

ТИМЧУК Д. С.^{1✉}, ПОТАПЕНКО Г. С.², ТИМЧУК Н. Ф.³, МУЖИЛКО В. В.⁴¹ Харківський інститут медицини та біомедичних наук ПВНЗ «Київський медичний університет», Україна, 61002, м. Харків, вул. Садова, 11, e-mail: info@kmi.edu.ua² Харківський національний педагогічний університет ім. Г. С. Сковороди, Україна, 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 2, e-mail: rector@hnpu.edu.ua³ Харківський національний медичний університет, Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, e-mail: medbio@online.ua⁴ Науково-дослідна селекційна станція «НАСКО», Україна, 74900, м. Нова Каховка, Херсонська область, вул. Горького, 40, e-mail: agrosvit-farm@gmail.com

✉ tym1952@ukr.net, (095) 188-22-63, (057) 702-08-71

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ОЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ В ОЛЯХ МУТАНТІВ КУКУРУДЗИ SUGARY-2

Мета. Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації кукурудзи *su₂*. **Методи.** Дослідження виконували на вибірці неспоріднених ліній – носіїв мутації *su₂*, гібридизацію яких здійснювали шляхом діалельних і топ-кросних скрещувань. Аналіз жирнокислотного складу олії проводили модифікованим газо-хроматографічним методом Пейскера. **Результати.** Встановлено, що мутанти кукурудзи *su₂* вирізняються підвищеним вмістом олеату порівняно з кукурудзою звичайного типу і ця ознака має кількісну природу. Лінії – носії мутації *su₂* – були суттєво відмінні між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату. Його успадкування здійснювалося за типом неповного домінування з суттєвим внеском до дисперсії адитивних ефектів. **Висновки.** У кукурудзи вірогідним є просторове зчеплення в шостій хромосомі локусу *su₂* з олеат-кодуючим локусом, ефект якого може модифікуватися полігенним комплексом.

Ключові слова: *Zea mays* L., мутація *su₂*, олеїнова кислота, генетичний аналіз.

Високоолеїнові кукурудзяні олії вирізняються високими технологічними властивостями і викликають позитивний поліфункціональний ефект під час використання в якості харчового продукту і лікувального засобу [1, 2]. Однак кукурудза звичайного типу не має достатньо високого вмісту гліцеридів олеїнової кислоти [3]. Тому виникає необхідність його підвищення і найбільш результативним методом вирішення цієї проблеми вважається використання природного генетичного різноманіття культури.

Отримані на сьогодні оцінки систем генетичної регуляції вмісту олеату в кукурудзяній олії дуже суперечливі. Одні автори вважають, що високий вміст олеату контролюється за моногенним типом [4], тоді як іншими авторами доведено полігенний тип генетичного контролю ознаки [5]. При цьому припускається, що локуси або кластери локусів із найбільш суттєвим ефектом за вмістом олеату локалізовані принаймні в чотирьох хромосомах [6].

Відомо, що один з основних олеат-кодуючих локусів розташований у четвертій хромосомі [7] і просторово зчеплений із мутантним геном *sugary-1*, який викликає зморшкуватий фенотип зерна [8]. Отримані нами результати [9] підтверджують ці висновки, але доповнюють їх тим, що ефект олеат-кодуючого локусу четвертої хромосоми сумується з ефектом полігенного комплексу, у зв'язку з чим генетично зумовлений рівень вмісту олеату у різних носіїв мутації *su₁* суттєво коливається.

Є відомості, що інший олеат-кодуючий локус у кукурудзи може знаходитися в шостій хромосомі [10–12]. І, на відміну від олеат-кодуючого локусу четвертої хромосоми, у нього встановлено молекулярний механізм підвищення вмісту олеату [13]. Однак у проведених дослідженнях не встановлено, чи є зміна вмісту олеату наслідком плейотропного ефекту мутації шостої хромосоми *su₂*, чи, як і у випадку з мутацією *su₁*, в шостій хромосомі існує просторове зчеплення олеат-кодуючого локусу з локусом *su₂*. Окрім цього, не визначено можливості модифікації ефекту олеат-кодуючого локусу шостої хромосоми полігенним комплексом.

© ТИМЧУК Д. С., ПОТАПЕНКО Г. С., ТИМЧУК Н. Ф., МУЖИЛКО В. В.

