

ТИМЧУК Д.С.¹✉, ПОТАПЕНКО Г.С.², ТИМЧУК Н.Ф.³, МУЖИЛКО В.В.⁴

¹ Харківський інститут медицини і біомедичних наук ПВНЗ «Київський медичний університет», Україна, 01004, м. Київ, вул. Л. Толстого, 9, e-mail: info@kmi.edu.ua

² Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди, Україна, 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 2, e-mail: rector@hnpu.edu.ua

³ Харківський національний медичний університет, Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, e-mail: medbio@online.ua

⁴ Науково-дослідна селекційна станція «НАСКО», Україна, 74900, м. Нова Каховка, Херсонська область, вул. Горького, 40, e-mail: agrosvitfarm@gmail.com

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

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ОЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ В ОЛІЇ КУКУРУДЗИ НА ОСНОВІ МУТАЦІЇ SUGARY-1

Мета. Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації кукурудзи su_1 . **Методи.** Досліди проводилися на серії ліній-носіїв мутації su_1 , а також гібридів, отриманих за їх діалельних і топ-кросних скрещувань. **Результати.** Лінії – носії мутації su_1 відрізнялися від ліній звичайного типу підвищеним вмістом олеату, який успадковувався за типом неповного домінування з переважним внеском до дисперсії аддитивних ефектів. **Висновки.** Підвищення вмісту гліцеридів олеїнової кислоти у носіїв мутації su_1 є наслідком просторового зчеплення локуса su_1 з олеат-кодуючим локусом, ефект якого може модифікуватися полігенним комплексом.

Ключові слова: *Zea mays* L., мутація su_1 , олеїнова кислота, генетичний аналіз.

Кукурудзяні олії з високим вмістом гліцеридів олеїнової кислоти вирізняються термостабільністю і стійкістю до перекисного окислювання [1]. Окрім того, олії з високою часткою олеату спричиняють широкий поліфункціональний ефект профілактики і лікування поширених захворювань людини, зокрема серцево-судинних, гастро-ентерологічних, онкологічних, проктологічних і, можливо, діабетичних [2]. Тому кукурудзяні олії високоолеїнового типу можуть бути з успіхом використані в якості цінного харчового продукту як безпосереднього використання, так і пристосованого до термічної обробки [3, 4].

Слід, однак, зазначити, що кукурудза традиційного типу не є джерелом високого вмісту олеату [5] і потребує генетичного поліпшення за цією ознакою. Існують принаймні три основні експериментально підтверджені методи вирі-

шення цієї проблеми. Першим є використання технологій трансгенезу [6], другим – віддалена гібридизація з представниками роду *Tripsacum* L. [7] і третім – внутрішньовидова гібридизація [8]. І саме останній із зазначених методів є найбільш зручним, бо він не викликає необхідності вирішення проблем біобезпеки і позбавлений складнощів, пов'язаних із незбалансованістю хромосомних наборів партнерів гібридних комбінацій за віддаленої гібридизації.

Однак його застосування потребує встановлення систем генетичної регуляції високого вмісту олеату та ідентифікації його надійних джерел. Отримані за цією проблемою експериментальні результати дуже суперечливі. З одного боку, показано моногенний тип регуляції високого вмісту олеату у кукурудзи [9], а з іншого, встановлено, що ця ознака контролюється за полігенним типом [10]. Відомо також, що найбільш експресивні гени системи регуляції високого вмісту олеату локалізовано принаймні в чотирьох різних хромосомах [11].

Раніше ми повідомляли [12], що один із локусів, які контролюють високий вміст олеату, вірогідніше за все, розташований у четвертій хромосомі і просторово зчеплений з геном *sugary-1* (su_1), рецесивні алелі якого викликають утворення зморшкуватого фенотипу зерна [13].

Метою нашого дослідження було проведення генетичного аналізу вмісту олеату в системі регулярних схрещувань різних носіїв мутації su_1 і визначення можливостей їх використання для практичного поліпшення жирнокислотного складу кукурудзяної олії. За доступними нам відомостями, експериментальне вирішення цих завдань до цього часу не здійснювалося.

