

***ЕКСПРЕСИВНІСТЬ МУТАНТНИХ ГЕНІВ СТРУКТУРИ
ЕНДОСПЕРМУ КУКУРУДЗИ ЗА ВМІСТОМ ТА ФРАКЦІЙНИМ
СКЛАДОМ КРОХМАЛЮ ПРОТЯГОМ РОЗВИТКУ НАСІННЯ***

С.Ю. Діденко

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН

Наведено результати вивчення особливостей накопичення крохмалю та амілози в крохмалі протягом розвитку насіння кукурудзи ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму (*wx* та *su2*) у порівнянні з лінією звичайної кукурудзи. Встановлено, що ефект мутації *wx* щодо блокування синтезу амілози в крохмалі є фіксованим і не залежить ані від загального генотипового середовища, ані від фази розвитку насіння.

Вміст крохмалю, амілоза, амілопектин, динаміка накопичення

Харчова, фармацевтична і технічні галузі промисловості відчувають гостру потребу в крохмалях із підвищеним вмістом амілози або амілопектину [1 - 8].

Найбільш ефективним методом створення гібридів кукурудзи з генетично обумовленим перерозподіленим співвідношенням сополімерів крохмалю вважається використання ефекту крохмальмодифікуючих мутантних генів (*wx*, та *su2*) [9 - 13]. Мутантний ген *wx* викликає, зокрема, утворення крохмалів, які майже на 100 % складаються з амілопектину, а мутантний ген *su2*, навпаки, підвищує вміст амілози в крохмалі до 50 % [14 - 18].

Метою наших досліджень було визначення характеру накопичення крохмалю та амілози в процесі досягання насіння ліній – носіїв мутантних генів *wx* та *su2*, а також експресивності крохмальмодифікуючих мутантних генів протягом розвитку насіння.

Матеріалом для досліджень в 2005 - 2007 рр. були 5 ліній - носіїв рецесивної гомозиготи *wx* (ВК - 11, ВК - 36, ВК - 38, ВК - 64 і ВК -69) та 5 ліній - носіїв рецесивних гомозигот *su2* (АС - 16, АС - 38, АС - 43, АС - 70 і АС - 92). За контроль використовували лінію ВІР - 44 із нормальним фенотипом насіння та звичайним співвідношенням структурних сополімерів крохмалю. Інтервал добору проб складав 10 діб, починаючи з 20 доби після запилення.

Вміст крохмалю в зерні аналізували поляриметричним методом Еверса, вміст амілози в крохмалі - колориметричним методом Джуліано [19].

Експериментальні результати свідчать, що вміст крохмалю в зерні ліній - носіїв мутантних генів *wx* і *su2* та в зерні контролю постійно зростає в процесі досягання, але цей процес має нелінійний характер. Основний приріст вмісту крохмалю у всіх ліній експериментального комплексу спостерігався на ранніх фазах розвитку насіння, а потім він поступово уповільнювався (рис. 1). Протягом усіх фаз розвитку насіння найбільшим вмістом крохмалю в зерні характеризувалась лінія звичайної кукурудзи ВІР - 44. Найбільш активний синтез крохмалю у неї проходив з 20 по 50 добу після запилення. З 20 по 30 добу після запилення вміст крохмалю в насінні збільшився на 12,5 %, в період з 30 по 40 добу – на 7,2 %, з 40 по 50 добу – на 4,4 %, а в період з 50 по 60 добу – лише на 1,4 %.

