УДК 633.16:631.527

О. І. РИБАЛКА, д. б. н., зав. від.,
З. В. ЩЕРБИНА, к. с.-г. н., пров. наук. співроб.
СГІ — НЦНС, Одеса
e-mail: rybalkaalexander@gmail.com, zoyasgi09@ukr.net

ПШЕНИЦЯ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ АМІЛОЗИ — НОВЕ СЛОВО В СЕЛЕКЦІЇ КУЛЬТУРИ

Пшеничний крохмаль є важливим джерелом енергії у харчуванні людини, а надто той, що містить підвищену кількість амілози. Існує висока кореляційна залежність між умістом амілози і резистентного крохмалю, який має доведений позитивний вплив на здоров'я людини, зокрема знижує ризик ожиріння і діабету. У статті наведено характеристики генетичних методів RNAi та TILLING, застосування яких дозволяє суттєво підвищити вміст амілози в зерні. Найефективнішим є метод RNAi — забезпечує зростання кількості амілози до більш ніж 70 %, що є радикальним шляхом поліпшення харчової цінності культури.

Ключові слова*: пшениця, дієтична клітковина, крохмаль, резистентний крохмаль, амілоза, амілопектин, ключові ферменти, біосинтез, RNAi, TILLING, харчова цінність.*

Вступ. Зерно пшениці містить до 70 % крохмалю, який є основним запасним вуглеводом і відіграє важливу роль у нашому харчуванні. До складу крохмалю входять два типи водонерозчинних гомоглюканів: 25–28 % амілози і 72–75 % амілопектину [1].

Амілоза — це лінійний полімер D-глюкопіранозил залишків глюкози, пов'язаних між собою α-(1,4)-зв'язками. Ступінь полімеризації амілози — у межах 500–6000 залишків глюкози з молекулярною масою 8×10^4–10^6. Амілопектин, як основний компонент натурального крохмалю, відповідає за гранулярну структуру останнього, містить від 30000 до 3000000 залишків глюкози і має значно вищу, ніж амілоза, молекулярну масу — 10^7–10^9. На відміну від лінійної амілози, амілопектин є полісахаридом з високим ступенем розгалуження і містить лінійні ланцюги α-(1,4)-D-глюкопіранози з численним боковим (через кожні 20–25 залишків глюкози) розгалуженням за рахунок α-(1,6)-глікозидних зв'язків, що їх називають точками гілкування амілопектину (рис.1, 2) [2]. Бокові відгалуження амілопектину розміщені упродовж молекулярної структури не випадково, а організовані у кластерні структури у формі A, B і C ланцюгів. Ланцюги A не містять жодних інших ланцюгів, вони з'єднані з ланцюгами B, які, своєю чергою, поєднані з ланцюгами C (рис. 2).

© Рибалка О. І., Щербина З. В., 2015

Амілоза і амілопектин, як складові крохмалю, упаковані в крохмальні гранули трьох типів: А тип — великі за розміром (10–20 мікрон у діаметрі) лінзоподібні гранули, що становлять 50 % загальної маси крохмалю; В тип — сферичні (< 10 мікрон) гранули і С тип — дрібні (< 10 мікрон), переважно нерегулярні за формою. Гранули В і С типів переважають серед усіх типів гранул за кількістю (> 90 %) [5].

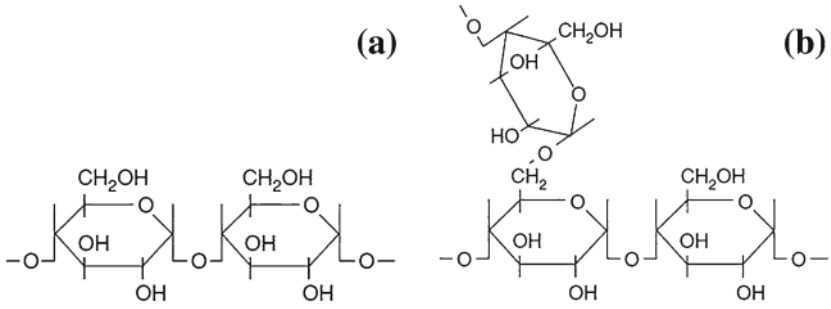

Рис. 1. Молекулярна структура амілози (а) і амілопектину (b) [3]

