

ТИМЧУК Д.С.<sup>1✉</sup>, ПОТАПЕНКО Г.С.<sup>2</sup>, ТИМЧУК Н.Ф.<sup>3</sup>, ТОРЯНИК І.І.<sup>4</sup><sup>1</sup> Харківський інститут медицини та біомедичних наук ПВНЗ «Київський медичний університет», Україна, 61002, м. Харків, вул. Садова, 11, e-mail: info@kmi.edu.ua<sup>2</sup> Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди, Україна, 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 2, e-mail: rector@hnpri.edu.ua<sup>3</sup> Харківський національний медичний університет, Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, e-mail: medbio@online.ua<sup>4</sup> Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова, Україна, 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14/16, e-mail: kamish\_in@ukr.net

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

## ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ОЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ В ОЛІЯХ МУТАНТІВ КУКУРУДЗИ *AMYLOSE EXTENDER*

**Мета.** Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації кукурудзи *ae*. **Методи.** В дворічних дослідах аналізувалися 10 неспоріднених за походженням ліній-носіїв мутації *ae* і серія гібридів від їх діалельних і топ-кросних схрещувань. Аналіз жирнокислотного складу олії проводили модифікованим газо-хроматографічним методом Пейскера. **Результати.** Встановлено, що носії мутації кукурудзи *ae* вирізняються підвищеним вмістом олеату порівняно з кукурудзою звичайного типу, однак вміст олеату в оліях мутантів *ae* був нижчим, ніж у мутантів *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>*. Різні лінії-носії мутації *ae* розрізнялися між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату в олії. Успадкування вмісту олеату гібридами на основі мутації *ae* проходило за типом неповного домінування з суттєвим внеском до дисперсії адитивних ефектів. **Висновки.** У носіїв мутації кукурудзи *ae*, вірогідним є просторове зчеплення в п'ятій хромосомі локусу *ae* з олеат-кодуючим локусом, ефект якого модифікується полігенним комплексом.

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

Рослинні олії з високим вмістом олеїнової кислоти викликають суттєвий позитивний ефект профілактики і лікування ряду небезпечних хвороб, які пов'язані з перекисним окислюванням ліпідів [1-3]. І, оскільки основні олійні культури традиційного типу за виключенням, мабуть, тільки Оливи європейської (*Olea europaea*), високим вмістом олеату не вирізняються [4], виникає необхідність їх генетичного поліпшення за цією ознакою.

На даний час у найбільш поширених

олійних культур вдалося досягти значного підвищення вмісту олеату, яке здійснювалося методами індукованого мутагенезу або трансгенезу [5]. Поряд з цим відомо, що підвищення вмісту олеату може проводитися і шляхом використання природного генетичного різноманіття олійних культур. В цьому випадку на особливу увагу викликає кукурудза, у якої ідентифіковано серію моногенних ендоспермових мутацій, які достовірно регулюють біохімічний склад зерна [6]. Їх ефект щодо складу білків та вуглеводів зерна досліджено досить глибоко і він активно використовується в практичній селекції [7]. Навпаки, відомості про вплив ендоспермових мутацій на жирнокислотний склад олії і, зокрема, вміст в ній гліцеридів олеїнової кислоти дуже обмежені і суперечливі.

Показано, що високий вміст олеату контролюється за полігенним типом [8], причому локуси або кластери локусів з найбільш суттєвим ефектом за вмістом олеату локалізовано принаймні в чотирьох хромосомах [9].

Встановлено, що один з основних олеат-кодуючих локусів, вірогідніше за все, розташований у четвертій хромосомі [10], а інший – у шостій [11]. Отримані нами результати підтверджують ці висновки і доповнюють їх тим, що перший із зазначених локусів може бути просторово зчеплений з мутантним геном структури ендосперму *sugary-1 (su<sub>1</sub>)* [12], а інший – з мутантним геном *sugary-2 (su<sub>2</sub>)* [13]. Окрім того, отримані нами результати показали, що ефекти обох цих олеат-кодуючих локусів підсумовуються з ефектами полігенних комплексів, у зв'язку з чим генетично обумовлений рівень вмісту олеату у різних носіїв мутацій *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>* суттєво варіює.

