

УДК 581.1.575.113.1

# ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ, АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ И БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ В ПРОРОСТКАХ ДВУХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО ФОТОПЕРИОДА<sup>1</sup>

© 2024 г. Д. Х. Архестова<sup>a, b</sup>, О. К. Анисимова<sup>a</sup>, Е. З. Кочиева<sup>a</sup>, А. В. Щенникова<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра Фундаментальные основы биотехнологии  
Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>b</sup>Институт сельского хозяйства, Федеральный научный центр “Кабардино-Балкарский научный центр  
Российской академии наук”, Нальчик, Россия

\*e-mail: shchennikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 01.10.2023 г.

Циркадная система растений как результат адаптационной эволюции тесно связана с чувствительностью их к фотопериоду. Вид *Zea mays* L. исходно принадлежит к короткодневным, при этом современные культивируемые образцы кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду. В работе проанализировано воздействие смены режима длинного дня на ультракороткий день и длинную ночь на уровень транскриптов ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистемы I (*psaA*), фотосистемы II (*psbA*) и биосинтеза каротиноидов (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*) в листьях двух средне-позднеспелых инбредных линий кукурузы (Л-5580-1 и Л-5739), сходных по морфофизиологическим характеристикам. В тех же листьях определено содержание хлорофиллов и каротиноидов. Обнаружено, что исследуемые линии существенно различаются по динамике изменения уровня транскриптов генов и содержания пигментов в ответ на смену фотопериода. Уровень транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* у обеих линий возрастает спустя 1 ч после завершения ультракороткого дня и далее характеризуется ростом или падением в зависимости от линии. Экспрессия генов фотосистемы *psaA* и *psbA* различается между линиями, как по уровню, так и по динамике ответа на смену фотопериода. Активность генов каротиногенеза *ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE* и *ORANGE-GREEN* повышается у обеих линий при смене дня ночью (кроме *ZmPSY2* у Л-5580-1) и снижается в разной степени в зависимости от линии к завершению ночного периода. Содержание пигментов спустя 1 ч после смены режима растет у Л-5580-1 и не меняется у Л-5739, а к концу ночи снижается у обеих линий. Полученные данные свидетельствуют о сохранении циркадного ритма у Л-5580-1 и повышенной адаптивности Л-5739 и могут быть использованы для поиска доноров признака высокой адаптивности к изменению фотопериода среди образцов кукурузы.

**Ключевые слова:** *Zea mays* L., биосинтез каротиноидов, гены фотосистем I и II, кукуруза, фотопериод, циркадные часы, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324030028, EDN: NMZYII

## ВВЕДЕНИЕ

Адаптационная эволюция живых организмов, включая растения, привела к появлению циркадной системы, для которой свойственны повторяющиеся колебания в молекулярных процессах с периодом около 24 ч и циклически “день-ночь”, а также сезонной изменчивостью [1]. Входящий в систему внутренний осциллятор (циркадные часы) синхронизиру-

ется с циклическими процессами окружающей среды с помощью механизмов рецепции поступающих экологических сигналов, что позволяет растению оптимизировать внутренние процессы по отношению к внешним условиям [1]. Как суточные, так и сезонные ритмы находятся в значительной зависимости от фотопериода [2], что отражено в делении растений на длиннодневные (цветут при фотопериоде более 12 ч), короткодневные (менее 12 ч) и нейтральные (инициация цветения не зависит от фотопериода) [3].

<sup>1</sup> Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324030028

Молекулярный уровень циркадных часов представлен группой генов, которые регулируют ритмичность экспрессии более 30% транскриптома, как показано на длиннодневном модельном виде *Arabidopsis thaliana* L. [2, 4]. В группу входят гены транскрипционных факторов (ТФ) *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) и *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*), утренняя активность которых подавляет экспрессию вечерне-ночных генов *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*), *LUX ARRHYTHMO* (*LUX*), *EARLY FLOWERING* (*ELF*) 3 и *ELF4* [2]. Одновременно ТФ *CCA1* и *LHY* стимулируют экспрессию генов семейства *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR* (*PRR*), продукты которых (*PRR9* и *PRR7*), действуя в петле обратной связи, подавляют экспрессию *CCA1* и *LHY* в середине дня. *LUX*, *ELF3* и *ELF4* совместно участвуют в репрессии генов *PRR9*, *PRR7*, *GIGANTEA* (*GI*) и *NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED 1* (*LNK1*) поздним вечером [2].

ТФ *GI* считается одним из ключевых участников циркадного осциллятора. Вместе с фоторецептором синего света *ZEITLUPE* (*ZTL*, или *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1* (*FKF1*)) *GI* контролирует накопление белков *TOC1* и *PRR* [2]. Важность ТФ *GI* подчеркивается его участием в передаче световых и гормональных сигналов, накоплении хлорофиллов и крахмала, а также определении стрессоустойчивости растений [5–7]. Детализирована роль ТФ *GI* в контроле экспрессии генов, чувствительных к фитогормону абсцизовой кислоте (АБК), которая участвует в регуляции множества аспектов развития и стрессового ответа растения, а также связанных с этим физиологических реакций [8]. ТФ *GI* совместно с ТФ *ENHANCED EM LEVEL* (*EEL*) связывается с АБК-чувствительным регуляторным элементом в промоторе гена 9-цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы 3 (*NCED3*), положительно регулируя суточный синтез АБК; мутация *gi* приводит к падению содержания АБК за счет снижения уровня транскриптов *NCED3* [9]. Наконец, ТФ *GI* в комплексе с *FKF1* стимулирует экспрессию гена ТФ *CONSTANS* (*CO*), индуктора цветения *A. thaliana* при длинном дне [3].

Фотопериод, как параметр циркадной системы, включает регуляторную активность осциллятора по отношению к связанным с фотосинтезом генам белков фотосистемы и биосинтеза каротиноидов. Свидетельством этого служит, к примеру, участие двух из четырех ключевых белковых компонентов реакционных центров фотосинтеза, *psaA* (апопротеины P700 фотосистемы I) и *psbA* (белок D1 фотосистемы II) [10], в адаптации растения к изменениям фотопериода и спектральных характеристик света [11]. На-

глядно продемонстрировано влияние продолжительности фотопериода на накопление каротиноидов и уровень экспрессии генов пути каротиногенеза [12–14]. Соединения каротиноидов (ксантофиллы) выполняют светособирающую функцию в сине-зеленой части солнечного спектра, передавая энергию электронного возбуждения хлорофиллам, и одновременно участвуют в защите молекул хлорофилла от фотоокисления [15]. Помимо этого, накопление важного апокаротиноида АБК регулируется, в частности, ТФ *GI* [9, 16].

Путь биосинтеза каротиноидов, продуктами которого являются, в том числе, ксантофиллы и АБК, начинается с образования 15-цис-фитоина под воздействием фитоинсинтазы (*PSY*) [17]. На стадии получения полностью-транс-ликопина происходит разветвление пути: циклизация ликопина приводит к образованию α-каротина (ликопин-ε-циклаза *LCYE*) или β-каротина (ликопин-β-циклаза *LCYB*) и, далее, ε/β- или β/β-ксантофиллов соответственно. β/β-ксантофиллы 9-цис-виолаксантин и 9-цис-неоксантин служат субстратами для образования АБК под воздействием диоксигеназ *NCED* [18].