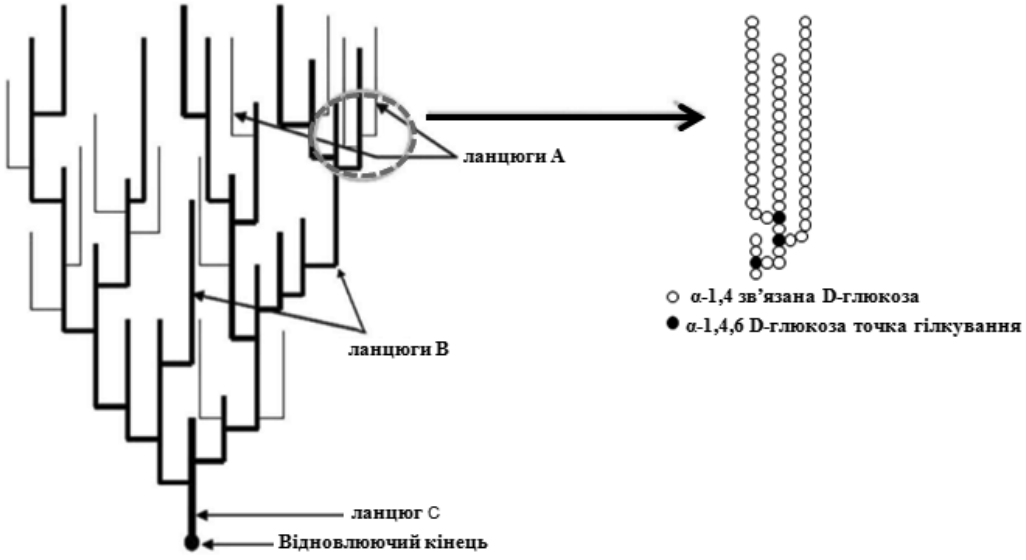

Рис. 2. Кластерна організація молекули амілопектину [4]

Крохмальна гранула є напівкристалічною структурою і містить відповідно кристалічну (30 % маси гранули) та аморфну (70 % маси гранули) зони. Аморфна зона крохмальної гранули містить, в основному, амілозу і незначну частину амілопектину. Кристалічну зону крохмальної гранули утворює амілопектин. Ця частина поліморфна за структурою амілопектину, яку поділяють на три типи: амілопектин А (ланцюги розміром 23–29 залишків глюкози); амілопектин В (30–44 залишків глюкози); амілопектин С — суміш А і В типів. Пшениця містить крохмальні гранули, утворені переважно амілопектином типу А [6].

Співвідношення амілоза/амілопектин у структурі крохмалю відіграють стратегічну роль у визначенні форми і фізичної організації крохмальних гранул, біохімічних, технологічних і, головне, харчових характеристик крохмалю. Оскільки масово вживані продукти переробки зерна пшениці містять левову частку крохмалю, то його харчова (біологічна) цінність є головним предметом обговорення цієї статті.

Однією з найважливіших характеристик крохмалю у контексті його біологічної цінності є кінетика або швидкість трансформації крохмалю в глюкозу у шлунково-кишковому тракті людини. Слід наголосити, що в шлунково-кишковому тракті людини є лише один фермент, який бере участь у засвоєнні вуглеводів, — це α-амілаза. З-поміж вуглеводів їжі вона розщеплює лише крохмаль. Для характеристики швидкості трансформації крохмалю в глюкозу в дієтології використовується гліцемічний індекс (glycemic index, GI), скорочено ГІ (рис. 3). ГІ глюкози прийнято за 100 одиниць. ГІ продукту харчування вважають високим у межах 70–100 одиниць, середнім — між 50 і 70 і низьким — менше 50 одиниць.

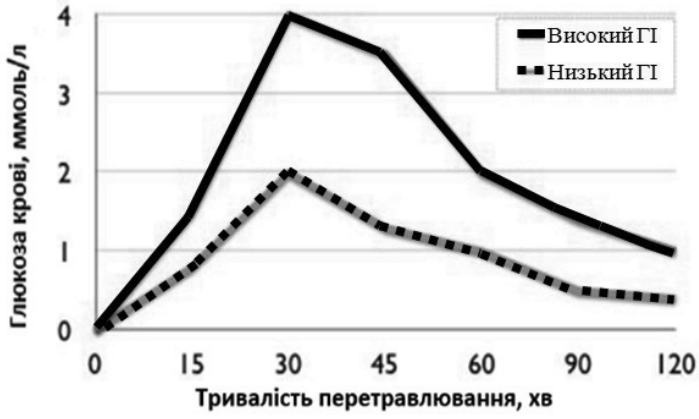

Рис. 3. Концентрація глюкози у крові при вживанні продуктів з високим ГІ і низьким ГІ гліцемічними індексами [7]

Що вище гліцемічний індекс продукту, то і вищий пік глюкози утворюється в крові після вживання такої їжі, і тим вищою має бути секреція підшлунковою залозою гормону інсуліну для засвоєння глюкози клітинами (рис. 4).