© ТИМЧУК Д.С., ПОТАПЕНКО Г.С., ТИМЧУК Н.Ф., ТОРЯНИК І.І.

Є відомості про існування ще одного олеат-кодуєчого локусу в п'ятій хромосомі [14], в якій розташовано і мутантний ген структури ендосперму *amylose extender (ae)*. Однак цей висновок експериментального підтвердження поки не отримав. Окрім того в проведених дослідженнях не встановлено, який рівень підвищення вмісту олеату викликає мутантний ген *ae* і чи є підвищення вмісту олеату наслідком плейотропного ефекту цього гену або, як і у випадку з мутаціями *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>* існує просторове зчеплення олеат – кодуєчого локусу з локусом *ae*. Окрім того не визначено можливості модифікації ефекту олеат-кодуєчого локусу п'ятої хромосоми полігенним комплексом.

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

### Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були 10 неспоріднених за походженням ліній кукурудзи – носіїв мутації *ae* і 10 ліній звичайного типу, які використовувалися в якості контролей. Ефект мутації *ae* за вмістом олеату оцінювали шляхом порівняння рівнів ознаки у зерна із звичайним та мутантним фенотипами, виділених з одного качана гібридів  $F_2$  від топ-кросних схрещувань звичайних ліній і ліній-носіїв мутації *ae*. Генетичний аналіз вмісту олеату у носіїв мутації *ae* проводили в діалельній схемі 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 в зоні Степу України в умовах зрошення згідно загальноприйнятій методиці польового експерименту [15]. Для біохімічного аналізу використовували матеріал виключно від контрольованого запилення. Аналіз жирнокислотного складу олії проводили газо-хроматографічним методом Пейскера [16]. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали методами дисперсійного, багатовимірного, діалельного та топ-кросного аналізів [17, 18].

### Результати та обговорення

Результати досліджень показали, що лінії кукурудзи носіїв мутації *ae* відрізняються від ліній звичайного типу більш високим вмістом

гліцеридів олеїнової кислоти в олії. Проаналізовані лінії-носіїв мутації *ae* переважали за цим показником звичайну кукурудзу в середньому на 25,7% (табл. 1)

Порівняння вмісту олеату в оліях зерна  $F_2$  із звичайним та мутантним фенотипами, отриманого з одного самозапиленого качана, свідчить, що підвищення вмісту олеату у проаналізованих мутантних ліній викликає саме рецесивний ген *ae* або група зчеплення, в якій він локалізований (табл. 2).

Припущення про безпосередню регуляцію вмісту олеату мутантним геном *ae* уявляється маловірогідним. Відомо, що цей ген знижує активність крохмаль-розгалужуючого ферменту, який каталізує утворення амілопектину [18]. Навпаки, підвищення вмісту олеату виникає внаслідок зниження активності десатурази FAD-2, яка каталізує конверсію олеїнової кислоти в лінолеву [19]. Відомості про метаболічний взаємозв'язок цих процесів відсутні.

Тому, скоріше за все, причиною підвищення вмісту олеату у носіїв мутації *ae* є просторове зчеплення цього мутантного гену з олеат-кодуєчим локусом. Переважна більшість проаналізованих нами ліній-носіїв мутації *ae*, вирізнялася підвищеним вмістом олеату порівняно з лініями кукурудзи звичайного типу. Однак, поряд з цим, було встановлено і існування ліній-носіїв мутації *ae* з низьким вмістом олеату, близьким до звичайної кукурудзи (28–29%) і навпаки, ліній кукурудзи звичайного типу з підвищеним вмістом олеату, схожим з кращими за цією ознакою носіями мутації *ae* (до 36%). Наявність таких ліній цілком можна пояснити ефектом кросоверного розподілу локусу *ae* та олеат-кодуєчого локусу з однієї групи зчеплення.