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

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували 10 неспоріднених за походженням інбредних ліній кукурудзи – носіїв мутації *su₁* і 10 ліній кукурудзи звичайного типу. Визначення суттєвості ефекту групи зчеплення мутантного гена *su₁* за вмістом олеату здійснювали шляхом порівняння вибірок зерна із звичайним та мутантним фенотипами, виділених з одного качана гібридів *F₂* від топ-кросних схрещувань ліній звичайного типу з лініями – носіями мутації *su₁*. Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації *su₁* проводили шляхом реалізації діалельної схеми їх схрещувань другого методу Гріфінга. Донорські властивості носіїв мутації *su₁* за вмістом олеату аналізували в ході реалізації схеми топ-кросних схрещувань ліній кукурудзи з двома тестерами звичайного типу з різним вмістом олеату і тестером – носієм мутації *su₁*. Всі експерименти здійснювалися протягом двох років.

Вирощування ліній та гібридів проводили на науково-дослідній селекційній станції «НА-СКО», розташованій в зоні Степу України, в умовах зрошення згідно із загальноприйнятою методикою польового експерименту [14]. Для біохімічного аналізу використовували матеріал тільки від контрольованого запилення. Аналіз жирнокислотного складу олії проводили модифікованим газо-хроматографічним методом Пейскера [15]. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали методом дисперсійного, багатовимірного, діалельного та топ-кросного аналізу [16, 17].

Результати та обговорення

Отримані результати підтвердили, що носії мутації *su₁* відрізняються від кукурудзи звичайного типу більш високим вмістом гліцеридів олеїнової кислоти в олії. В проаналізованих вибірках ліній носії мутації *su₁* переважали за цим

показником звичайну кукурудзу в середньому на 60,5% (табл. 1)

Порівняння результатів аналізу зерна гібридів *F₂* із звичайним та мутантним фенотипами, отриманими за самозапилення одного качана, свідчить про те, що підвищення вмісту олеату викликає саме рецесивний ген *su₁* або група зчеплення, в якій він локалізований (табл. 2).

Припущення про те, що підвищення вмісту олеату є наслідком безпосереднього плеiotропного ефекту моногенної мутації *su₁* видається малоімовірним. Відомо, що мутантний ген *su₁* контролює активність крохмалю – дерозгальжуючого ферменту, який каталізує утворення амілопектину [18], тоді як підвищення вмісту олеїнової кислоти виникає в результаті зниження активності її десатурації з утворенням лінолеату [19]. Метаболічного взаємозв'язку між цими процесами і ферментами, які їх каталізують, до цього часу не встановлено.

Тому найбільш вірогідною причиною підвищення вмісту олеату у носіїв мутації *su₁* є просторове зчеплення локусу *su₁* з олеаткодуючим локусом, наявність якого в 4 хромосомі вже знайшла експериментальне підтвердження [20]. Переважна більшість проаналізованих нами ліній із зморшкуватим фенотипом зерна, типовим для мутації *su₁*, вирізнялася суттєво підвищеним порівняно із лініями звичайної кукурудзи вмістом олеату.

Однак поряд із цим було встановлено й існування ліній – носіїв мутації *su₁* з низьким вмістом олеату, близьким до звичайної кукурудзи (наприклад, ліній МС-11 та МС-722), і, навпаки, ліній кукурудзи звичайного типу з високим вмістом олеату, схожим з носіями мутації *su₁* (наприклад, Гл.46-2 та М-223). Наявність ліній такого типу цілком можна пояснити ефектом кросверного розподілу локусу *su₁* та олеаткодуючого локусу з однієї групи зчеплення.