Систематичний надлишок глюкози в крові має важкі патологічні наслідки, такі як запалення органів, надлишкова маса тіла, поява стійкості до інсуліну, метаболічний синдром і кінцевий результат — діабет 2-го типу (рис. 5, 6).

При цьому ***важливо наголосити, що хліб і хлібопродукти із зерна пшениці, як зазначено вище, містять у складі крохмалю амілопектин, тип А, який швидше від інших типів амілопектину трансформується в глюкозу***. Як наслідок, хліб і хлібопродукти мають високі

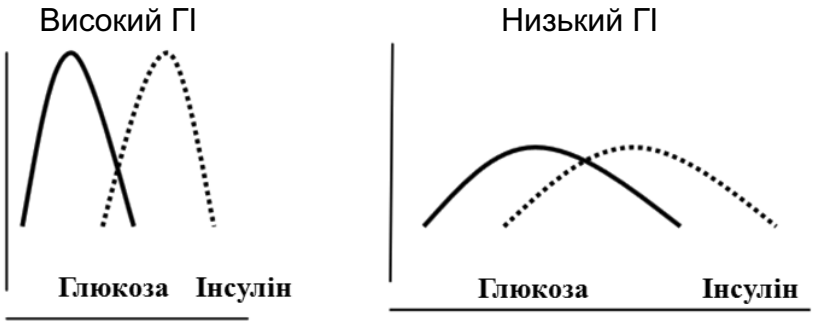

Рис. 4. Секреція інсуліну при вживанні продуктів з високим і низьким гліцемічними індексами [7]

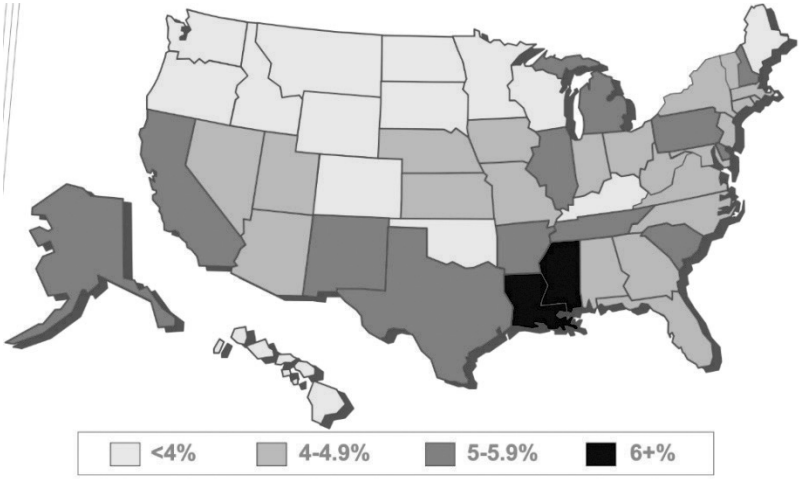

Рис. 5. Захворюваність на діабет у США у 1994 році [7]

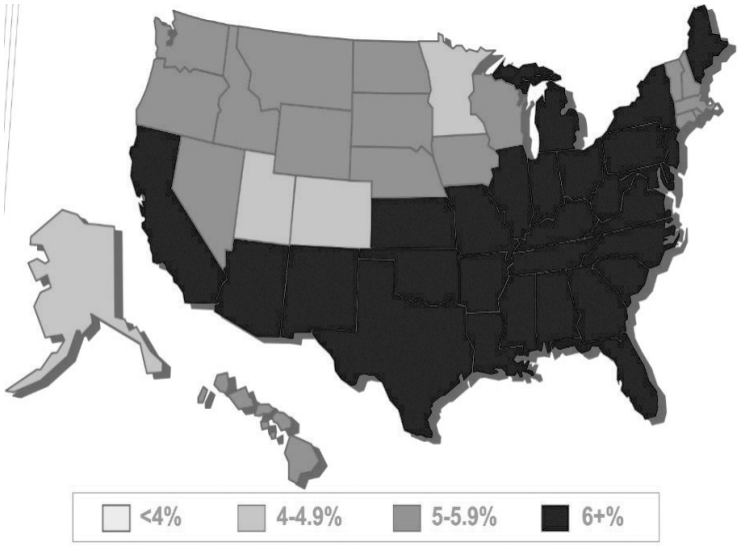

Рис. 6. Захворюваність на діабет у США у 2004 році [7]

гліцемічні індекси — від 70 до 90 і вище, і, отже створюють ризик розвитку перелічених вище патологій. Тому не випадково нормування вуглеводистих продуктів для діабетиків визначають у хлібних одиницях. Одна хлібна одиниця дорівнює 10–12 г засвоюваних вуглеводів або 20 г білого пшеничного хліба. Одна хлібна одиниця підвищує вміст цукру у крові на 2,8 ммоль/літр і потребує для засвоєння організмом 2 одиниці інсуліну.