Учитывая критичность циркадной системы для всех процессов развития растения, актуально ее изучение у сельскохозяйственных культур. На примере кукурузы (*Zea mays* L. ssp. *mays*) показано, что, как у и длиннодневного *A. thaliana*, воздействие циркадных часов затрагивает около трети транскриптома [19, 20]. При этом *Z. mays* исходно принадлежит к короткодневным видам, а современные культивируемые сорта, линии и гибриды кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду [21, 22].

В отличие от *A. thaliana* в геноме *Z. mays* обнаружено два гена, гомологичных *GI*, *GIGZ1a* и *GIGZ1b*, в некоторых статьях гены названы *ZmGI1* и *ZmGI2* [2, 3]. Пик транскрипции *GIGZ1a* и *GIGZ1b* наблюдается в дневное время; в условиях длинного дня максимум наступает позже, чем при коротком фотопериоде [3]. В противоположность действию гена *GI A. thaliana*, мутация в каждом из двух генов *Z. mays* по отдельности (*GIGZ1a* или *GIGZ1b*) ускоряет цветение кукурузы в условиях длинного дня [23, 24]. Однако функции *GIGZ1a* (*ZmGI1*) и *GI* считаются сходными, поскольку суперэкспрессия *GIGZ1a* у нулевого мутанта *atgi* восстанавливает нормальное время цветения и характер роста *A. thaliana* [23]. Тем не менее, выдвигается предположение, что ТФ *GI* способствует цветению длиннодневных растений, но подавляет цветение короткодневных видов [2, 23].

Количество генов фитоинсинтазы *PSY* у *A. thaliana* и *Z. mays* также различается. В геноме *A. thaliana* присутствует один ген *PSY* [25], а у *Z. mays* их три – *ZmPSY1*, *ZmPSY2* и

*ZmPSY3* [26, 27]. Белки *ZmPSY1* и *ZmPSY2* осуществляют основную активность фитоинсинтазы у кукурузы; уровень экспрессии гена *ZmPSY1* положительно связан с накоплением каротиноидов в эндосперме зерна, а также с каротиногенозом в фотосинтезирующей ткани в условиях темноты [28]. Ген *ZmPSY3* активируется в корневой системе кукурузы в ответ на стрессы (засуху, соль, АБК); повышение уровня мРНК *ZmPSY3* положительно коррелирует с накоплением каротиноидов [27].

Каталитическая стабильность фитоинсинтазы *PSY* зависит от взаимодействия фермента с белком *ORANGE (OR)* [29], который представляет собой локализованный в пластидах богатый цистеином шаперон холодазу [30]. Показано участие *OR* в защите растения от стрессовых факторов за счет контроля биосинтеза каротиноидов и АБК, а также за счет прямой стабилизации фотосистемы II [30, 31]. Считается также, что *OR* индуцирует дифференцировку хромопластов, содержащих структуры для накопления каротиноидов [32]. В геноме кукурузы ген *OR* аннотирован как *ORANGE-GREEN* (NCBI Gene ID: 100275801), но практически не исследован. Однако, показано, что суперэкспрессия гена *A. thaliana OR* в трансгенных гибридах кукурузы способствует накоплению каротиноидов [33].

Еще один фермент биосинтеза каротиноидов, критичный для фотозащиты и синтеза АБК — ликопин-ε-циклаза (*LCYE*), активность которого определяет соотношение ксантофиллов виолаксантинового (β/β) и лютеинового (ε/β) циклов [17, 18]. В геноме кукурузы *Z. mays* присутствует один ген *LCYE*, активность которого обратно связана с накоплением β-каротина и β-криптоксантина (β/β-ветвь) [34].

В данном исследовании была проведена оценка воздействия изменения фотопериода на содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также уровень экспрессии ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногеноза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*) в листьях образцов двух инбредных линий кукурузы, обладающих сходными морфобиологическими характеристиками. Полученные результаты свидетельствуют о зависимости молекулярной регуляции ответа от генотипа *Z. mays*, несмотря на сходство характеристик (группа ФАО по индексу скороспелости, окраска зерна) линий кукурузы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Предметом исследования стали две инбредные линии кукурузы *Z. mays* отечественной селекции (оригинатор — Институт сельского хозяйства Кабардино-Бал-

карского научного центра РАН, КБР, Россия). Обе линии (Л) 5580-1 и 5739 формируют зерна желтой окраски, имеют сходные морфобиологические характеристики и относятся к средне-позднеспелым (ФАО 300–399); длительность фенологических фаз, включая сроки инициации цветения (чувствительность к фотопериоду), у линий сходные.

Для эксперимента в 2023 г. использовали урожай 2022 г., полученный в полевых условиях ИСХ КБНЦ РАН (с. п. Опытное, Терского района, степная природно-климатическая зона КБР, 43°37'45" с. ш. 44°08'15" в. д.). Период “май–июль” в данной зоне характеризуется длинным днем (14–15 ч) и дневной/ночной температурой 18/12°C (май; стадия проростков), 23/17°C и 27/19°C (июнь и июль: основной рост, цветение, созревание).

Зерна, имеющие правильную форму и окраску, без деформаций и повреждений, просушивали в течение суток на воздухе при комнатной температуре, затем помещали в емкость с водой и опустившиеся на дно образцы использовали для дальнейшей работы. Отобранные зерна выкладывали на марлю (так, чтобы они не соприкасались друг с другом), заливали водой и оставляли на ночь. Утром (спустя 10–12 ч) прорастающие зерна пересаживали в горшки с увлажненным грунтом и выращивали в контролируемых условиях длинного фотопериода (16/8 ч 23/15°C — день/ночь; экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН) до достижения фазы четвертого листа (18–20 дней).

Полученные растения подвергали стрессовому воздействию смены 16-часового дня ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью (далее также упоминается как “темный день”). Затем следовала 8 ч ночь в соответствии с предшествующим режимом. Для анализа (уровень экспрессии генов и содержание хлорофиллов и каротиноидов) отбирали верхние листья в трех временных точках: “4/0” как время перехода день/ночь (4 ч после начала 4-часового дня/0 ч перед 12-часовым “темным днем”), “1” (1 ч после начала “темного дня”) и “12” (12 ч “темного дня”).

**Определение уровня генной экспрессии.** Из 50 мг ткани верхних листьев растения (стадия четвертого листа; три временные точки) выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, “QIAGEN”, Германия), очищали от примесей ДНК (RNase-free DNase set, “QIAGEN”, Германия), проверяли на качество (электрофорез в 1.5% агарозном геле) и количество (Qubit® Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США) и использовали для синтеза кДНК с праймером oligo-dT (GoScript Reverse Transcription System, “Promega”, США).

Уровень экспрессии генов определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), которую проводили в двух биологических и трех технических повторах на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”, США). В реакцию использовали 3.0 нг кДНК (концентрацию измеряли с помощью Qubit® Fluorometer, “Thermo Fisher Scientific”, США) и смесь для РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green (“Синтол”, Россия). Условия реакции: денатурация (5 мин, 95°C), затем 40 циклов “денатурация (15 с, 95°C) — отжиг/синтез цепи (40 с, 60°C)”. Для нормализации данных РВ-ПЦР использовали референсный ген *Zea mays polyubiquitin* (NM\_001329666.1).

Праймеры для РВ-ПЦР разрабатывали на основе геномных данных, доступных в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), с последующей проверкой *in silico* на ген-специфичность в NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для валидации эффективности и специфичности праймеров смесь имеющихся препаратов кДНК в концентрациях 10.0, 1.0 и 0.1 нг на реакцию использовали для тестового РВ-ПЦР (три технических повтора). Критерием эффективности пары праймеров служила кривая плавления, содержащая один пик как подтверждение наработки единственного ампликона. Проведенное тестирование показало 95–100% ( $R^2 = 0.943–0.999$ ) эффективность разработанных праймеров. Последовательности праймеров приведены в таблице S1 (табл. S1. Дополнительные материалы).

