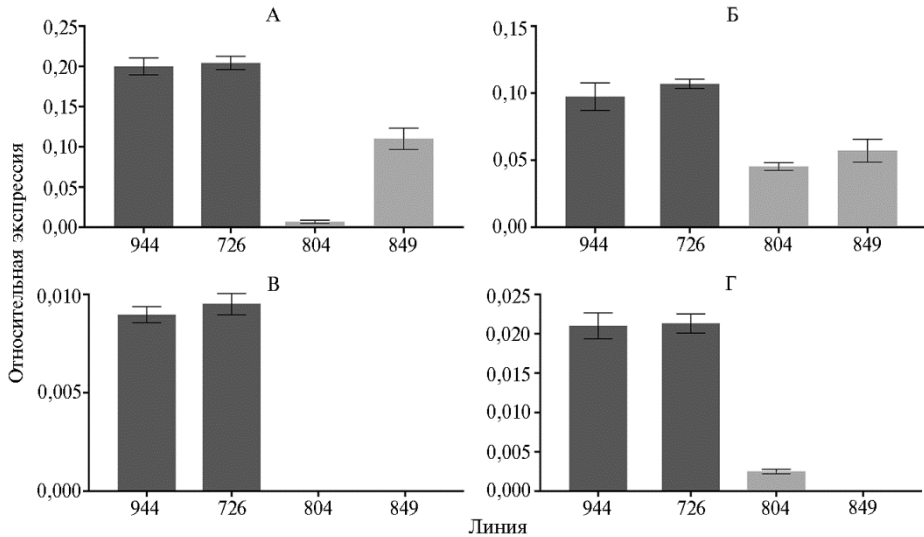


Рис. 2. Результаты ПЦР-РВ анализа экспрессии генов *PSY1* (А), *PSY2* (Б), *LcyB* (В) и *LcyE* (Г) в листьях селекционных линий кукурузы (*Zea mays* L.) из коллекции Института сельского хозяйства — филиала ФГБНУ ФНИЦ Кабардино-Балкарский научный центр РАН, контрастных по содержанию каротиноидов: линии 944, 726 — с высоким содержанием, линии 804, 849 — с низким содержанием. Референсный ген — *ZmUbi* ($n = 2$, $N = 3$, $M \pm SD$; опытное поле ИСХ КБНЦ РАН, с. Опытное, Терский р-н, Кабардино-Балкарская Республика, 2023 год).

Но при этом, если сравнивать количество мРНК генов *PSY1* и *PSY2* у одного образца, то у образцов 944, 726 и 849 экспрессия *PSY1* в 2 раза превышала таковую для *PSY2*. В то же время у образца 804 экспрессия *PSY2* была в 5 раз выше, чем у *PSY1*. Эти данные дополняют ранее полученные результаты по транскрипции генов фитоинсинтаз в проростках, согласно которым у одних линий кукурузы экспрессия гена *PSY1* была выше, чем *PSY2*, а у других линий экспрессии обоих генов оказалась сходной (10, 41).

Синтез каротиноидов в присутствии следовых количеств мРНК *PSY2* у линии 804 мог быть обусловлен функциональной избыточностью *PSY1*, за счет чего *PSY1* компенсировал недостаток активности *PSY2*. Также, согласно предыдущим исследованиям (37), линия 804 характеризовалась низким содержанием хлорофиллов, что потенциально снижало необходимость в высокой экспрессии генов фитоинсинтаз, одна из функций которых заключается в передаче поглощенной энергии хлорофиллу для фотохимических реакций.

Экспрессия гена *LcyB* у высококаротиноидных линий 944 и 726 была соответственно в 8,4 и 8,5 раза выше ($p < 0,001$), чем у линии 804, а в образце 849 экспрессия не детектировалась. Для гена *LcyE* наблюдалась сходная картина: экспрессия у линий 944 и 726 была высокой, тогда как у линий 804 и 849 отсутствовала или была следовой. Более высокая экспрессия

LcyB могла быть связана с различием биологических функций и с потребностью растения в синтезе β-каротина и производных ксантофиллов для оптимизации процессов фотосинтеза и защиты от стрессовых факторов, тогда как *LcyE* кодирует ε-ликопинциклазу, катализирующую образование δ-каротина — первого предшественника в синтезе α-каротина, который менее распространен в листьях и функционально специфичен для эндосперма зерна (18). Исследования, проведенные на проростках, показали, что экспрессия гена *LcyE* превалирует на стадии прорастания (41).