Ці непорозуміння і викликали необхідність проведення наших досліджень, метою яких був генетичний аналіз вмісту олеату у мутантів кукурудзи *su₂*.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень послуговували 10 неспоріднених за походженням ліній кукурудзи на основі мутації *su₂* і 10 ліній звичайного типу, які використовувалися в якості контролів. Ефект мутації *su₂* за вмістом олеату оцінювали шляхом порівняння рівнів ознаки у зерна із звичайним та мутантним фенотипами, виділених з одного качана гібридів *F₂* від топ-кросних схрещувань звичайних ліній і ліній-носіїв мутації *su₂*. Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації *su₂* проводили в діалельній схемі їх схрещувань другого методу Гріфінга з використанням алгоритму Хеймана. Всі експерименти здійснювалися протягом двох років.

Вирощування ліній та гібридів проводили на дослідній селекційній станції «НАСКО», розташованій у зоні Степу України, в умовах зрошення згідно із загальноприйнятими методиками польового експерименту [14]. Для біохімічного аналізу використовували матеріал тільки від контрольованого запилення. Аналіз жирнокислотного складу олії проводили газохроматографічним методом Пейскера [15]. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали методами дисперсійного, багатовимірного, діалельного та топ-кросного аналізів [16, 17].

Результати та обговорення

Результати проведених досліджень підтвердили, що мутанти *su₂* відрізняються від кукурудзи звичайного типу більш високим вмістом гліцеридів олеїнової кислоти в олії. Проаналізовані лінії-носії мутації *su₂* переважали за цим показником звичайну кукурудзу в середньому на 42,3 % (табл. 1)

Таблиця 1. Вміст гліцеридів олеїнової кислоти в оліях зерна інбредних ліній кукурудзи звичайного типу і ліній – носіїв мутації *su₂* % (результати дворічних оцінок 10 неспоріднених за походженням ліній кожного типу)

Типи ліній	Середня групова ($\bar{x} \pm s_x$)	Розмах мінливості (мін. – макс.)	Коефіцієнт варіації ($V \pm s_v$)
Звичайні	25,3	21,9 – 28,1	8,3 ± 1,9
Носії мутації <i>su₂</i>	36,0	30,7 – 41,5	10,8 ± 2,4
НІР _{0,95}	2,9		

Порівняння вмісту олеату в оліях зерна гібрида *F₂*, отриманого з одного самозапилення качана, із звичайним та мутантним фенотипами може розглядатися як свідчення того, що підвищення вмісту олеату викликає саме рецесивний ген *su₂* або група зчеплення, в якій він локалізований (табл. 2).

Припущення щодо існування плейотропного ефекту мутації *su₂* за вмістом олеату є маловірогідним. Відомо, що мутантний ген *su₂* контролює активність однієї з ізоформ розчинної крохмаль-синтази, яка каталізує утворення крохмалю [18]. Навпаки, підвищення вмісту олеату виникає внаслідок зниження активності десатурази *FAD-2*, яка каталізує конверсію олеїнової кислоти в лінолеву [19]. Метаболічного взаємозв'язку між цими процесами і ферментами, які їх каталізують, не встановлено.

Тому, швидше за все, причиною підвищення вмісту олеату у носіїв мутації *su₂* є просторове зчеплення локусу *su₂* з олеат-кодуєчим локусом. Переважна більшість проаналізованих нами ліній із зморшкватим скловидним фенотипом зерна, типовим для мутації *su₂*, вирізнялася суттєво підвищеним порівняно із лініями звичайної кукурудзи вмістом олеату.

Однак поряд із цим було встановлено також існування ліній – носіїв мутації *su₂* з низьким вмістом олеату, близьким до звичайної кукурудзи (27–29%), і, навпаки, ліній кукурудзи звичайного типу з підвищеним вмістом олеату, схожим до носіїв мутації *su₂* (34–41 %). І наявність таких ліній цілком можна пояснити ефектом кросоверного розподілу локусу *su₂* та олеат-кодуєчого локусу з однієї групи зчеплення.

Отримані результати також показали, що вміст олеату у різних ліній на основі мутації *su₂* має кількісний характер і вирізняється безперервною мінливістю (принаймні в межах 27–37 %), яка свідчить про полігенну природу ознаки.