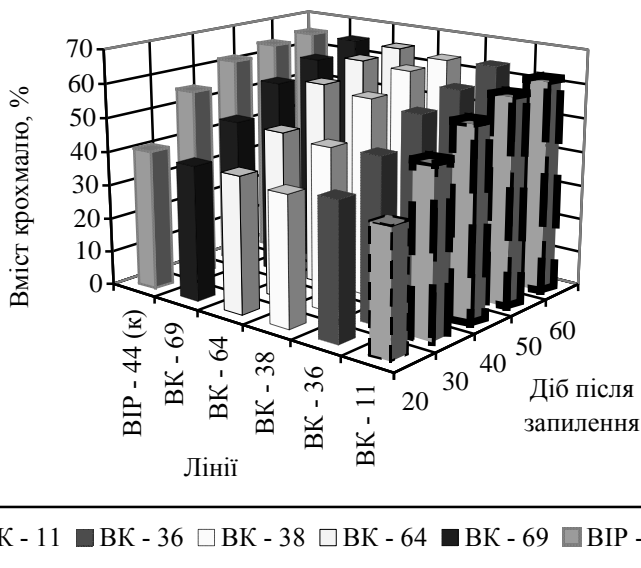


Рисунок 1. Динаміка змінення вмісту крохмалю в насінні ліній - носіїв мутації *wx* в процесі досягання (2005 – 2007 рр.)

Всі лінії восковидної кукурудзи за вмістом крохмалю в процесі досягання поступались контролю, але ці відмінності на різних фазах

розвитку були неоднакові (див. рис. 1). На 20 добу після запилення восковидні лінії мали на 1,0 – 4,7% менший вміст крохмалю в насінні, на 30 добу поступались контролю на 6,4 – 8,1%, на 40 добу – на 2,3 – 6,0%, а на 50 – на 0,4 – 4,4%. На 60 добу максимальні відмінності між восковидними та звичайною лінією становили 3,8 %, а лінія ВК - 69 за вмістом крохмалю в зерні повної стиглості практично дорівнювала контролю. Таким чином, найбільші відмінності між восковидними лініями та контролем спостерігались в період з 30 по 40 добу після запилення.

Лінії - носії рецесивних гомозигот wx за вмістом крохмалю розрізнялись між собою на всіх фазах розвитку насіння. На 20 добу після запилення ці відмінності досягали 3,7 %, на 30 добу – 1,7 %, на 40 добу – 3,7 %, на 50 добу – 4,0 %, а на 60 добу відмінності між лініями були на рівні 3,3 %.

Лінії – носії мутантного гену su2 проявили схожий характер накопичення крохмалю, однак на всіх фазах розвитку насіння його вміст у носіїв цієї мутації був нижчим, ніж у контролю та восковидних ліній (рис. 2). На 20 добу після запилення високоамілозні лінії мали на 8,4 – 19,8 % менший вміст крохмалю порівняно з контролем і на 7,4 – 15,1 % менший вміст крохмалю порівняно з лініями восковидної кукурудзи. На 30 добу лінії – носії мутації su2 за цим показником поступались контролю на 9,9 – 11,7 %, а восковидним лініям на 3,5 – 3,6 %, на 40 добу – відповідно на 11,7 – 14,0 % та 8 - 9,4 % %, на 50 добу після запилення відповідно на 7,1 – 9,4 % та 5,2 – 8,8 %, а на 60 добу високоамілозні лінії поступались за вмістом крохмалю контролю на 7,2 – 10,4 %, а восковидним лініям на 6,6 – 6,7 %.

Лінії – носії рецесивних гомозигот su2 на всіх фазах розвитку розрізнялись між собою за вмістом крохмалю. На 20 добу після запилення ці відмінності сягали 11,4 %, на 30 добу – 1,8 %, на 40 добу – 2,3 %, на 50 добу – 2,5 %, а на 60 добу – 3,2 %.

Особливої уваги заслуговує той факт, що при існуванні суттєвих генотипових відмінностей в межах експериментального комплексу, різниця за вмістом крохмалю в зерні у ліній - носіїв рецесивних гомозигот wx та su2 на всіх фазах розвитку насіння не перевищує помилки експерименту. Це підтверджує, що ефект моногенних локусів wx та su2 є значно більшим, ніж ефект полігенних комплексів, що регулюють вміст крохмалю.