Известно, что на транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов значительное влияние оказывают такие внешние факторы, как освещенность, абиотический и биотический стресс (7, 10, 41), однако все растения в нашем опыте были выращены в одинаковых условиях, поэтому различия в содержании общих каротиноидов, и в экспрессии анализируемых генов, тем более столь значительные, нельзя объяснить внешним воздействием. Исходя из этого, разница в полученных результатах экспрессионного анализа, по всей вероятности, может быть объяснена генетическими особенностями образцов и изменениями либо в промоторной области гена у конкретных линий в сайтах связывания с различными регуляторными факторами транскрипции, либо в самих белках транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию анализируемых генов.

Наши результаты указывают на тесную связь между повышенным содержанием каротиноидов у линий 944 и 726 и повышенной экспрессией ключевых генов их биосинтеза, что согласуется с ранее полученными данными, показывающими, что повышение экспрессии генов каротиноидного биосинтеза приводит к увеличенному накоплению каротиноидов в растительных тканях (21). Например, сверхэкспрессия генов *PSY* в эндосперме кукурузы значительно увеличивает общее содержание каротиноидов (42). Кроме того, дифференциальная экспрессия генов *LcyB* и *LcyE* может влиять на состав каротиноидов, изменяя не только их общее содержание, но и пропорцию/долю отдельных пигментов с провитаминной активностью (43).

Итак, мы установили широкий разброс в содержании общих каротиноидов в листьях у 150 линий кукурузы из коллекции ИСХ КБНЦ РАН — от 25,98 до 120,87 мг/г, что позволило разделить их на три группы и выявить 17 линий с высоким содержанием общих каротиноидов (> 90 мг/г), таких как линии 8007, 944, 726 и 931. Молекулярно-генетический анализ выявил, что повышенное накопление каротиноидов у линий сопряжено с усиленной транскрипцией ключевых генов биосинтетического пути — генов фитоенсинтаз *PSY1* и *PSY2*, а также ликопинциклаз *LcyB* и *LcyE*. Отобранные линии будут введены в селекционный процесс для создания сортов/гибридов кукурузы кормовой направленности с высоким содержанием микронутриентов. Следует отметить, что, помимо улучшения кормовой ценности линий кукурузы с повышенным содержанием каротиноидов, такие растения будут более эффективно наращивать вегетативную массу (из-за прямой связи содержания хлорофиллов и каротиноидов), а также будут более устойчивы к абиотическим стрессам благодаря антиоксидативной функции каротиноидов и их связи с содержанием абсцизовой кислоты.

Институт сельского хозяйства — филиал ФГБНУ ФНЦ
Кабардино-Балкарский научный центр РАН,
360004 Россия, Кабардино-Балкарская Республика, г. Нальчик,
ул. Кирова, 224,
e-mail: agyaurgiyev@inbox.ru, khavpacheva.dzhenet@mail.ru ✉,
gazheva79@mail.ru, sarbashasi59@mail.ru, aliy-beck@yandex.ru

Поступила в редакцию
2 июня 2025 года
Принята к публикации
19 сентября 2025 года

EVALUATION OF PROMISING MAIZE (*Zea mays* L.) LINES FOR CAROTENOID CONTENT AND EXPRESSION OF KEY CAROTENOGENESIS GENES FOR BREEDING FORAGE HYBRIDS

A.Kh. Gyaurgiev, D.Kh. Arkhestova ✉, R.A. Gazheva, A.I. Sarbasheva, A.D. Khaudov

Institute of Agriculture, Federal Kabardino-Balkarian Scientific Center RAS, 224, ul. Kirova, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, 360004 Russia, e-mail agyaurgiyev@inbox.ru, khavpacheva.dzhenet@mail.ru (✉ corresponding author), gazheva79@mail.ru, sarbashasi59@mail.ru, aliy-beck@yandex.ru

ORCID:

Gyaurgiev A.Kh. orcid.org/0000-0001-8619-4130

Sarbasheva A.I. orcid.org/0000-0003-4708-1293

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

Khaudov A.D. orcid.org/0000-0002-5187-3229

Gazheva R.A. orcid.org/0000-0002-6822-687X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Carried out within the framework of the Federal project "Agrarian Science as a Step into the Future Development of the Agro-Industrial Complex", direction 4.1.1.