Таблиця 2. Вміст гліцеридів олеїнової кислоти в оліях зерна з різними фенотипами у гібридів F_2 , отриманих у топ-кросних схрещуваннях інбредних ліній звичайного типу з лініями – носіями мутації su_2 , % (середнє за два роки випробувань)

Гібридні комбінації	Фенотипи зерна	
	Звичайний (генотипи Su_2Su_2 та Su_2su_2)	Зморшкуватий (генотипи su_2su_2)
T-22 x AC-43 su_2	26,6	32,7
T- 22 x AC-32 su_2	25,7	33,9
P-346 x AC-43 su_2	24,9	34,4
P-346 x AC-32 su_2	25,4	34,2
P-523 x AC-43 su_2	26,2	34,8
P-523 x AC-32 su_2	26,7	34,3
F-115 x AC-43 su_2	26,5	35,2
F-115 x AC-32 su_2	27,2	36,4
Середні групові	26,2	34,5
НІР _{0,95}	0,6	

У діалельних схрещуваннях ліній на основі мутації su_2 було встановлено, що вони дуже різняться між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату. Варіанса загальної комбінаційної здатності виявилася значно вищою від варіанси специфічної комбінаційної здатності, що може розглядатися як свідчення переважання адитивних ефектів над ефектами домінування в регуляції ознаки. Оцінка отриманих результатів із застосуванням алгоритму Хеймана показала, що характер генетичної регуляції вмісту олеату у носіїв мутації su_2 наближається до адитивно-домінантної моделі, а успадкування ознаки здійснюється за типом неповного домінування з переважним внеском до дисперсії адитивних ефектів (табл. 3).

Таким чином, отримані результати свідчать, що ефект олеат-кодуючого локусу 6 хромосоми може модифікуватися полігенними

комплексами, розташованими як в цій же, так і в інших хромосомах, здатних вільно комбінуватися під час інцухту та доборів. Такий тип генетичної регуляції вмісту олеату в зерні носіїв мутації su_2 створює сприятливі можливості практичного поліпшення ознаки.

У ході реалізації топ-кросної схеми схрещувань ліній звичайного типу з двома тестерами – носіями рецесивних гомозигот su_2su_2 з різним вмістом олеату – було встановлено суттєві відмінності тестерів за ефектами комбінаційної здатності. Визначено також, що більш високий вміст олеату властивий гібридам F_1 , у яких обидві батьківські форми мали достатньо високий рівень ознаки. Як правило, під час скрещування ліній із різним алельним станом локусу Su_2 рівень вмісту олеату у гібридів F_1 був проміжним між батьківськими формами і ухилився до гіршої з них.

Таблиця 3. Комбінаційна здатність ліній кукурудзи – носіїв мутації su_2 – і генетичні компоненти дисперсії за вмістом олеїнової кислоти в оліях (результати дворічних випробувань ліній і гібридів діалельної схеми схрещувань)

Лінії	Ефекти ЗКЗ	Варіанси СКЗ
AC-28 su_2	-1,63	2,07
AC-13 su_2	0,87	2,01
AC-44 su_2	-0,67	2,19
AC-32 su_2	2,51	0,64
AC-37 su_2	-2,60	2,62
AC-70 su_2	1,52	0,61
НІР _{0,95}	0,87	
H1/D	0,52	
A	3,85	
B	0,73	

Це цілком пояснюється тим, що в схрещуваннях такого типу в гетерозиготний стан переходить не тільки локус su_2 , але й зчеплений із ним олеат-кодуючий локус, і, тому вміст олеату знижується.

Поряд із цим встановлено, що в наступних поколіннях гібридів трапляються особини звичайного типу з вмістом олеату, суттєво підвищеним порівняно з батьківською формою – носієм домінантних гомозигот Su_2Su_2 , а інколи – і порівняно з батьківською формою – носієм рецесивних гомозигот su_2su_2 .

В іншій топ-кросній схемі схрещувань аналізувалися гібриди кукурудзи звичайного типу з двома високоолеїновими тестерами, один із яких був носієм домінантних гомозигот Su_2 , а інший – рецесивних. У цьому випадку більш високі ефекти комбінаційної здатності показав тестер – носій домінантних гомозигот, і в старших поколіннях гібридів такого типу проявлялися, хоча і з низькою частотою, сім'ї, які за рівнем вмісту олеату перевищували кращу батьківську форму гібридної комбінації.