Якщо характер накопичення крохмалю у звичайної кукурудзи та мутантів wx і su2 був принципово схожий, то змінення фракційного складу крохмалю протягом розвитку насіння кожного із зазначених типів кукурудзи виявилось дуже специфічним.

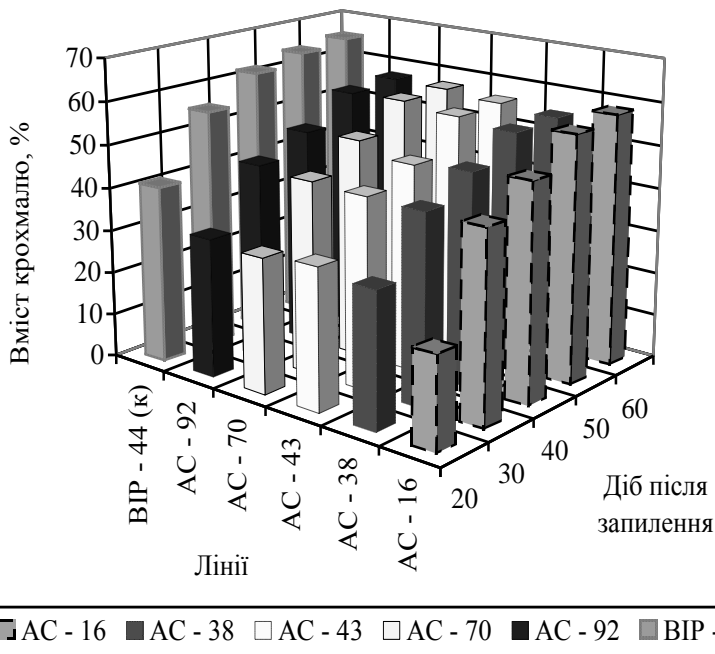


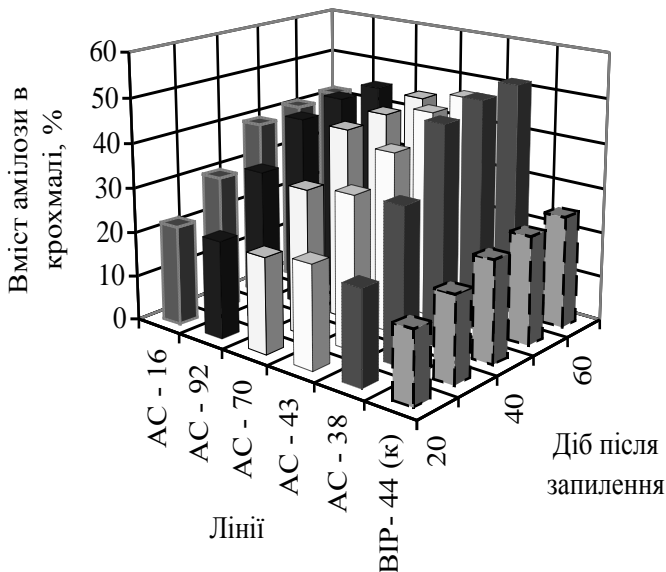
Рисунок 2. Вміст крохмалю в насінні ліній - носіїв мутації *su2* в процесі досягання (2005 - 2007 рр.)

У лінії звичайної кукурудзи (VIP - 44) вже на 20 добу після запилення вміст амілози в крохмалі становив 64 % від його вмісту у фазі повної стиглості. В період з 20 по 40 добу після запилення приріст вмісту амілози в крохмалі був майже лінійним (з 20 по 30 добу він збільшився на 3,1, а з 30 по 40 добу – на 3,5 %). Потім процес накопичення амілози в крохмалі зерна звичайної кукурудзи значно уповільнювався і з 40 по 50 добу становив 1,5 %, а з 50 по 60 – 0,9 % (рис. 3).