Отримані результати показали також, що вміст олеату у різних ліній на основі мутації *ae* має кількісний характер і вирізняється безперервною мінливістю (принаймні в межах 29–35%), яка свідчить про полігенну природу ознаки.

У діалельних схрещуваннях ліній на основі мутації *ae* було встановлено, що вони дуже відмінні між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату. Варіанса загальної комбінаційної здатності виявилася значно вищою за варіансу специфічної комбінаційної здатності, що може розглядатися як свідчення переважання аддитивних ефектів над ефектами домінування в регуляції ознаки. Оцін-

ка отриманих результатів з застосуванням алгоритму Хеймана показала, що характер генетичної регуляції вмісту олеату у носіїв мутації *ae* 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 5 хромосоми може модифікуватися полігенними комплексами, розташованими як в цій же, так і інших хромосомах і здатними вільно комбінуватися при інцухті та доборах.

У ході дослідів було встановлено, що при гібридизації між собою ліній-носіїв рецесивних гомозигот *aeae* більш високий вміст олеату властивий гібридам  $F_1$ , у яких обидві батьківські форми мали достатньо високий рівень ознаки.

При скрещуванні ліній з різним алельним станом локуса *Ae* рівень вмісту олеату у гібридів  $F_1$  був проміжним між батьківськими формами і ухилився до гіршої з них. Такий тип успадкування цілком пояснюється тим, що у гібридів з генотипом *Aeae* в гетерозиготний стан переходить не тільки локус *ae*, але й зчеплений з ним олеат-кодуючий локус.

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

| Типи ліній              | Середня групова<br>( $\bar{x} \pm s_x$ ) | Розмах мінливості<br>(мін. – макс.) | Коефіцієнт варіації<br>( $V \pm s_v$ ) |
|-------------------------|--|-------------------------------------|--|
| Звичайні                | 25,3 ± 0,8                               | 21,9 – 28,1                         | 8,3 ± 1,9                              |
| Носії мутації <i>ae</i> | 31,8 ± 0,5                               | 29,3 – 35,4                         | 6,6 ± 1,5                              |
| НІР <sub>0,95</sub>     | 1,9                                      |                                     |  |

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

| Гібридні комбінації      | Фенотипи зерна                                      |                                      |
|--------------------------|---|--------------------------------------|
|                          | Звичайний<br>(генотипи <i>AeAe</i> та <i>Aeae</i> ) | Мутантний<br>(генотипи <i>aeae</i> ) |
| T-22 x AE-466 <i>ae</i>  | 25,8  | 28,6                                 |
| T- 22 x AE-748 <i>ae</i> | 25,3  | 27,8                                 |
| P-346 x AE-466 <i>ae</i> | 26,2  | 29,3                                 |
| P-346 x AE-748 <i>ae</i> | 26,5  | 30,5                                 |
| P-523 x AE-466 <i>ae</i> | 26,8  | 30,2                                 |
| P-523 x AE-748 <i>ae</i> | 26,1  | 29,7                                 |
| F-115 x AE-466 <i>ae</i> | 25,3  | 28,4                                 |
| F-115 x AE-748 <i>ae</i> | 24,7  | 28,9                                 |
| Середні групові          | 25,8  | 29,2                                 |
| НІР <sub>0,95</sub>      | 1,3   |                                      |

Таблиця 3. Результати генетичного аналізу вмісту олеїнової кислоти в оліях носіїв мутації кукурудзи *ae* в системі діалельних схрещувань (результати дворічних випробувань ліній та гібридів)

| Показники              | Значення   |          |              |         |
|------------------------|------------|----------|--------------|---------|
|                        | Ефекти ЗКЗ |          | Варіанси СКЗ |         |
|                        | найнижчий  | найвищий | найнижча     | найвища |
| Комбінаційна здатність | -0,84      | 1,21     | 0,69         | 2,37    |
| НІР <sub>0,95</sub>    | 0,63       |          |              |         |
| H1/D                   | 0,86       |          |              |         |
| a                      | 2,24       |          |              |         |
| b                      | 0,59       |          |              |         |