**Определение содержания каротиноидов и хлорофиллов.** В тесте использовали ткани верхних листьев проростков (те же образцы, что для анализа профиля экспрессии генов). Количественную (мг/г сырого веса) оценку содержания хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов (общее) в растительной ткани проводили согласно [35] с регистрацией спектров поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (“Eppendorf”, Германия).

**Структурный и статистический анализ.** Для сопутствующего работе структурного анализа последовательностей ДНК (при подборе праймеров) использовали базу данных NCBI, включая программу NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Данные анализов уровней экспрессии генов и содержания пигментов статистически обрабатывали (one-way ANOVA; ‘multiple comparisons, corrected with Bonferroni test’) с помощью программы Graph Pad Prism v. 9 (<https://www.graphpad.com>, США) на основе двух биологических и трех технических повторов при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Несмотря на то, что современные сорта, линии и гибриды кукурузы считаются нейтральными по отношению к фотопериоду, они продолжают делиться по срокам цветения/спелости (ФАО от 100 до 700). Для работы мы выбрали две инбредные линии *Z. mays*, Л-5580-1 и Л-5739, которые по срокам спелости занимают среднее положение среди ранних и поздних линий (средне-спелые, ФАО 300–399), а также сходны по другим морфофизиологическим характеристикам, включая желтую окраску зерна. Это предполагает отсутствие серьезных различий в чувствительности к изменениям фотопериода и регуляции биосинтеза каротиноидов.

При проращивании отобранные семена Л-5580-1 и Л-5739 свежего урожая показали 100% всхожесть. Скорость роста растений была одинакова, как и срок наступления фазы четвертого листа (18–20 дней после прорастания семян). Исходно линии получены селекционерами КБР, где в период вегетации кукурузы день составляет более 12 ч. Поэтому для культивации растений были использованы условия длинного фотопериода (16 ч).

По достижении фазы четвертого листа растения были перенесены в условия, когда 16-часовой день был заменен на 4-часовой день и 12-часовую ночь, то есть завершение 16-часового дня предшествующего режима соответствовало концу ночи. Для сохранения ассоциации в тексте 12-часовая ночь названа “темным днем”. Индивидуальная реакция различных линий кукурузы на изменения в фотопериоде предполагает, что кратковременные модификации суточного ритма способны вызвать резкое изменение уровней транскриптов генов и, следовательно, перспективны для функциональной оценки генов. Подобные стрессы ранее использованы в анализе дифференциальной экспрессии генов биосинтеза каротиноидов при 24-часовом облучении светом (в том числе, разного спектра) этиолированных проростков *Z. mays* [28] и при переносе проростков *Vigna radiata* в условия постоянного света, смены дня и ночи (12/12 ч, день/ночь) и постоянной темноты [36].

Для оценки воздействия смены фотопериода в листьях растений двух линий кукурузы был определен уровень экспрессии ключевых генов циркадного ритма (*GIG1a*, *GIG1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногенеза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), а также было измерено содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и суммы каротиноидов. Были выбраны временные точки измерения: “4/0” (4 ч после начала 16-часового дня предыдущего режима = 0 ч перед стрессовой сменой дня ночью; ультракороткий 4-часовой день); “1” (1 ч после

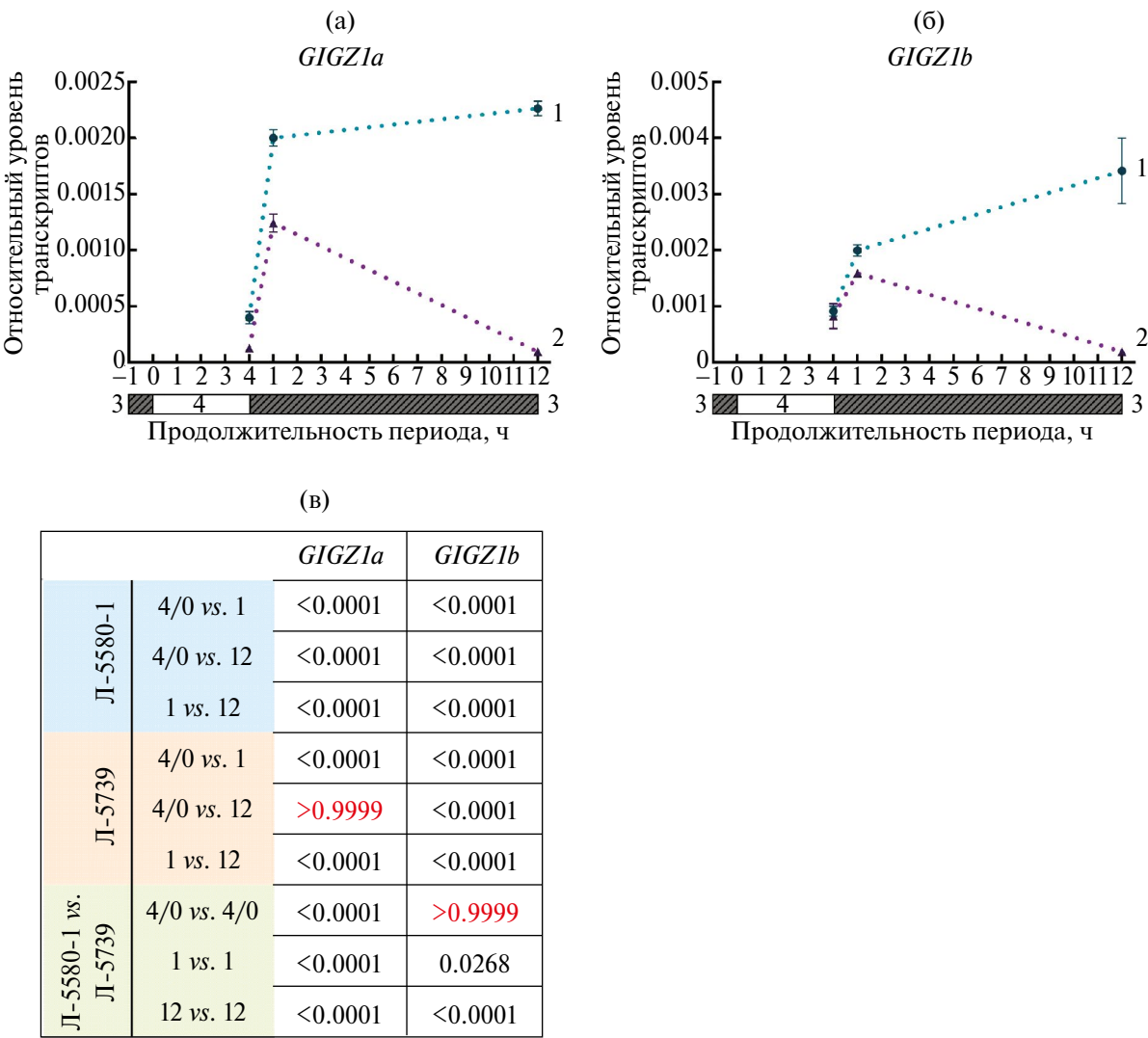
начала “темного дня”); “12” (12 ч после начала “темного дня”; длинная ночь).