Результати попередніх досліджень свідчать також і про можливість підвищення вмісту олеату в олії кукурудзи за рахунок сукупного використання ефекту олеат-кодуючих локусів, зчеплених із локусом Su_1 в четвертій хромосомі і локусом Su_2 – в шостій. За неалельних взаємодій мутантних генів su_1 та su_2 інколи спостерігалося підвищення вмісту олеату до рівня, який

перевищував аналогічний показник не тільки звичайної кукурудзи, але й носіїв зазначених вище моногенних крохмаль-модифікуючих мутацій. Однак частоти вищеплення таких форм у носіїв комбінацій мутантних генів su_1 та su_2 були дуже низькими. Є підстави пов'язувати отримані результати з кросверним розподілом між олеат-кодуючими локусами четвертої та шостої хромосом і локусами su_1 та su_2 .

Висновки

Встановлено, що носії мутації кукурудзи su_2 вирізняються підвищеним вмістом олеату порівняно з кукурудзою звичайного типу і ця ознака має кількісну природу. Лінії – носії мутації su_2 – суттєво відмінні між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату, причому варіанса загальної комбінаційної здатності значно вища, ніж варіанса специфічної комбінаційної здатності. Успадкування вмісту олеату у носіїв мутації кукурудзи su_2 здійснюється за типом неповного домінування з суттєвим внеском до дисперсії адитивних ефектів. Отримані результати свідчать про наявність просторового зчеплення в шостій хромосомі локусу su_2 з олеат-кодуючим локусом, ефект якого може модифікуватися полігенним комплексом. Однак це зчеплення не настільки тісне, щоб унеможливити кросверний розподіл олеат-кодуючого локусу та локусу su_2 .

References

1. Warner K., Knowlton S. Frying quality and oxidative stability of high – oleic corn oils. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 1997. Vol. 74. P. 1317–1322. doi: 10.1007/s11746-997-0063-7.
2. Pravst I. Oleic acid and its potential health effects. *Oleic acid. Production, uses and potential health effects: monograph* / L. Whelan Ed. New-York: Nova Sci. Publ. Inc., 2014. Cpt. 3. P. 35–54.
3. Lee E.A. Maize for oil. *Oil crops: monograph* / J. Vollmann, I. Raican Eds. Dordrecht – Heidelberg – London – New-York: Springer Sci., 2009. Chpt. 17. P. 493–506. doi: 10.1007/978-0-387-77594-4.
4. Whight A. A gene conditioning high oleic maize oil, OCL1. *Maydica*. 1995. Vol. 40. P. 85–88.
5. Alrefai R., Berke T.G., Rocheford T.R. Quantitative trait locus analysis of fatty acid concentrations in maize. *Genome*. 1995. Vol. 38. P. 894–901. doi: 10.1139/g95-118.
6. Motto M., Balconi C., Hartings H., Rossi V. Gene discovery for improvement of kernel quality - related traits in maize. *Genetika*. 2010. Vol. 42. P. 23–56. doi: 10.2298/GENSR1001023M.
7. Belo A., Zheng P., Luck S., Shen B., Meyer D.J., Li B., Tingey S., Rafalski A. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol. Gen. Genomics*. 2008. Vol. 279. P. 1–10. doi: 10.1007/s00438-007-0289-y.
8. Neuffer M.G., Coe E.H., Wessler S.R. Mutants of maize: monograph. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1997. 468 p.
9. Tymchuk D.S., Potapenko G.S., Tymchuk N.F., Muzhilko V.V. Genetic analysis of oleic acid content in the oil of maize on the basis of mutation sugary-1. *Factory eksperymental'noi evoliutsii orhanizmv: zbirnyk naukovykh prats'* / V.A. Kunakh (holov. red.) [ta in.]. Kyiv: Ukrains'ke tovarystvo henetykiv i selektsioneriv im. M.I. Vavilova, 2018. T. 23. S. 137–142. [in Ukrainian] / Тимчук Д.С., Потапенко Г.С., Тимчук Н.Ф., Мужилко В.В. Генетичний аналіз вмісту олеїнової кислоти в олії кукурудзи на основі мутації sugary-1. *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць* / В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. К.: Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2018. Т. 23. С. 137–142.
10. Wassom J.J., Mikkelineni V., Bohn M.O., Rocheford T.R. QTL for fatty acid composition of maize kernel oil in Illinois High Oil x B73 backcross-derived lines. *Crop Sci.* 2008. Vol.48. P. 69–78. doi: 10.2135/cropsci2007.04.0208.