Таблиця 1. Вміст гліцеридів олеїнової кислоти в оліях зерна інбредних ліній кукурудзи звичайного типу і ліній – носіїв мутації *su₁*, % (результати оцінок 10 неспоріднених за походженням ліній кожного типу в 2011–2012 рр.)

| 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>su₁</i> | 40,6 | 38,3 – 43,5 | 4,1 ± 0,9 |
| НІР _{0,95} | 1,8 | | |

Таблиця 2. Вміст гліцеридів олеїнової кислоти в оліях зерна з різними фенотипами у гібридів F_2 , отриманих за схрещування інбредних ліній звичайного типу з лініями – носіями мутації su_1 , % (середнє за 2013–2014 рр.)

| Гібридні комбінації | Фенотипи зерна | |
|-----------------------|--|--|
| | Звичайний (генотипи Su_1Su_1 та Su_1su_1) | Зморшкуватий (генотипи su_1su_1) |
| T-22 x MC-719 su_1 | 26,2 | 34,6 |
| T- 22 x MC-58 su_1 | 29,7 | 35,1 |
| P-346 x MC-719 su_1 | 27,2 | 35,4 |
| P-346 x MC-58 su_1 | 28,0 | 36,5 |
| P-523 x MC-719 su_1 | 26,5 | 33,8 |
| P-523 x MC-58 su_1 | 27,5 | 37,4 |
| F-115 x MC-719 su_1 | 27,4 | 35,5 |
| F-115 x MC-58 su_1 | 28,2 | 37,2 |
| Середні групові | 27,6 | 35,7 |
| HP _{0,95} | 0,9 | |

Отримані в досліді результати показали також, що вміст олеату у неспоріднених за походженням ліній – носіїв мутації su_1 – не є фіксованим і вирізняється безперервною мінливістю, яка свідчить про полігенну природу ознаки.

Діалельні схрещування ліній – носіїв мутації su_1 – дозволили встановити, що характер генетичної регуляції вмісту олеату не цілком адекватний аддитивно-домінантній моделі Хеймана, а успадкування ознаки здійснюється за типом неповного домінування з переважним внеском до дисперсії аддитивних ефектів (табл. 3).

Таким чином, у досліді було встановлено, що ефект олеат-кодуючого локусу 4 хромосоми може модифікуватися і, зокрема, посилюватися полігенними комплексами, що розташовані як в цій же, так і в інших хромосомах і здатні вільно комбінуватися за інцухти та доборів, які проводяться в ході створення ліній. Такий тип генетичної регуляції вмісту олеату в зерні носіїв мутації su_1 створює сприятливі можливості для практичного поліпшення ознаки.

Батьківські форми реалізованої в досліді діалельної схеми схрещувань суттєво різнилися між собою за ефектами загальної (ЗКЗ) та специфічної (СКЗ) комбінаційної здатності щодо вмісту олеату, що дозволило виділити лінії з найбільш високими ефектами ЗКЗ та варіансами СКЗ для практичного використання в селекції.

Завершальний етап роботи передбачав

встановлення можливостей використання ліній – носіїв мутації su_1 – для створення високоолеїнових ліній кукурудзи із звичайним типом ендосперму.

У ході реалізації топ-кросної схеми схрещувань ліній звичайного типу з двома тестерами – носіями домінантних гомозигот Su_1Su_1 – і різним вмістом олеату, а також тестером – носієм рецесивних гомозигот su_1su_1 – було встановлено, що найбільш високими ефектами комбінаційної здатності вирізнявся високоолеїновий тестер звичайного типу, а найбільш низькими – низькоолеїновий тестер звичайного типу. Лінія – носій рецесивних гомозигот su_1su_1 – значно поступалася за донорськими властивостями високоолеїновому тестеру звичайного типу і наближалася за ними до низькоолеїнового тестера звичайного типу.

Ці результати можна пояснити тим, що за схрещування ліній із контрастним аallelним станом локусу Su_1 в гетерозиготний аallelний стан переходить не тільки цей, але й зчеплений із ним олеат – кодуючий локус. Однак домінування в групі зчеплення локусу Su_1 за вмістом олеату в F_1 , вірогідніше за все, є неповним, бо гібриди – носії гетерозигот Su_1su_1 – за цією ознакою у всіх випадках займали проміжне становище між лініями – носіями домінантних і рецесивних гомозигот – у цьому локусі, ухилившись за рівнем ознаки до гіршої батьківської форми.