Анализ экспрессии целевых генов показал, что реакция генов циркадного ритма на смену фотопериода различается между линиями. Во всех трех точках измерения уровень транскриптов *GIGZ1a* был существенно выше у Л-5580-1, чем у Л-5739. У обеих линий экспрессия гена резко выросла в точке “1”, тогда как в точке “12” она повысилась (Л-5580-1) или снизилась до исходного значения (Л-5739) (рис. 1а). При одинаковом для линий исходном уровне транскриптов *GIGZ1b*, динамика экспрессии гена была сходна с профилем *GIGZ1a*. В точке “1” уровень транскриптов *GIGZ1b* существенно вырос у обеих линий. В точке “12” экспрессия усилилась у Л-5580-1 и резко снизилась у Л-5739 (в ~14 раз в сравнении с “1”) (рис. 1б). Если сопоставлять активность генов между собой для

индивидуальной линии, то в точке “4/0” гены *GIGZ1a* и *GIGZ1b* характеризовались сходным уровнем экспрессии у Л-5739, в то время как у Л-5580-1 уровень транскриптов *GIGZ1b* был в ~2 раза выше, чем *GIGZ1a* (рис. 1а, б).

В случае генов белков фотосистем I и II, уровень экспрессии *psaA* и *psbA* в точках “4/0” и “1” в проростках Л-5580-1 был значительно (~1.5–2 раза) ниже, чем у Л-5739. Однако в точке “12” наблюдалась прямо противоположная ситуация (рис. 2а, б). По отношению к значению “4/0”, в точке “1” уровень транскриптов снизился незначительно (*psaA* у Л-5580-1) или существенно (*psaA* у Л-5739, *psbA* у обеих линий). В точке “12” уровень транскриптов вернулся к исходному у Л-5580-1 (оба гена) и резко упал в ~4 (*psaA*) и ~7 (*psbA*) раз (vs. “4/0”) у Л-5739 (рис. 2а, б).

Профиль экспрессии генов каротиногенеза также различался между исследуемыми линиями.



**Рис. 1.** Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *GIGZ1a* (а) и *GIGZ1b* (б) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения  $P < 0.05$  (в) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

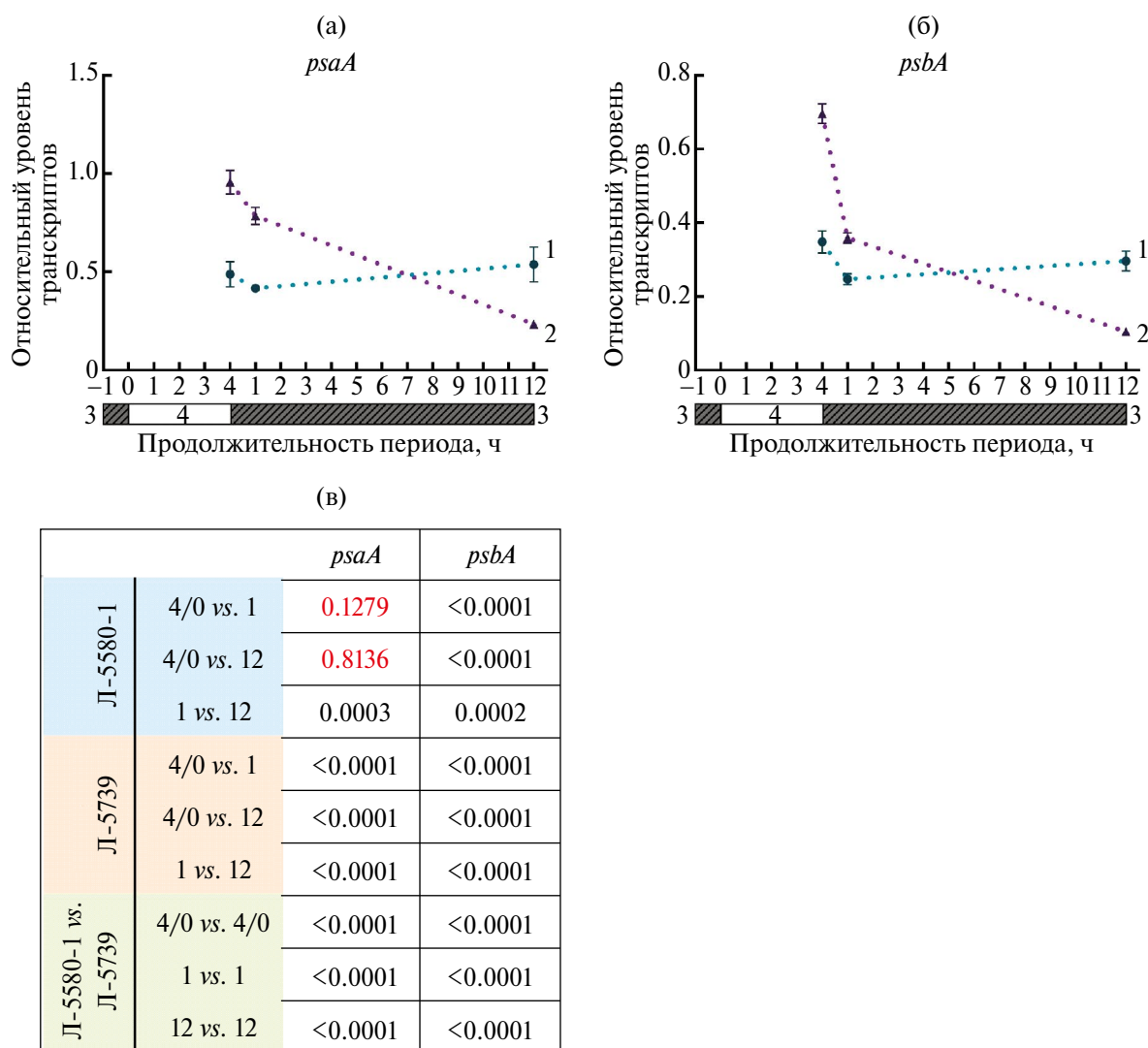
Уровень транскриптов *ZmPSY1*, исходно равный у линий, одинаково резко возрастает (в ~2 раза) в точке “1” у обеих линий, а в точке “12” снижается незначительно (Л-5580-1) или существенно (Л-5739) (рис. 3а). Уровень транскриптов *ZmPSY2* в листьях Л-5580-1 исходно более высок, чем у Л-5739, и в точках “1” и “12” не меняется. В то же время, в листьях Л-5739 экспрессия гена в ~4 раза возрастает в точке “1”, а в точке “12” резко падает почти до исходного (“4/0”) значения (рис. 3б). Таким образом, у Л-5739 оба гена, *ZmPSY1* и *ZmPSY2*, отреагировали на смену условий фотопериода значительным ростом (точка “1”) и падением (“12”) активности, в то время как у Л-5580-1 подобный ответ наблюдался только для гена *ZmPSY1* (рис. 3а, б).