Динаміка змінення вмісту амілози в крохмалі носіїв мутантного гену *su2* та нормальної лінії VIP - 44 була схожою, але на всіх фазах розвитку насіння носії мутації *su2* характеризувались значно підвищеним вмістом амілози.

На 20 добу після запилення високоамілозні лінії мали на 5,0 – 6,9 % більший вміст амілози в крохмалі у порівнянні з контролем. На 30

добу лінії експериментальної вибірки перевищували його на 11,0 – 15,4 % на 40 добу – на 17,6 – 26,0 %, на 50 добу – на 17,1 – 27,0 %, а на 60 добу після запилення – на 17,0 – 27,0 %. Таким чином, максимальні відмінності за вмістом амілози в крохмалі між звичайною кукурудзою та високоамілозною спостерігались на 40 добу після запилення. Така тенденція зберігалася до повної стиглості зерна.



■ VIP- 44 (κ) ■ AS - 38 □ AC - 43 □ AC - 70 ■ AC - 92 ■ AC - 16

Рисунок 3. Динаміка вмісту амілози в крохмалі зерна ліній - носіїв мутації *su2* в процесі досягання (2005 – 2007 рр.)

Лінії – носії рецесивної гомозиготи *su2* на всіх фазах розвитку насіння суттєво розрізнялись між собою за вмістом амілози в крохмалі. З 20 дня після запилення ці відмінності досягали 1,9 %, на 30 добу – 4,4 %, на 40 добу – 9 %, на 50 – 9,9 %, а на 60 добу – 10,0 %. Це свідчить про наявність індивідуальної специфічності ліній кукурудзи на основі мутації *su2* за характером змінень фракційного складу крохмалю протягом розвитку насіння. Крім того, базуючись на цих даних можна зробити припущення, що існує взаємодія ефекту моногенного локусу *su2* з ефектом іншої, вірогідно полігенної системи. Однак, незважаючи на індивідуальну специфічність, всі лінії

високоамілозної кукурудзи експериментальної вибірки поєднували дві загальні особливості – тенденцію до зростання вмісту амілози в процесі розвитку насіння і нелінійний характер цього процесу. Отримані результати показали, що вміст амілози в крохмалі у носіїв мутації *su2* практично досягає максимуму вже на 40 – 50 добу після запилення, а після цього терміну змінюється дуже незначно.

Накопичення амілози в крохмалях носіїв рецесивної гомозиготи *wx* мало принципово інший характер. Насіння різних восковидних ліній на всіх етапах розвитку відрізнялось майже повною відсутністю амілози в крохмалі, а фактичні відмінності між варіантами досліду були значно меншими за похибку експерименту (рис. 4). Таким чином, ефект мутації *wx* щодо співвідношення лінійного та розгалуженого сополімерів крохмалю в процесі розвитку насіння може бути визнано фіксованим і практично незалежним ані від загального генотипового середовища, ані від фази розвитку насіння.

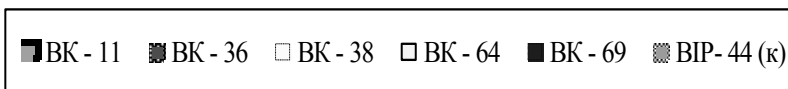
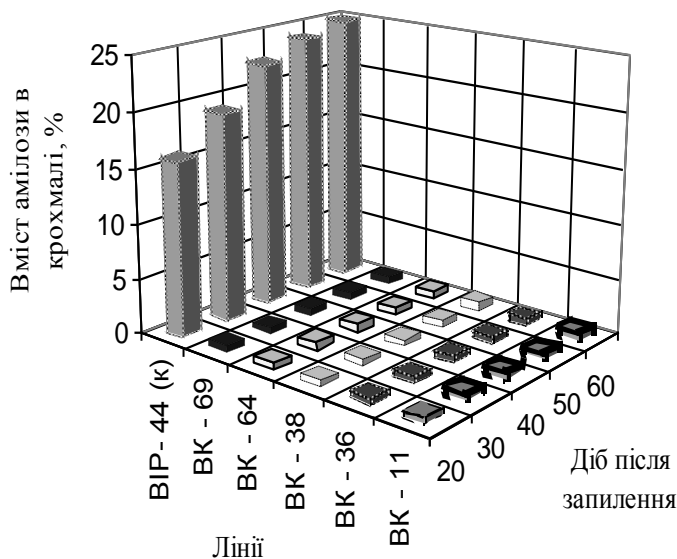