11. Val D.L., Schwartz S.H., Kerns M.R., Dierkman J. Development of high oil trait in maize. *Molecular genetic approaches to maize improvement: monograph* / A.L. Kriz, B.A. Larkins Eds. Berlin – Heidelberg: Springer – Verlag, 2009. P. 303–324. doi: 10.1007/978-3-540-68922-5-1.
12. Yang X., Guo Y., Yan J., Zhang J., Song T., Rocheford T., Li J.-S. Major and minor QTL and epistasis contribute to fatty acid compositions and oil concentration in high-oil maize. *Theor.Appl.Genet.* 2010. Vol. 120. P. 665–678. doi: 10.1007/s00122-009-1184-1.
13. Zheng P., Allen W.B., Roesler K., Williams M.E., Zhang S., Li J., Glassman K., Ranch J., Nubel D., Solawetz W., Bhattra-makki D., Llaca V., Deschamps S., Zhong G.Y., Tarczynski M.C., Shen B. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat.Genet.* 2008. Vol. 40. P. 367–372. doi: 10.1038/ng.85.
14. Dospikhov B.A. Technique of field experiment. Moskva. Agropromizdat, 1985. 351 s. [in Russian] / Доспихов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
15. Prokhorova M.I. Biochemical research methods. Leningrad: Khymia, 1982. 272 s. [in Russian] / Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Ленинград: Химия, 1982. 272 с.
16. Lakyn G.F. Biometrics. Moskva: Vysshaya shkola, 1973. 343 s. [in Russian] / Лакин Г.Ф. Биометрия. М: Высшая школа, 1973. 343 с.
17. Litun P.P., Proskurnin N.V. Genetics of quantitative traits: genetic crossings and genetic analysis. Kiev: UMVO, 1992. 96 s. [in Russian] / Литун П.П., Проскурнин Н.В. Генетика количественных признаков: генетические скрещивания и генетический анализ. К.: УМВО, 1992. 96 с.
18. Zhang X., Colleoni C., Ratushna V., Sirghie-Colleoni M., James M., Myers A. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol. Biol.* 2004. Vol. 54. P. 865–879. doi: 10.1007/s11103-004-0312-1.
19. Shanklin J., Cahoon E.B. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998. Vol. 49. P. 611–641. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.611.

TYMCHUK D. S.¹, POTAPENKO G. S.², TYMCHUK N. F.³, MUZHYLKO V. V.⁴

¹ Kharkiv Institute of Medicine and Biomedical Sciences PHEI «Kyiv Medical University», Ukraine, 61002, Kharkiv, Sadovaya str., 11, e-mail: info@kmu.edu.ua

² Kharkiv National Pedagogical University nd.a. G.S. Scovoroda, Ukraine, 61168, Kharkiv, Valentinovskaya str., 2, e-mail: rector@hnpu.edu.ua

³ Kharkiv National Medical University, Ukraine, 61022, Kharkiv, Nauki Ave., 4, e-mail: medbio@online.ua

⁴ NASCO Research Plant Breeding Station, Ukraine, 74900, Novaya Kakhovka, Kherson region, Gorkogo str., 40, e-mail: agrosvitfarm@gmail.com

GENETIC ANALYSIS OF OLEIC ACID CONTENT IN THE OILS OF MAIZE SUGARY-2 MUTANTS

Aim. Genetic analysis of oleate content in the carriers of maize mutation *su₂*. **Methods.** Experiments were performed on a series of unrelated inbreds – carriers of mutation *su₂* which were hybridized by the diallel and top – cross crossings. The analysis of the fatty acid composition of oil were carried out using a modified gas-chromatographic Peyskare method. **Results.** It was found, that *su₂* mutants were notable as having the increased content of oleate compared to the maize of usual type and this trait has a quantitative nature. The inbreds – carriers of *su₂* mutation were significantly differed in the the effects of combining abilities for the oleate content. The inheritance of oleate was carried out by the type of incomplete dominance with the prevailing contribution of additive effects to the variance. **Conclusions.** In the sixth maize chromosome it is very likely that there is a spatial linkage of the *su₂* and oleate- encoding locus, the effect of which can be modified by the polygenic complex.

Keywords: *Zea mays* L., mutation *su₂*, oleic acid, genetic analysis.