Начальный (“4/0”) уровень экспрессии гена *ZmLCYE* в проростках Л-5580-1 был в ~4 раза выше, чем у Л-5739. У обеих линий в точке “1”

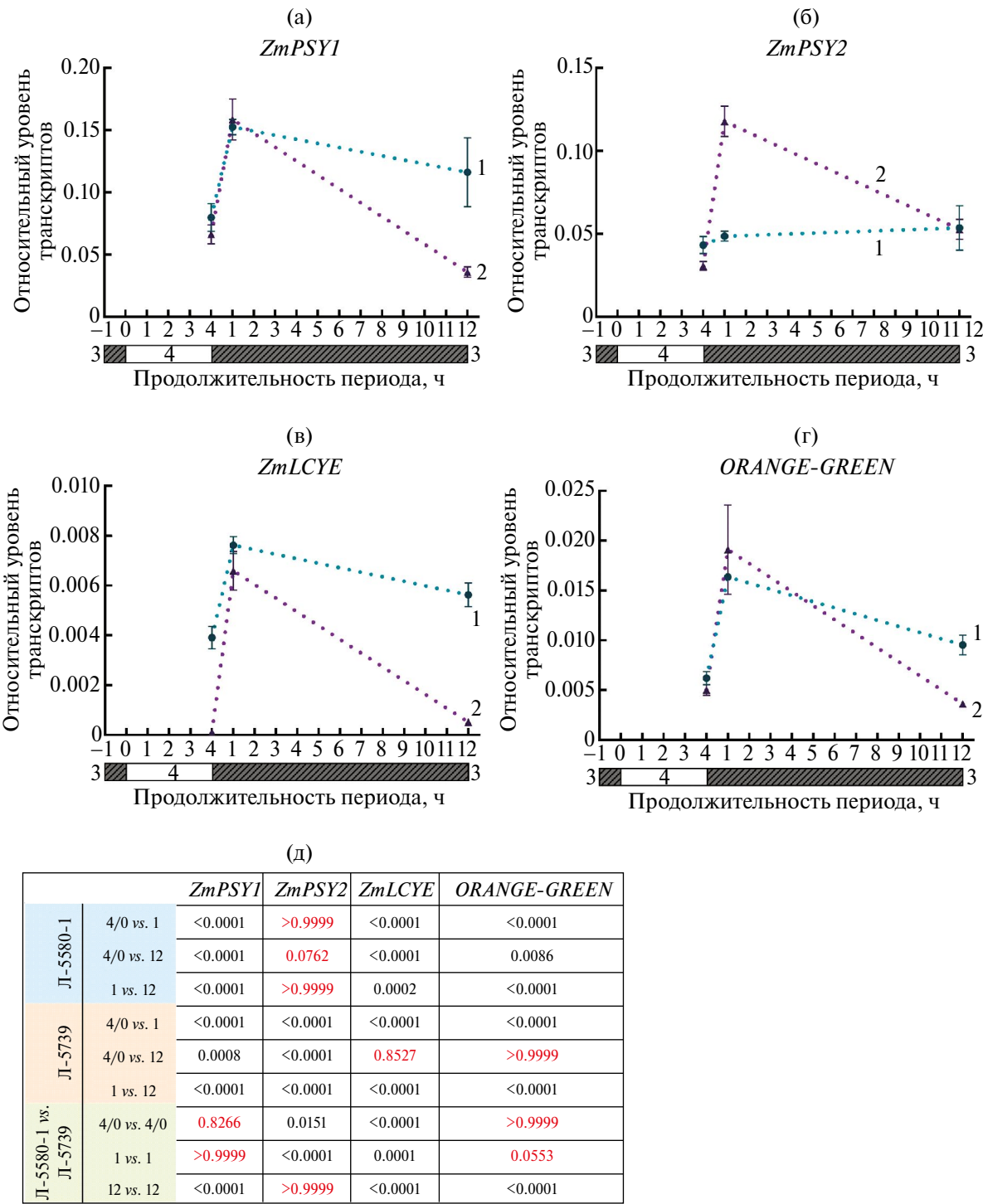
он вырос (в ~2–6 раз в зависимости от линии) и в точке “12” снизился незначительно (Л-5580-1) или значительно (Л-5739). Таким образом, динамика ответа на смену фотопериода у линий сопоставима, однако в случае Л-5739 значительно более выражена, при этом уровень транскриптов в точке “1” у линий практически совпадает (рис. 3в).

Уровень транскриптов гена *ORANGE-GREEN*, равный у линий в точке “4/0”, одинаково резко возрастает (в ~3 раза) в точке “1” у обеих линий и в точке “12” снижается в ~2 (Л-5580-1) и ~4 (Л-5739) раза (рис. 3г).

Биохимический анализ листовой ткани растений Л-5580-1 и Л-5739 показал, что содержание хлорофиллов *a* и *b* в исходной точке, сходное между линиями, в ответ на изменение фотопериода в точке “1” резко растет у Л-5580-1 и не меняется у Л-5739, а в точке “12” снижается у обеих



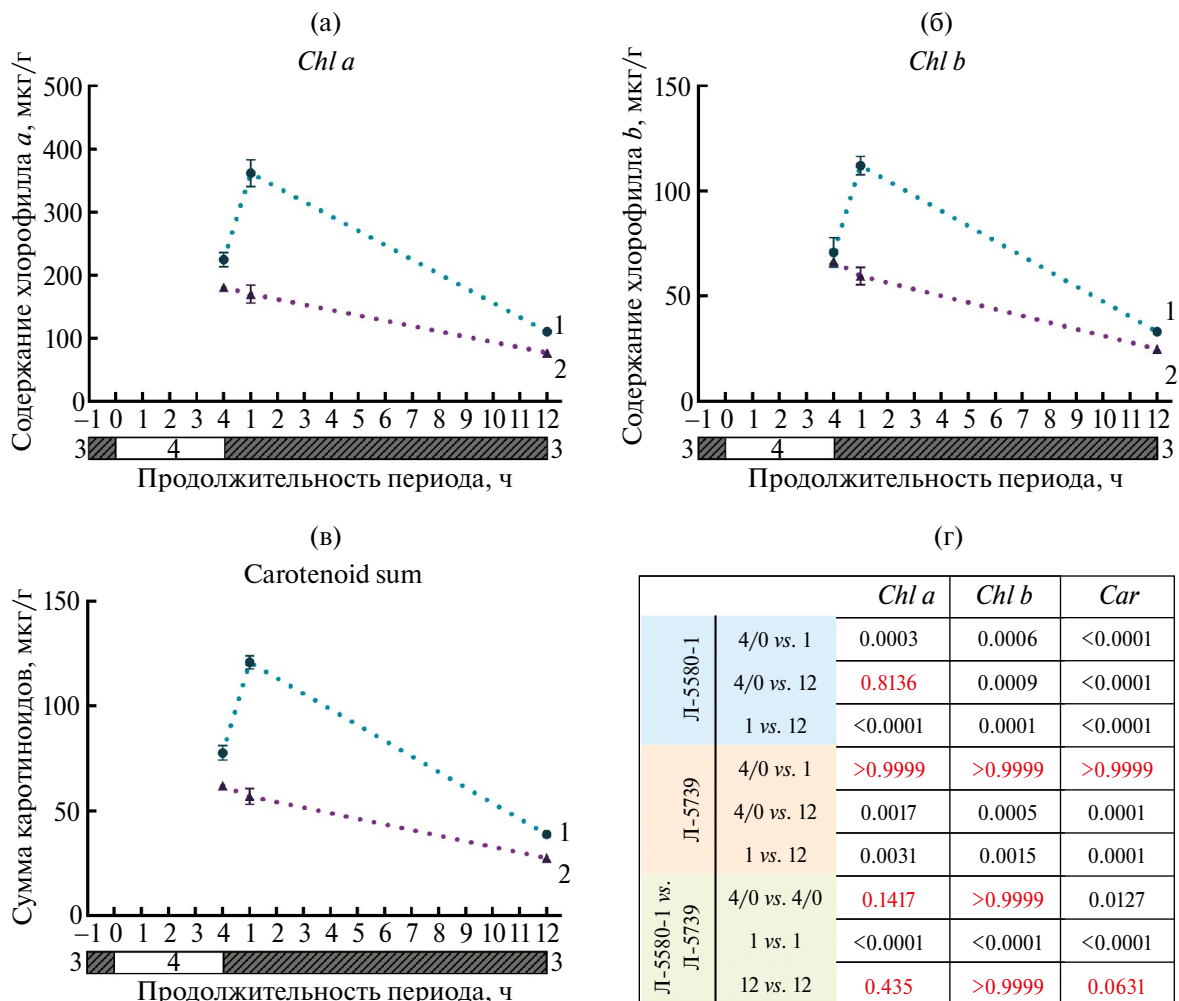
**Рис. 2.** Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *psaA* (а) и *psbA* (б) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения  $P < 0.05$  (в) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.