У старших поколіннях таких гібридів зустрічалися особини звичайного типу з вмістом олеату, суттєво підвищеним порівняно з батьківською формою цього ж типу. З іншого боку, в старших поколіннях гібридів від схрещувань типу *AeAe* х *aeae* нерідко спостерігалася поява сімей с фенотипом зерна, типовим для мутації *ae* і вмістом олеату на рівні кукурудзи звичайного типу.

Ці результати можуть розглядатися як свідчення донорських властивостей джерел мутації *ae* за вмістом олеату і можливості кросоверного розподілу цього мутантного гену з олеат-кодуючим локусом при гібридизації.

Результати попередніх досліджень підтвердили висновки інших авторів [9,14] про можливу локалізацію олеат-кодуючого локусу в п'ятій хромосомі, який може бути зчеплений з мутантним геном *ae*. За середнім вмістом олеату носії мутації *ae* поступалися носіям мутацій *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>*, які проявляють підвищений рівень цієї ознаки, підтверджений і в наших дослідженнях [12,13]. Однак це не виключає принципової можливості використання носіїв мутації *ae* для посилення ефекту олеат-кодуючих локусів четвертої та шостої хромосом, зчеплених з мутантними генами *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>*.

Результати попередніх досліджень свідчать, що носії генних комбінацій *su<sub>1</sub>ae* та

*su<sub>2</sub>ae* за вмістом олеату інколи перевищують аналогічний показник носіїв моногенних ендоспермових мутацій *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>*. І, скоріше за все, цей ефект виникає як результат підсумовування фенотипових ефектів олеат-кодуючих локусів, розташованих в різних хромосомах.

### Висновки

Встановлено, що носії мутації кукурудзи *ae* вирізняються підвищеним вмістом олеату порівняно з кукурудзою звичайного типу, однак вміст олеату в оліях мутантів *ae* нижчий, ніж у мутантів *su<sub>1</sub>* та *su<sub>2</sub>*. Різні лінії-носії мутації *ae* розрізнялися між собою за ефектами комбінаційної здатності щодо вмісту олеату в олії, причому варіанса загальної комбінаційної здатності була вище варіанси специфічної комбінаційної здатності. Успадкування вмісту олеату гібридами на основі мутації *ae* проходило за типом, подібним до неповного домінування з суттєвим внеском до дисперсії адитивних ефектів. Отримані результати свідчать про вірогідну наявність просторового зчеплення в п'ятій хромосомі локусу *ae* з олеат-кодуючим локусом, ефект якого може модифікуватися полігенним комплексом.