Сучасний стиль харчування цивілізованого людства суттєво змістився в бік зменшення в раціоні натуральних продуктів та їхнього заміщення рафінованими крохмалистими продуктами, які швидко готуються та засвоюються, мають високу калорійність. Малорухомий спосіб життя людей у поєднанні з сучасним стилем харчування створюють умови для накопичення надлишкової маси тіла, ожиріння, яке в сучасному технологічно розвинутому світі набуває ознак пандемії. І як наслідок, останніми десятиріччями суттєво зріс ризик поширення ознак гіпертензії, дисліпідемії, діабету 2-го типу, серцево-судинних та інших хронічних патологій (рис. 5, 6). Серед крохмалистих продуктів, що є складовою сучасного стилю нездорового харчування, чільне місце займають саме продукти із зерна пшениці.

Радикальним шляхом поліпшення раціону щодо здорового харчування людей сучасна дієтологія вважає суттєве збільшення у їхньому раціоні частки дієтичної клітковини. Згідно з визначенням Асоціації зернових хіміків США (AACC), «дієтична клітковина… стійка до дії ферментів травлення та всмоктування у тонкому кишківнику, але з повним або частковим перетравлюванням у товстому кишківнику… спричиняє позитивний фізіологічний ефект включно з релаксацією, зниженням у крові вмісту холестерину та глюкози». На жаль, цивілізоване людство у більшості належним чином ще не оцінило значення дієтичної клітковини у харчуванні. Так, згідно даних Національної академії наук та Інституту медицини США, американці в середньому вживають менше 20 г/добу дієтичної клітковини замість рекомендованих 38 г/добу для дорослої особи чоловічої і 25 г/добу для особи жіночої статі. ***Одним із важливих для здоров'я різновидів дієтичної клітковини експерти ФАО та ВОЗ вважають стійкий до перетравлювання так званий резистентний крохмаль (resistant starch, RS)*** [7].

Саме термін «резистентний крохмаль» означає, що між типами крохмалю існує істотна відмінність за їхньою стійкістю до ферментів. Крохмаль, що вживається для харчових цілей, за швидкістю перетравлювання розподіляється на три категорії (за Englyst тестом): швидко перетравлюваний (RDS) — тривалість деградації у середовищі зі стандартною ферментною сумішшю 20 хв; повільно перетравлюваний (SDS) — тривалість ферментативної деградації 120 хв; стійкий до перетравлювання (RS) резистентний крохмаль з тривалістю деградації понад 120 хв [8]. Вперше запропонований Englyst et al. (1982) термін «резистентний крохмаль» був згодом формально визначений європейською інституцією EURESTA

як «крохмаль або продукт деградації крохмалю, що не перетравлюється у тонкому кишківнику людини, але повністю або частково ферментується у товстому кишківнику і діє як харчовий субстрат для мікрофлори кишківника, як пребіотичний матеріал» [9,10].

Мимохідь пояснимо два, пов'язані з темою статті, терміни «пребіотики» і «пробіотики», оскільки це важливо для подальшого тлумачення матеріалу. Пробіотики (probiotics) — мікроорганізми (лактобактерії, біфідобактерії), що належать переважно до таких родів як *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* та *Lactobacillus*. Це мікроорганізми-симбіотики, що населяють кишківник, переробляють речовини-пребіотики як поживний субстрат і спричинюють позитивний фізіологічний вплив на здоров'я людини, синтезуючи в результаті своєї життєдіяльності коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК): оцтову, пропіонову, молочну та особливо бутилову. Своєю чергою КЛЖК всмоктуються у кишківнику, поліпшуючи засвоєння організмом води та мінеральних солей. КЛЖК є надзвичайно важливим джерелом енергії для печінки, вони живлять епітеліальні клітини, що вистилають кишківник, сприяють їх відновленню, росту і диференціації. ***В результаті метаболічного засвоєння мікрофлорою кишківника резистентного крохмалю виявлені наступні позитивні фізіологічні ефекти: покращується загальний стан санації і здоров'я кишківника; зростає чисельність корисної мікрофлори (пребіотичний ефект); збільшується вихід калових мас та покращується процес очищення кишківника; знижується pH кишкового середовища та зменшується синтез потенційно шкідливих вторинних жовчних кислот, аміаку і фенолів; спостерігається протидія деградації мукоїдного шару, що захищає клітини кишківника; посилюється ефект зворотної дії на процеси неоплазії і канцерогенезу; індукується апоптоз (програмована смерть) пошкоджених клітин кишківника тощо*** [15].