**Рис. 3.** Результаты РВ-ПЦР анализа профиля экспрессии генов *ZmPSY1* (а), *ZmPSY2* (б), *ZmLCYE* (в) и *ORANGE-GREEN* (г) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения  $P < 0.05$  (д) соответствуют значимым различиям уровня транскриптов генов между точками замера (“4/0”, “1”, “12”) у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

линий до значений существенно ниже исходных (рис. 4а, б). Содержание суммы каротиноидов в точке “4/0” выше у Л-5580-1 в сравнении с Л-5739 и показывает сходную с хлорофиллами динамику реакции на смену фотопериода. А именно, в точке “1” количество каротиноидов существенно

возрастает (в ~1.5 раза) в листьях Л-5580-1 и не меняется у Л-5739; в точке “12” сумма каротиноидов снижается у обеих линий до значений существенно ниже начальных (рис. 4в). Таким образом, было показано, что, несмотря на сходство морфофизиологических



**Рис. 4.** Содержание хлорофиллов *a* (а) и *b* (б) и суммы каротиноидов (в) в листьях проростков кукурузы (линии 5580-1 и 5739) в ответ на смену 16-часового фотопериода ультракоротким 4-часовым днем и 12-часовой ночью. Значения  $P < 0.05$  (г) соответствуют значимым различиям между точками замера ("4/0", "1", "12") у каждой линии, а также в аналогичных точках между линиями. 1 – Л-5580-1, 2 – Л-5739, 3 – ночь, 4 – день.

характеристик исследуемых линий кукурузы, включая время зацветания, они существенно различаются по динамике изменения уровней транскриптов целевых генов и содержания каротиноидов и хлорофиллов в ответ на резкую смену фотопериода.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Циркадианный осциллятор растений с помощью повторяющейся модели комбинаторной активности основных регуляторов определяет ритм изменений трети транскриптома [2, 19, 20]. Циркадный ритм находится в зависимости от фотопериода и оказывает воздействие на активность генов, участвующих в приеме и передаче световых сигналов, фотосинтезе и фотозащите растения [2, 10, 12–14].

Объектом данного исследования стала кукуруза *Zea mays* ssp. *mays*, широко возделываемая сегодня сельскохозяйственная культура, проис-

хождение которой связано с доместикацией и интрогрессивной гибридизацией двух теосинте – *Z. mays* var. *parviglumis* и var. *mexicana* [21]. Поскольку центром происхождения кукурузы были субтропики (юг современной Мексики), вид изначально принадлежал к растениям короткого дня. Последовавшая искусственная селекция и продвижение культуры в умеренные широты привели к появлению нейтральных по отношению к фотопериоду образцов, которые стали родоначальниками большинства современных сортов, гибридов и инбредных линий *Z. mays* [21, 22]. Таким образом, вид *Z. mays* примечателен тем, что исходно генетически запрограммирован на короткодневность, но приобрел нейтральный статус, и такие преобразования могут быть связаны с изменениями в циркадном осцилляторе и в работе генов, связанных с фотопериодом.

В данной работе в листьях 18–20-дневных проростков кукурузы была охарактеризована дифференциальная (в ответ на смену фотопе-

риода) экспрессия генов *GIGZ1a* и *GIGZ1b*, кодирующих два паралога одного из главных регуляторов эндогенных часов, тесно связанного с фотопериод-зависимой инициацией цветения [2, 3]. Одновременно был проанализирован уровень мРНК генов ключевых белков фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) [10, 11], а также генов биосинтеза каротиноидов (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), определяющих главные этапы пути [28, 33, 34]. В тех же тканях было измерено содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и суммы каротиноидов.

Суточный ритм профиля экспрессии большинства анализируемых генов в фотосинтезирующей ткани известен. Все они активируются светом. Начиная с рассвета, растет уровень транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b*; к концу дня он достигает максимума, затем в течение ночи снижается до предутреннего минимума [3]. Наибольший уровень транскриптов генов *psaA* и *psbA* характерен для середины дня; к наступлению темноты он идет на спад, а с утра снова начинает расти [37]. Уровень экспрессии *ZmPSY2* также достигает максимума к середине дня и снижается к наступлению ночи, тогда как регуляция экспрессии *ZmPSY1*, предположительно, от света не зависит [28]. Пик активности генов *LCY* и *OR* приходится на первую половину дня; к вечеру уровень мРНК снижается до минимальных значений, а к концу ночи снова начинает расти, что показано на примере генов *LcyB* и *CrOr* зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [38].

Две исследуемые линии кукурузы, Л-5580-1 и Л-5739, характеризовались сходными признаками, включая сроки цветения/спелости (группа ФАО), что предполагало присутствие у обеих линий аналогичных связей фотопериод-циркадный ритм. Измерения были проведены в листьях растений в ответ на смену длинного 16-часового фотопериода на ультракороткий 4-часовой день и 12-часовой ночь/“темный день”, что отличается от использованных в других работах стрессовых условий — постоянного (24-часового) света или темноты [28, 36].

Несмотря на внешнее сходство линий, реакция на смену фотопериода различалась на молекулярном уровне. Так, у обеих линий наблюдался рост экспрессии генов циркадного цикла *GIGZ1a* и *GIGZ1b* спустя 1 ч после перехода в режим “темного дня”. Однако, к концу (12 ч) “темного дня” уровень транскриптов продолжал расти у Л-5580-1 и, напротив, стал снижаться у Л-5739 (рис. 1а, б). Как упоминалось выше, в норме (длинный фотопериод) мРНК *GIGZ1a* и *GIGZ1b* начинает накапливаться с рассвета, достигая к вечеру максимума, затем в течение ночи уровень транскриптов генов снижается до минимума [3]. При отмене ночи (постоянный день или “светлая ночь”) циркадный ритм сохраняется, однако

падение уровня транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* с наступлением “светлой ночи” происходит менее интенсивно, чем реальной темной ночью [3].

Наши данные (рис. 1а, б) свидетельствуют в пользу поддержания циркадного ритма у растений Л-5580-1, в листьях которых пик уровня транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* спустя 12 ч “темного дня” (рис. 1а, б) соответствует вечернему максимуму дневной экспрессии в режиме длинного 16-часового дня. В то же время падение активности *GIGZ1a* и *GIGZ1b* у Л-5739 в этой же точке (рис. 1а, б) ожидаемо, скорее, для второй половины ночи. С одной стороны, одинаковые характеристики линий предполагают компенсацию разной чувствительности к фотопериоду некими другими внутренними факторами. Интереснее, однако, версия, что в сравнении с линией Л-5580-1, сохранившей циркадный ритм, линия Л-5739 либо не может его поддерживать в изменившихся условиях, либо быстрее адаптируется к изменению фотопериода, поскольку сразу восприняла “темный день” как ночь, вследствие чего активность генов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* соответствует ночному уровню. О подобных различиях у двух внешне сходных линий может свидетельствовать также существенно более низкий у Л-5739 исходный (точка “4/0”) уровень транскриптов *GIGZ1a* (рис. 1а), который считается функциональным гомологом гена *A. thaliana GI* [23]. Следовательно, можно предположить, что *GIGZ1a* участвует в определении степени адаптивности или же пластичности циркадного ритма у генотипов кукурузы.