Final revision received June 02, 2025

doi: 10.15389/agrobiol.2025.6.1142eng

Accepted September 19, 2025

Abstract

Maize (*Zea mays* L.) is widely used in feed production. Carotenoids are among the most important secondary metabolites, determining the nutritional value of feed and the physiological state of plants. They are closely associated with chlorophyll and participate in numerous cellular processes. Carotenoids can absorb light in regions of the visible spectrum where chlorophyll is less efficient. They transfer a portion of the light energy to chlorophylls and protect plants from irreversible photodamage. Carotenoids also serve as lipophilic antioxidants, protecting cell membranes from oxidative stress by quenching singlet oxygen. Plants with elevated carotenoid content exhibit greater stress tolerance and are characterized by increased vegetative biomass. Feeding cattle with carotenoid-rich feed improves the immune system, reduces disease incidence, and positively impacts productivity. This study, for the first time, identified maize breeding lines with high leaf carotenoid content from the collection of the Institute of Agriculture — a branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (IA KBSC RAS), and demonstrated the relationship between carotenoid accumulation and the expression of key carotenogenesis genes. The aim of this work was to determine the carotenoid content and the expression of key carotenogenesis genes in maize breeding lines from the IA KBSC RAS collection to identify samples for use in breeding new varieties and hybrids of forage maize. A set of 150 maize breeding lines from the ISX KBSC RAS collection was analyzed. Plants were grown on the experimental plots of IA KBSC RAS (s. Opytnoe, Tersky District, Kabardino-Balkarian Republic) in 2023. The plot area was 2.0 hectares, with soybean as the preceding crop. The soil of the experimental plot was ordinary chernozem. Carotenoid content in leaf tissue was determined using Folch reagent and a UV-1100 spectrophotometer ("Ecoview", Russia). Gene expression analysis was performed on the same tissues homogenized in liquid nitrogen and used for carotenoid measurement. Total RNA was isolated from 50 mg of leaf tissue (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Germany) and purified from DNA contamination (RNase-free DNase set, QIAGEN GmbH, Germany). The obtained mRNA was used for cDNA synthesis with an oligo-dT primer (GoScript Reverse Transcription System, Promega Corporation, USA). Gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR, a CFX96 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, USA). The results of the biochemical analysis revealed significant variability in carotenoid content among the samples, allowing the lines to be divided into groups with high, medium, and low pigment content. For the expression analysis of key carotenogenesis genes (phytoene synthases *PSY* and lycopene cyclases *Lcy*), four lines with contrasting leaf carotenoid content were selected. The transcript level analysis showed that lines 944 and 726, with high carotenoid content, were characterized by increased expression of the carotenoid biosynthesis genes *PSY1*, *PSY2*, *LcyB*, and *LcyE* compared to the low-carotenoid lines 804 and 849. This suggests that increased expression of carotenoid biosynthesis genes contributes to the enhanced accumulation of these pigments in maize leaves. The differences in carotenoid content and the expression of the corresponding genes among the studied maize lines are likely due to genetic factors. This genetic variability is an important asset for breeding programs aimed at enhancing the nutritional value of maize. The identified lines with high carotenoid content (lines 8007, 931, 944, 726, 760, 847, 728) hold significant potential for use in breeding programs to develop maize hybrids with improved carotenoid content, particularly in biofortification strategies aimed at enhancing the nutritional and dietary value of maize.

Keywords: *Zea mays* L., corn, carotenoids, carotenogenesis, biofortification, gene expression, *PSY1*, *PSY2*, *LcyB*, *LcyE*.