### References

1. Jackson V., Penumetcha M. Dietary oxidised lipids, health consequences and novel food technologies that thwart food lipid oxidation: an update. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 54. P. 1981–1988. doi: 10.1111/ijfs.14058.
2. Karakor K., Cam M. Effects of oleic acid. *Medical Sci. Discov.* 2015. Vol. 2. P. 125–132. doi: 10.17546/msd.25609.
3. 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.
4. Oil crops: monograph. J. Vollmann, I. Raican Eds. Dordrecht – Heidelberg – London – New-York: Springer Sci., 2009. 548 p. doi: 10.1007/978-0-387-77594-4.
5. Murphy D.J. Using modern plant breeding to improve the nutritional and technological qualities of oil crops. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids (OCL).* 2014. Vol. 21. D607. doi: 10.1051/ocl/2014038.
6. Hartings H., Fracassetti M., Motto M. Genetic enhancement of grain quality – related traits in maize. *Transgenic plants – advances and limitations: monograph.* Y.O. Ciftci Ed. Rijeka, Croatia – Shanghai, China: InTech, 2012. Cpt. 10. P. 191–218. doi: 10.13140/2.1.2561.5369.
7. Pajic Z. Breeding of maize types with specific traits at the Maize Research Institute, Zemun polje. *Genetika.* 2007. Vol. 39. P. 169–180. doi: 10.2298/GENSR0702169P.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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'.* Kyiv, 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*. К., 2018. Т. 23. С. 137–142.
13. Tymchuk D.S., Potapenko G.S., Tymchuk N.F., Muzhilko V.V. Genetic analysis of oleic acid content in the oil of maize mutants sugary-2. *Factory eksperymental'noi evoliutsii orhanizmv* : zbirnyk naukovykh prats'. Kyiv, 2019. T. 24. S. 172–176. [in Ukrainian] / Тимчук Д.С., Потапенко Г.С., Тимчук Н.Ф., Мужилко В.В. Генетичний аналіз вмісту олеїнової кислоти в оліях мутантів кукурудзи sugary-2. *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць*. К., 2019. Т. 24. С. 172–176.
  14. 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.
  15. Dospikhov B.A. Technique of field experiment. Moskva: Agropromizdat, 1985. 351 s. [in Russian] / Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
  16. Prokhorova M.I. Biochemical research methods. Leningrad: Khymia, 1982. 272 s. [in Russian] / Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Ленинград: Химия, 1982. 272 с.
  17. Laky G.F. Biometrics. Moskva: Vysshiaia shkola, 1990. 352 s. [in Russian] / Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
  18. 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.
  19. Shannon J.C., Garwood D.L., Boyer C.D. Genetics and physiology of starch development. *Starch Chemistry and Technology*. 3<sup>rd</sup> Ed. J. BeMiller, R. Whistler Eds. Amsterdam – Boston – Heidelberg – London – New-York – Oxford – Paris – San-Diego – San-Francisco – Singapore – Sydney – Tokyo: Acad. Press – Elsevier, 2009. Cpt. 3. P. 23–82.
  20. 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.<sup>1</sup>, POTAPENKO G.S.<sup>2</sup>, TYMCHUK N.F.<sup>3</sup>, TORIANYK I.I.<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup> Kharkiv National Medical University, Ukraine, 61022, Kharkiv, Nauky Ave., 4, e-mail: medbio@online.ua

<sup>4</sup> Institute of Microbiology and Immunology nd.a. I.I. Mechnikov, Ukraine, 61057, Kharkiv, Pushkinska str., 14/16, e-mail: kamish\_in@ukr.net

#### GENETIC ANALYSIS OF OLEIC ACID CONTENT IN THE OILS OF MAIZE MUTANTS AMYLOSE EXTENDER

**Aim.** Genetic analysis of oleate content in the carriers of maize mutation *ae*. **Methods.** In two-year experiments 10 unrelated on origin inbreds – carriers of *ae* mutation and a series of hybrids from their diallel and top-cross crossings were analysed. The analysis of the fatty acid composition of oil was carried out using a modified gas-chromatographic Peysker method. **Results.** It was found that the carriers of maize *ae* mutation are characterized by a higher oleate content compared to the maize of common type, however the oleate content in the oils of *ae* mutants was lower than that of the mutants *su*<sub>1</sub> and *su*<sub>2</sub>. The different inbreds – carriers of the *ae* mutation differed among themselves by the effects of the combining abilities for the oleate content in oil. The inheritance of oleate content by hybrids based on the *ae* mutation was similar to the type of incomplete dominance with a significant contribution of additive effects to the variance. **Conclusions.** In the carriers of *ae* maize mutation, the spatial linkage in the fifth chromosome of *ae* mutant gene with the oleate – encoding locus, the effect of which is modified by the polygenic complex, is likely. **Keywords:** *Zea mays* L., mutation *ae*, oleic acid, genetic analysis.