Возможно различия в способности сохранения циркадного ритма и/или в адаптивности у исследуемых линий допускает, что дифференциальная экспрессия генов фотосистем и биосинтеза каротиноидов в ответ на смену фотопериода также индивидуальна.

Действительно, линии значительно различались по исходному (“4/0”) уровню транскриптов *psaA* и *psbA* (рис. 2а, б). Снижение экспрессии генов у обеих линий через 1 ч после наступления “темного дня” (рис. 2а, б) соответствует темновой фазе фотосинтеза и находится в согласии с ранее показанным сокращением уровня транскриптов генов *psaA* и *psbA* к наступлению темноты [37]. Однако далее, к 12 ч “темного дня”, у Л-5580-1 уровень транскриптов *psaA* и *psbA* вырос (рис. 2а, б), как если бы это был день, что подтверждает сохранение циркадного цикла у данной линии. В то же время у Л-5739 активность генов напротив продолжила падать (рис. 2а, б), что соответствует ночному профилю экспрессии генов и, учитывая известную роль *psaA* и *psbA* в адаптации растения к изменениям в характеристиках света [11], может служить подтверждением повышенной адаптивности Л-5739 к смене фотопериода.

Рассматривая в контексте наших предположений профиль экспрессии *ZmPSY1* и *ZmPSY2* нужно учитывать, что с каротиногенезом в листьях связаны оба гена фитоинсинтаз, но свет влияет только на *ZmPSY2*, а активность *ZmPSY1* находится под действием фитохром-независимой регуляции и важна для поддержания синтеза каротиноидов в темноте [28].

Мы обнаружили, что *ZmPSY1* отреагировал на затемнение резким (у обеих линий) ростом активности в точке “1” (что, вероятно, ассоциировано с ролью гена в каротиногенезе в темноте) и ее падением (в разной степени у линий) в точке “12” (рис. 3а). Можно предположить, что последнее может быть связано с сохранением циркадного ритма у Л-5580-1 (резкое падение уровня транскриптов гена к концу 16-часового дня предшествующего режима) и со скорой адаптацией к ночи у Л-5739 (только небольшое снижение экспрессии гена и функционирование в темноте).

Характерно, что уровень экспрессии фитохром-зависимого гена *ZmPSY2* в листьях Л-5580-1 был одинаков во всех точках измерения (рис. 3б), что снова говорит о возможном поддержании циркадного ритма 16-часового дня. В то же время у Л-5739 ген *ZmPSY2* вел себя сходным с *ZmPSY1* образом (рис. 3а). Уровень транскриптов вырос в ответ на смену фотопериода (“1”), что согласуется с индукцией *ZmPSY2* в листьях в ответ на абиотические стрессы [28], и затем упал (“12”), предположительно, в силу привыкания к ночной темноте.

Сходную с *ZmPSY1* модель ответа на стресс показали также гены *ZmLCYE* и *ORANGE-GREEN* (рис. 3в, г), что подкрепляет сделанные нами предположения.

Снижение, согласно результатам биохимического анализа, содержания хлорофиллов и каротиноидов в точке “12” у обеих линий (рис. 4а, б, в), вероятно, соответствует процессам, происходящим в темновой фазе фотосинтеза, когда снижаются фотосинтетические реакции (что определяется как “циркадная ночная депрессия фотосинтеза” (circadian night depression of photosynthesis)) у растений [39]. Хотя первые стадии синтеза хлорофиллов происходят в темноте, восстановление образующихся протохлорофиллидов до хлорофиллидов *a* требует освещения [40]. Поэтому наблюдаемое снижение содержания хлорофиллов в конце 12-часовой ночи (рис. 4а–в) было ожидаемо для обеих линий, независимо от способности поддерживать циркадный ритм в изменившихся условиях.

Интересно, что у Л-5739 резкий рост уровня транскриптов *ZmPSY1* и *ZmPSY2* в точке “1” (рис. 3а, б) не приводит к увеличению содержания каротиноидов (рис. 4в), что говорит в пользу повышенной адаптивности линии и согласуется с обычным ночным снижением суммы кароти-

ноидов в фотосинтезирующей ткани. В то же время у Л-5580-1 подъему экспрессии гена *ZmPSY1* в точке “1” (рис. 3а) сопутствует резкий рост количества пигмента (рис. 4в), то есть, вероятно, сохраняется циркадный ритм, и начало “темного дня” воспринимается как продолжение 16-часового дня предшествующего режима.

В заключение, в данной работе было изучено воздействие смены фотопериода на активность ключевых генов циркадного ритма (*GIGZ1a*, *GIGZ1b*), фотосистем I (*psaA*) и II (*psbA*) и каротиногенеза (*ZmPSY1*, *ZmPSY2*, *ZmLCYE*, *ORANGE-GREEN*), а также на содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях двух инбредных линий кукурузы. Выяснилось, что, несмотря на сходство линий по признаку скороспелости (группа ФАО), они существенно различаются по молекулярной реакции на изменение длины дня, что может быть связано с особенностями их родословных. Полученные данные свидетельствуют о потенциале поддержания циркадного ритма у линии Л-5580-1 и о предположительно повышенной адаптивности у Л-5739. Таким образом, фотосинтезирующие ткани проростков кукурузы могут быть использованы для определения доноров признаков, связанных со способностью сохранять циркадный ритм и/или высокой скоростью адаптации в изменившихся условиях фотопериода. Для этого предполагается проведение анализа изменения содержания хлорофиллов/каротиноидов и профиля экспрессии использованных в работе генов в ответ на смену условий фотопериода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-16-00008) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Авторы благодарны С.П. Аппаеву за предоставление семян кукурузы исследуемых линий.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hut R.A., Beersma D.G. Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2011. V. 366. P. 2141.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0409>
2. Bendix C., Marshall C.M., Harmon F.G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits // Mol. Plant. 2015. V. 8. P. 1135.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.003>