Рисунок 4. Динаміка вмісту амілози в крохмалі зерна ліній - носіїв мутації *wx* в процесі досягання (2005 – 2007 рр.)

При поясненні отриманих результатів ми виходимо з того, що локус *wx* контролює активність гранулозв'язаної крохмальсинтази, а локус *su2* – активність крохмальрозгалужуючого ферменту, причому, кожен з цих ферментів представлений принаймні кількома ізоформами [20, 7, 21, 22]. При цьому мутантний ген *wx* викликає неспецифічне блокування активності ізоформ гранулозв'язаної крохмаль-синтази, внаслідок чого на всіх фазах розвитку насіння утворюються крохмалі, що практично не містять амілози. При цьому в процесі розвитку насіння відсутня диференціальна експресія мутантного гену *wx*.

Навпаки, активність відомих ізоформ крохмальрозгалужуючого ферменту диференційно проявляється на різних етапах розвитку насіння. Одна ізоформа цього ферменту активна на ранніх етапах розвитку насіння, і саме її активність регулюють високоамілозні мутації, у всякому разі, мутація *su2*. Фенотиповим наслідком цього процесу є зниження інтенсивності утворення амілопектину і суттєве підвищення вмісту амілози в крохмалі. На більш пізніх етапах розвитку насіння активність виявляє інша ізоформа крохмальрозгалужуючого ферменту, тому після 40 дня після запилення вміст амілози в крохмалі мутантних ліній на основі рецесивних гомозигот *su2* підвищується незначно і ступінь цього “пізнього накопичення” у звичайної та високоамілозної кукурудзи приблизно однакова.

Ми припускаємо, що механізм дії мутантного гену *wx* протягом розвитку зерна складається в неспецифічному блокуванні активності гранулозв'язаної крохмальсинтази. При цьому диференціальна експресія мутантного гену *wx* за фракційним складом крохмалю в процесі розвитку зерна відсутня. Навпаки, мутантний ген *su2*, на нашу думку, викликає вибіркочу репресію першої ізоформи крохмальрозгалужуючого ферменту і його експресія у часі має диференціальний характер.

Бібліографічний список

1. *Hedley C.L., Bogracheva T.Ya., Lloyd J.R., Wang T.L.* Manipulation of starch composition and quality in pea seeds // *Agri-Food Quality: An Interdisciplinary Approach*; G.R.Fenwick, C.Hedley, R.L.Richardson, S.Khokhar Eds. - London: Royal Soc.Chem., 1996. - P. 138 - 148.
2. *Manners D.J.* Recent developments in our understanding of amylopectin structure // *Carbohydr.Polym.*- 1989.- Vol.11, №1.- P. 87 - 112.
3. *Thompson D.B.* On the non-random nature of amylopectin branching // *Carbohydr Polymers.* - 2000. - Vol.43. - P. 223-239.