REFERENCES

1. Shiferaw B., Prasanna B.M., Hellin J., Bänziger M. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 2011, 3: 307-327 (doi: 10.1007/s12571-011-0140-5).
2. Song J., Li D., He M., Chen J., Liu C. Comparison of carotenoid composition in immature and mature grains of corn (*Zea mays* L.) varieties. *International Journal of Food Properties*, 2015, 19(2): 351-358 (doi: 10.1080/10942912.2015.1031245).
3. Pixley K., Rojas N.P., Babu R., Mutale R., Surles R., Simpungwe E. Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: *Carotenoids and human health. Nutrition and health*. S. Tanumihardjo (ed.). Humana Press, Totowa, NJ, 2013, 271-292 (doi: 10.1007/978-1-62703-203-2_17).
4. Bouis H.E., Saltzman A. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security*, 2017, 12: 49-58 (doi: 10.1016/j.gfs.2017.01.009).
5. Swapnil P., Meena M., Singh S.K., Dhuldhaj U.P., Harish, Marwal A. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*, 2021, 26(1): 100203 (doi: 10.1016/j.cpb.2021.100203).
6. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 2020, 74(1): 1-16 (doi: 10.1007/s11418-019-01364-x).
7. Quian-Ulloa R, Stange C. Carotenoid biosynthesis and plastid development in plants: the role of light. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1184 (doi: 10.3390/ijms22031184).
8. Gruszecki W.I. Carotenoids in pigments-protein complexes: relation between carotenoid structure and function. In: *Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology*. A. Kaczor, M. Baranska (eds.). John Wiley & Sons, Ltd., 2016, 147-158 (doi: 10.1002/9781118622223.ch9).
9. Zhou X., Rao S., Wrightstone E., Sun T., Lui A.C.W., Welsch R., Li L. Phytoene synthase: the key rate-limiting enzyme of carotenoid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 884720 (doi: 10.3389/fpls.2022.884720).
10. 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).
11. Fraser P.D., Kiano J.W., Truesdale M.R., Schuch W., Bramley P.M. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 687-698 (doi: 10.1023/a:1006256302570).
12. Giorio G., Stigliani A.L., D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) — new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *The FEBS Journal*, 2008, 275(3): 527-535 (doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x).
13. 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 Physiology*, 2008, 146(3): 1333-1345 (doi: 10.1104/pp.107.111120).
14. Stauder R., Welsch R., Camagna M., Kohlen W., Balcke G. U., Tissier A., Walter M.H. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the PHYTOENE SYNTHASE gene family. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 255 (doi: 10.3389/fpls.2018.00255).
15. Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. *Dokladi Rossiyskoy akademii nauk. Nauki o zhizni*, 2023, 508(1): 9-13 (doi: 10.31857/S2686738922600686) (in Russ.).
16. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. Carotenoids and photosynthesis. In: *Carotenoids in nature. Subcellular Biochemistry, vol. 79*. C. Stange (ed.). Springer, Cham, 2016: 111-139 (doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_4).
17. Sineshchekov V.A., Belyaeva O.B. *Biokhimiya*, 2019, 84(5): 648-667 (doi: 10.1134/S032097251905004X) (in Russ.).
18. Bai L., Kim E.H., DellaPenna D., Brutnell T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 2009, 59(4): 588-599 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03899.x).
19. Diretto G., Al-Babili S., Tavazza R., Papacchioli V., Beyer P., Giuliano G. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS ONE*, 2007, 2(4): e350 (doi: 10.1371/journal.pone.0000350).
20. Wang Y.H., Zhang Y.Q., Zhang R.R., Zhuang F.Y., Liu H., Xu Z.S., Xiong A.S. Lycopene ϵ -cyclase mediated transition of α -carotene and β -carotene metabolic flow in carrot fleshy root. *The Plant Journal*, 2023, 115(4): 986-1003 (doi: 10.1111/tpj.16275).
21. Luo Y., Wang C., Wang M., Wang Y., Xu W., Han H., Wang Z., Zhong Y., Huang H., Qu S. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthesis genes in fruit flesh during fruit development in two *Cucurbita maxima* inbred lines. *Horticultural Plant Journal*, 2021, 7(6):