3. Miller T.A., Muslin E.H., Dorweiler J.E. A maize *CONSTANS*-like gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1377.  
<https://doi.org/1007/s00425-008-0709-1>
4. Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock // *Sci*. 2000. V. 290. P. 2110.  
<https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2110>
5. Mishra P., Panigrahi K.C. GIGANTEA – an emerging story // *Front. Plant Sci*. 2015. V. 6 P. 8.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
6. Ronald J., McCarthy K., Davis S.J. GIGANTEA integrates photoperiodic and temperature signals to time when growth occurs // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. P. 357.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.008>
7. Ke Q., Kim H.S., Wang Z., Ji C.Y., Jeong J.C., Lee H.S., Choi Y.-I., Xu B., Deng X., Yun D.-J., Kwak S.S. Down regulation of GIGANTEA like genes increases plant growth and salt stress tolerance in poplar // *Plant Biotech. J*. 2017. V. 15. P. 331.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12628>
8. Siemiatkowska B., Chiara M., Badiger B.G., Riboni M., D'Avila F., Braga D., Salem M.A.A., Martignago D., Colanero S., Galbiati M., Giavalisco P., Tonelli C., Juenger T.E., Conti L. GIGANTEA is a negative regulator of abscisic acid transcriptional responses and sensitivity in Arabidopsis // *Plant Cell Physiol*. 2022. V. 63. P. 1285.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcac102>
9. Baek D., Kim W.Y., Cha J.Y., Park H.J., Shin G., Park J., Lim C.J., Chun H.J., Li N., Kim D.H., Lee S.Y., Pardo J.M., Kim M.C., Yun D.J. The GIGANTEA-ENHANCED EM LEVEL complex enhances drought tolerance via regulation of abscisic acid synthesis // *Plant Physiol*. 2020. V. 184. P. 443.  
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00779>
10. Alp F.N., Arian B., Ozfidan-Konakci C., Balci M., Yildiztugay E., Cavusoglu H. Multiwalled carbon nanotubes alter the PSII photochemistry, photosystem-related gene expressions, and chloroplastic antioxidant system in *Zea mays* under copper toxicity // *J. Agric. Food Chem*. 2022. V. 70. P. 11154.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02608>
11. Steiner S., Dietzel L., Schröter Y., Fey V., Wagner R., Pfannschmidt T. The role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard // *Mol. Plant*. 2009. V. 2. P. 416.  
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp007>
12. Li J., Lu Y., Chen H., Wang L., Wang S., Guo X., Cheng X. Effect of photoperiod on vitamin E and carotenoid biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) sprouts // *Food Chem*. 2021. V. 358: 129915.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129915>
13. Khajepour F., Hosseini S.A., Nasrabadi R.G., Markou G. Effect of light intensity and photoperiod on growth and biochemical composition of a local isolate of *Nostoc calcicola* // *Appl. Biochem. Biotech*. 2015. V. 176. P. 2279.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1717-9>
14. Lefsrud M.G., Kopsell D.A., Augé R.M., Both A.J. Biomass production and pigment accumulation in kale grown under increasing photoperiods // *HortSci*. 2006. V. 41. P. 603.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1190945>
15. Simkin A.J., Kapoor L., Doss C.G.P., Hofmann T.A., Lawson T., Ramamoorthy S. The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta // *Photosynth. Res*. 2022. V. 152. P. 23.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-021-00892-6>
16. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // *Annu. Rev. Plant Biol*. 2005. V. 56. P. 165.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
17. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // *Subcell. Biochem*. 2016. V. 79. P. 35.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2)
18. Dhar M.K., Mishra S., Bhat A., Chib S., Kaul S. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism // *Brief. Funct. Genomics*. 2020. V. 19. P. 1.  
<https://doi.org/10.1093/bfpg/elz037>
19. Hayes K.R., Beatty M., Meng X., Simmons C.R., Habben J.E., Danilevskaya O.N. Maize global transcriptomics reveals pervasive leaf diurnal rhythms but rhythms in developing ears are largely limited to the core oscillator // *PLoS One*. 2020. V. 5 P. e12887.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012887>
20. Khan S., Rowe S.C., Harmon F.G. Coordination of the maize transcriptome by a conserved circadian clock // *BMC Plant Biol*. 2010. V. 10: 126.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-126>
21. Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., Sanchez G.J., Buckler E., Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 6080.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
22. Chen Q., Zhong H., Fan X.W., Li Y.Z. An insight into the sensitivity of maize to photoperiod changes under controlled conditions // *Plant Cell Environ*. 2015. V. 38. P. 1479.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12361>
23. Bendix C., Mendoza J.M., Stanley D.N., Meeley R., Harmon F.G. The circadian clock-associated gene *gigantea1* affects maize developmental transitions // *Plant Cell Environ*. 2013. V. 36. P. 1379.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12067>
24. Li Z., Gao F., Liu Y., Abou-Elwafa S.F., Qi J., Pan H., Hu X., Ren Z., Zeng H., Liu Z., Zhang D., Xi Z., Liu T., Chen Y., Su H., Xiong S., Ku L. ZmG12 regulates flowering time through multiple flower development pathways in maize // *Plant Sci*. 2023. V. 332: 111701.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111701>

25. Cazzonelli C.I., Pogson B.J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 266.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
26. Gallagher C.E., Matthews P.D., Li F., Wurtzel E.T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (Poaceae) // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1776.  
<https://doi.org/10.1104/pp.104.039818>
27. 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.  
<https://doi.org/10.1104/pp.107.111120>
28. Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., Wurtzel E.T. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1334.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.122119>
29. Welsch R., Zhou X., Koschmieder J., Schlossarek T., Yuan H., Sun T., Li L. Characterization of cauliflower OR mutant variants // Front. Plant Sci. 2020. V. 10. P. 1.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01716>,
30. Kim S.-E., Lee C.-J., Park S.-U., Lim Y.-H., Park W.S., Kim H.-J., Ahn M.J., Kwak S.S., Kim H.S. Overexpression of the golden SNP-carrying orange gene enhances carotenoid accumulation and heat stress tolerance in sweetpotato plants // Antioxidants. 2021. V. 10: 51.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10010051>
31. Yazdani M., Croen M.G., Fish T.L., Thannhauser T.W., Ahner B.A. Overexpression of native ORANGE (OR) and OR mutant protein in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances carotenoid and ABA accumulation and increases resistance to abiotic stress // Metab. Eng. 2021. V. 68. P. 94.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.09.006>
32. Lopez A.B., Van Eck J., Conlin B.J., Paolillo D.J., O'Neill J., Li L. Effect of the cauliflower Or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 213.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm299>
33. Berman J., Zorrilla-López U., Medina V., Farré G., Sandmann G., Capell T., Christou P., Zhu C. The *Arabidopsis* ORANGE (*AtOR*) gene promotes carotenoid accumulation in transgenic corn hybrids derived from parental lines with limited carotenoid pools // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 933.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-017-2126-z>
34. Zunjare R.U., Hossain F., Muthusamy V., Baveja A., Chauhan H.S., Bhat J.S., Thirunavukkarasu N., Saha S., Gupta H.S. Development of biofortified maize hybrids through marker-assisted stacking of  $\beta$ -Carotene Hydroxylase, Lycopene- $\epsilon$ -Cyclase and Opaque2 genes // Front. Plant Sci. 2018. V. 9: 178.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00178>
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. V. 9: 1169.  
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
36. Li J., Lu Y., Chen H., Wang L., Wang S., Guo X., Cheng X. Effect of photoperiod on vitamin E and carotenoid biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) sprouts // Food Chem. 2021. V. 358: 129915.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129915>
37. Kanyanja G.E., Ibrahim I.M., Puthiyaveetil S. Regulation of Phaeodactylum plastid gene transcription by redox, light, and circadian signals // Photosynth. Res. 2021. V. 147. P. 317.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-020-00811-1>
38. Sun T.H., Liu C.Q., Hui Y.Y., Wu W.K., Zhou Z.G., Lu S. Coordinated regulation of gene expression for carotenoid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. P. 868.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00993.x>
39. Pupillo P., Sparla F., Melandri B.A., Trost P. The circadian night depression of photosynthesis analyzed in a herb, *Pulmonaria vallisarsae*. Day/night quantitative relationships // Photosynth. Res. 2022. V. 154. P. 143.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-022-00956-1>
40. Vedalankar P., Tripathy B.C. Evolution of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase // Proto-plasma. 2019. V. 256. P. 293.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1317-y>