4. *Gidley M.J., Bociek S.* Molecular organization in starches a13 C CP/MAS NMR study // *J.Amer.Chem.Soc.*- 1985.- Vol.107.- P. 7040-7044.
5. *Jenkins P.J., Cameron R.E., Donald A.M.* A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources // *Starch/Starce.* - 1993. - 45. - P. 417 - 420.
6. *French D.* Organization of starch granule // *Starch: Chemistry and technology*; R.I. *Whistler, J.N. BeMiller, E.F.* Parshall eds. - Orlando, Fl.; Academic Press, 1984. - P. 183 - 247.
7. *Denyer K., Johnson P., Zeeman S., Smimt A.* The control of amylase synthesis // *J. Plant Physiol.*- 2001.- Vol.158.- P. 479 - 487.
8. *Takeda J., Hizukuri S., Takeda C., Suzuki A.* Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molecular fractions of branched and unbranched molecules // *Carbohydr. Res.*- 1987.- Vol. 165.- P. 139 - 145.
9. *Takeda Y., Guan H.P., Preiss J.* Branching of amylose by branching isoenzymes of maize endosperm // *Carbohydr.Res.*- 1993.- Vol. 240.- P. 253-263.
10. *Ball S., M.H.D.J van der Wal, Visser R.G.F.* Progress in understanding the biosynthesis of amylose // *Trends Plant Sci.*- 1998.- Vol.3, №3.- P. 462 - 467.
11. *Whitt S.R., Wilson L.M., Tenailon M.I., Gaut B.S., Buckler E.S.* Genetic diversity and selection in maize starch pathway // *Proc.New-York Acad.Sci.*- 2002.- Vol.99, № 20. - P. 12959 - 12962.
12. *Boyer C.D., Preiss J.* Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases // *Plant Physiol.* - 1981.- Vol.67. - P. 1141 - 1145.
13. *Hylton C.M., Denyer K., Keeling P.L., Chang M.-T., Smith A.M.* The effect of waxy mutations of the granule-bound starch synthases of barley and maize endosperms // *Planta.*- 1996.- Vol. 198.- P. 230 - 237.
14. *Denyer K., Clarke B., Hylton C., Tatge H., Smith A.M.* The elongation of amylase and amylopectin chain in isolated starch granules // *Plant J.*- 1996. - № 10. - P. 1135 - 1143.
15. *Sun C., Sathish P., Ahlandsberg S., Jansson C.* Identification of four starch-branching enzymes in barley endosperm: partial purification of forms I, IIa and IIb // *New Phytol.* - 1997. - Vol.137. - P. 215 - 222.
16. *Morell M.K., Blennow A., Kosar-Hashemi B., Samuel M.S.* Differential expression and properties of starch-branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm // *Plant Physiol.*-1997.- Vol. 113.- P. 201-208.

17. *Morrell M.K., Rahman S., Abrahams S.L., Appels R.* The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals // *Aust.J.Plant Physiol.*- 1995.- Vol.22.- P. 647-660.
18. *Муку В.Е.* Спонтанные мутации кукурузы.- Кишинев: Штиинца, 1974. - 144 с.
19. Методы биохимического исследования растений / Под ред. *Ермакова А.И.*- Л.: Агропромиздат, 1987. - 430с.
20. *White P.* Properties of corn starch // *Specialty Corns*; A.R.Hallauer Ed.- Boca Raton, Fl.: CRC Press Inc., 1994.- P. 29 - 54.
21. *Martin C., Smith A.M.* Starch biosynthesis // *Plant Cell.*- 1995.- Vol. 7.- P. 971 – 985.
22. *Tsai C.Y.* The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm // *Biochem.Genet.*- 1974.- Vol. 11, № 1.- P. 83 - 96.

Приведены результаты изучения особенностей накопления крахмала и амилозы в крахмале в ходе развития семян кукурузы линий – носителей мутантных генов структуры эндосперма (wx и su2) в сравнении с линией обычной кукурузы. Установлено, что эффект мутации wx в отношении блокирования синтеза амилозы является фиксированным и не зависит ни от общей генотипической среды, ни от фазы развития семян.

The results of the study on starch and amylose accumulation during the development of seeds in corn lines – transmitters of mutant genes (wx and su2) in comparison with common an ordinary corn are presented in the article . It is set that the effect of mutation of wx in regard to blocking of synthesis of amylose is fixed and depends neither on a general genotypic environment nor on the phase of seed development.