Таблиця 3. Комбінаційна здатність ліній кукурудзи – носіїв мутації su_1 – і генетичні компоненти дисперсії за вмістом олеїнової кислоти в оліях (результати реалізації діалельної схеми схрещувань в 2013–2014 рр.)

| Лінії | Ефекти ЗКЗ | Варіанси СКЗ |
|---------------------|------------|--------------|
| МС-401 su_1 | -1,21 | 0,19 |
| МС-719 su_1 | -0,85 | 0,74 |
| МС-713 su_1 | 0,24 | -0,19 |
| МС-58 su_1 | 1,24 | 0,01 |
| МС-381 su_1 | 0,87 | 0,25 |
| МС-380 su_1 | -0,29 | -0,13 |
| НІР _{0,95} | 0,52 | |
| Н1/D | 0,56 | |
| a | 0,71 | |
| b | 0,66 | |

Дані про неповне домінування за вмістом олеату в локусі Su_1 відповідають результатам оцінки діалельної схеми схрещувань, однак вони не заперечують того, що неповне домінування в F_1 може бути також і наслідком ефекту полігенних комплексів.

Поряд із цим встановлено, що в наступних поколіннях гібридів між носіями домінантних і рецесивних гомозигот Su_1 трапляються, хоча і з невеликою частотою, особини звичайного типу з вмістом олеату, суттєво підвищеним порівняно з батьківською формою – носієм домінантних гомозигот Su_1Su_1 .

Висновки

Підтверджено наявність в 4 хромосомі кукурудзи зчепленого з локусом Su_1 олеат-

кодуючого локусу, який в стані рецесивної гомозиготи підвищує вміст олеату в олії на 60,5%. Ефект олеат-кодуючого локусу 4 хромосоми може модифікуватися і, зокрема, посилюватися полігенними комплексами, розташованими як в цій же, так і в інших хромосомах, здатних вільно комбінуватися. Успадкування вмісту олеату за схрещування між собою ліній – носіїв мутації su_1 – здійснюється за типом неповного домінування з переважним внеском до дисперсії аддитивних ефектів. Гібриди ліній звичайного типу з лініями – носіями як домінантних, так і рецесивних гомозигот Su_1 в F_1 – ухилиються до гіршої батьківської форми. В наступних поколіннях таких гібридів трапляються особини звичайного типу з суттєво підвищеним вмістом олеату порівняно з батьківською формою того ж типу.

Література

- 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.
- Pravst I. Oleic acid and its potential health effects. *Oleic acid. Production, uses and potential health effects: monography* / L. Whelan Ed. New-York: Nova Sci. Publ. Inc., 2014. Cpt. 3. P. 35–54.
- Choe E., Min D.B. Chemistry of deep – frying oils. *J. Food Sci.* 2007. Vol. 72. P. 77–86.
- Moreau R.A. Corn oil. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses: monography.* F.D. Gunstone Ed., 2nd ed. Chichester: Wiley & Blackwell, 2011. Chpt. 10. P. 273–289.
- Lee E.A. Maize for oil. *Oil crops: monography* / J. Vollmann, I. Raican Eds. Dordrecht – Heidelberg – London – New-York: Springer Sci., 2009. Chpt. 17. P. 493–506.
- Coughlan S.J., Kinney A. Transgenic plants as a sources of modified oils. *Plant biotechnology and transgenic plants: monography* / K.-M. Oksman – Caldentey, W. Barz Eds. New – York – Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. Chpt. 13. P. 316–332.
- Duvick S.A., Pollak L.M., Edwards J.W., White P.J. Altering the fatty acid composition of corn belt corn through tripsacum introgression. *Maydica.* 2006. Vol. 51. P. 409–416.
- White P.J., Pollak L.M., Duvick S. Improving the fatty acid composition of corn oil by using germplasm introgression. *Lipid Technol.* 2007. Vol. 19. P. 35–38.
- Whight A. A gene conditioning high oleic maize oil, OCL1. *Maydica.* 1995. Vol. 40. P. 85–88.
- 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.