- 529-538 (doi: 10.1016/j.hpj.2020.07.006).
22. Harrison E.H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2012, 1821(1): 70-77 (doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.002).
 23. von Lintig J., Hessel S., Isken A., Kiefer C., Lampert J.M., Voolstra O., Vogt K. Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2005, 1740(2): 122-131 (doi: 10.1016/j.bbadis.2004.11.010).
 24. Mitsuishi H., Yayota M. The efficacy of β -carotene in cow reproduction: a review. *Animals*, 2024, 14(14): 2133 (doi: 10.3390/ani14142133).
 25. Miao Q., Si X., Zhao Q., Zhang H., Qin Y., Tang C., Zhang J. Deposition and enrichment of carotenoids in livestock products: an overview. *Food Chemistry: X*, 2024, 21: 101245, (doi: 10.1016/j.fochx.2024.101245).
 26. Meléndez-Martínez A.J., Mandić A.I., Bantis F., Böhm V., Borge G.I.A., Brnčić M., O'Brien N. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 62(8): 1999-2049 (doi: 10.1080/10408398.2020.1867959).
 27. Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 131(3-4): 418-450 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018).
 28. Pickworth C.L., Loerch S.C., Kopec R.E., Schwartz S.J., Fluharty F.L. Concentration of provitamin A carotenoids in common beef cattle feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(5): 1553-1561 (doi: 10.2527/jas.2011-4217).
 29. Jin Q., Cheng H., Wan F., Bi Y., Liu G.F., Liu X., Zhao H., You W., Liu Y., Tan X.W. Effects of feeding β -carotene on levels of β -carotene and vitamin A in blood and tissues of beef cattle and the effects on beef quality. *Meat Science*, 2015, 110: 293-301 (doi: 10.1016/j.meatsci.2015.07.019).
 30. Laurent C., Caillat H., Girard C.L., Ferlay A., Laverroux S., Jost J., Graulet B. Impacts of production conditions on goat milk vitamin, carotenoid contents and colour indices. *Animal*, 2023, 17(1): 100683 (doi: 10.1016/j.animal.2022.100683).
 31. Johansson B., Persson Waller K., Jensen S.K., Lindqvist H., Nadeau E. Status of vitamins E and A and β -carotene and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic vitamins. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(3): 1682-1692 (doi: 10.3168/jds.2013-7388).
 32. Shastak Y., Pelletier W. A cross-species perspective: β -carotene supplementation effects in poultry, swine, and cattle — a review. *Journal of Applied Animal Research*, 2024, 52(1): 2321957 (doi: 10.1080/09712119.2024.2321957).
 33. Owens B.F., Lipka A.E., Magallanes-Lundback M., Tiede T., Diepenbrock C.H., Kandianis C.B., Kim E., Cepela J., Mateos-Hernandez M., Buell C.R., Buckler E.S., DellaPenna D., Gore M.A., Rocheford T. A foundation for provitamin A biofortification of maize: genome-wide association and genomic prediction models of carotenoid levels. *Genetics*, 2014, 198(4): 1699-1716 (doi: 10.1534/genetics.114.169979).
 34. Yan J., Kandianis C.B., Harjes C.E., Bai L., Kim E.H., Yang X., Skinner D.J., Fu Z., Mitchell S., Li Q., Fernandez M.G., Zaharieva M., Babu R., Fu Y., Palacios N., Li J., Dellapenna D., Brutnell T., Buckler E.S., Warburton M.L., Rocheford T. Rare genetic variation at *Zea mays* crtR1 increases beta-carotene in maize grain. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 322-327 (doi: 10.1038/ng.551).
 35. 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).
 36. Arkhestova D.Kh., Shomakhov B.R., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*, 2023, 27(5): 440-446. (doi: 10.18699/VJGB-23-53) (in Russ.).
 37. Arkhestova D.Kh., Gyaurgiev A.Kh., Gazheva R.A., Khaudov A.D., Sarbasheva A.I. Evaluation of corn (*Zea mays* L.) lines promising for breeding forage hybrids by chlorophyll content and expression of psbA and psbA genes. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2024, 59(5): 973-982 (doi: 10.15389/agrobiology.2024.5.973rus).
 38. Sobirova Z.Sh. *Sovremennaya biologiya i genetika*, 2023, 1(3): 72-77 (in Russ.).
 39. Gebregziabher B.S., Zhang S., Aza M., Qi J., Agyenim-Boateng K.G., Feng Y., Liu Y.-T., Li J., Li B., Sun J.-M. Natural variation and geographical distribution of seed carotenoids and chlorophylls in 1167 Chinese soybean accessions. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(9): 2632-2647 (doi: 10.1016/j.jia.2022.10.011).
 40. Ivanov L.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Yudina P.K. *Fiziologiya rasteniy*, 2013, 60(6): 856 (doi: 10.7868/S0015330313050072) (in Russ.).
 41. Xiang N., Zhang B., Hu J., Li K., Guo X. Modulation of carotenoid biosynthesis in maize (*Zea mays* L.) seedlings by exogenous abscisic acid and salicylic acid under low temperature. *Plant Cell Reports*, 2023, 43(1): 1 (doi: 10.1007/s00299-023-03106-6).

42. Bai C., Rivera S.M., Medina V., Alves R., Vilaprinyo E., Sorribas A., Canela R., Capell T., Sandmann G., Christou P., Zhu C. An in vitro system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation. *The Plant Journal*, 2014, 77(3): 464-475 (doi: 10.1111/tpj.12384).
43. Clotault J., Peltier D., Soufflet-Freslon V., Briard M., Geoffriau E. Differential selection on carotenoid biosynthesis genes as a function of gene position in the metabolic pathway: a study on the carrot and dicots. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e38724 (doi: 10.1371/journal.pone.0038724).