11. 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.
12. Тимчук Д.С., Мужилко В.В., Тимчук С.М. Ефекти взаємодій неалельних генів структури ендосперму кукурудзи за жирнокислотним складом олії. *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць*. К.: Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2017. Т. 21. С. 205–209.
13. Neuffer M.G., Coe E.H., Wessler S.R. *Mutants of maize: monography*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1997. 468 p.
14. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
15. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л.: Химия, 1982. 272 с.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
17. Литун П.П., Проскурнин Н.В. Генетика количественных признаков: генетические скрещивания и генетический анализ: учебное пособие. К.: УМВО, 1992. 96 с.
18. Tetlow I.J., Morell M.K., Emes M.J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 2131–2145.
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.
20. 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.

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.
2. Pravst I. Oleic acid and its potential health effects. *Oleic acid. Production, uses and potential health effects: monography / L. Whelan Ed.* New-York: Nova Sci. Publ. Inc., 2014. Cpt. 3. P. 35–54.
3. Choe E., Min D.B. Chemistry of deep – frying oils. *J. Food Sci.* 2007. Vol. 72. P. 77–86.
4. Moreau R.A. Corn oil. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses: monography*. F.D. Gunstone Ed., 2nd ed. Chichester: Wiley & Blackwell, 2011. Chpt. 10. P. 273–289.
5. Lee E.A. Maize for oil. *Oil crops: monography / J. Vollmann, I. Raican Eds.* Dordrecht – Heidelberg – London – New-York: Springer Sci., 2009. Chpt. 17. P. 493–506.
6. Coughlan S.J., Kinney A. Transgenic plants as a sources of modified oils. *Plant biotechnology and transgenic plants: monography / K.-M. Oksman – Caldentey, W. Barz Eds.* New – York – Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. Chpt. 13. P. 316–332.
7. Duvick S.A., Pollak L.M., Edwards J.W., White P.J. Altering the fatty acid composition of corn belt corn through tripsacum introgression. *Maydica*. 2006. Vol. 51. P. 409–416.
8. White P.J., Pollak L.M., Duvick S. Improving the fatty acid composition of corn oil by using germplasm introgression. *Lipid Technol.* 2007. Vol. 19. P. 35–38.
9. Whight A. A gene conditioning high oleic maize oil, OCL1. *Maydica*. 1995. Vol. 40. P. 85–88.
10. 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.
11. 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.
12. Tymchuk D.S., Muzhylko V.V., Tymchuk S.M. Effects of interactions of non – allelic genes of maize endosperm structure on the oil fatty acid composition. *Факторы експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць*. Київ: Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2017. Т. 21. С. 205–209.
13. Neuffer M.G., Coe E.H., Wessler S.R. *Mutants of maize: monography*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1997. 468 p.
14. Dospekhov B.A. Technique of field experiment. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
15. Prokhorova M.Y. Methods of biochemical research. Л.: Химия, 1982. 272 с.
16. Lakyn H.F. Biometry. М.: Vishaiya shkola, 1973. 343 с.
17. Lytun P.P., Proskurnyn N.V. Genetics of quantitative traits: genetic crossing and genetic analysis: учебное пособие. Киев: УМВО, 1992. 96 с.
18. Tetlow I.J., Morell M.K., Emes M.J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 2131–2145.
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.
20. 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.

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, 01004, Kyiv, L. Tolstogo str., 9, e-mail: info@kmu.edu.ua

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

³ Kharkov 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 OIL OF MAIZE ON THE BASIS OF MUTATION SUGARY-1

Aim. Genetic analysis of oleate content in the carriers of maize mutation *su₁*. **Methods.** Experiments were conducted on a series of inbreds – carriers of mutation *su₁*, as well as hybrids derived from their diallel and top cross crossings. **Results.** Inbreds – carriers of mutation *su₁* were notable as having the increased content of oleate, which was inherited by the type of incomplete dominance with the prevailing contribution of additive effects to the variance. **Conclusions.** Increasing the content of the oleic acid glycerides in the carriers of mutation *su₁* caused by the spatial coupling of the locus *su₁* with the oleate – encoding locus, the effect of which can be modified by the polygenic complex.

Keywords: *Zea mays* L., mutation *su₁*, oleic acid, genetic analysis.