Пребіотики (prebiotics) — дієтична клітковина або речовини — компоненти продуктів харчування, що не всмоктуються у тонкому кишківнику, але справляють перелічені вище позитивні фізіологічні ефекти на здоров'я людини, стимулюючи ріст і розвиток корисної мікрофлори кишківника. До класу дієтичної клітковини (пребіотичного матеріалу) належать наступні компоненти їжі: полісахариди (пектин, геміцелюлози, гуммі, інулін і резистентний крохмаль), олігосахариди (рафіноза, стахіоза, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, резистентний декстрин) та деякі цукри і полози, що не всмоктуються у тонкому відділі кишківника (манітол, лактітол). ***Отже, резистентний крохмаль є дієтичною клітковиною і водночас типовим пребіотиком рослинного походження, продуктом «харчування» для корисної мікрофлори кишківника (пробіотиків) і дієтичною клітковиною у раціоні людини***. Зазначимо, що 50 % резистентного крохмалю в організм людини надходить з продуктами масового вжитку із зерна пшениці. Тому підви-

щення вмісту резистентного крохмалю в зерні пшениці — це стратегічне завдання сучасної біотехнології взагалі. Резистентний крохмаль класифікують у чотири загальні підтипи: RS1, RS2, RS3 та RS4, що схематично зображені на рис. 7 [8,11,12].

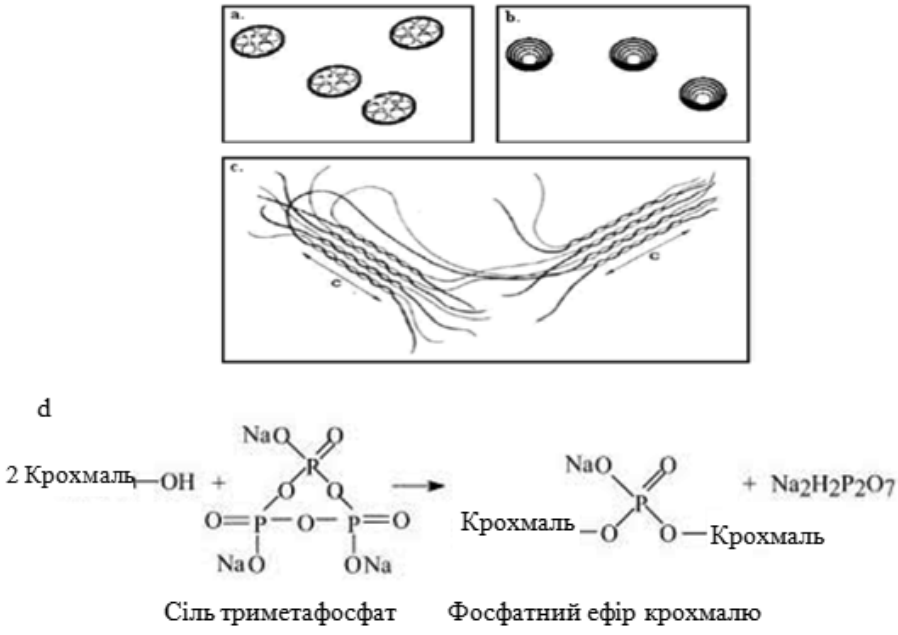

Рис. 7. Підтипи резистентного крохмалю: (a) RS1, (b) RS2, (c) RS3, (d) RS4 [12]

Підтип RS1 — нативний крохмаль, що має компактну кристалічну структуру, яка утруднює доступ ферментів травлення, термостійкий, знаходиться у зерні зернових культур, коренеплодах. Підтип RS2 — це також нативний крохмаль, присутній у сирій картоплі, бананах та зерні високоамілозної кукурудзи. Унікальна кристалічна структура цього крохмалю не руйнується навіть при кулінарній обробці та лімітує дію ферментів травлення. ***Саме про цей тип крохмалю піде мова нижче***. Підтип RS3 — це негранулярний крохмаль, що набуває резистентності після кулінарної, термічної, обробки (желатинізації) та охолодження. Це так званий деградований крохмаль. Підтип RS4 — хімічно модифікований крохмаль як результат молекулярної конверсії, заміщення, зшивки, етерифікації. Внаслідок хімічної модифікації він набуває стійкості до ферментів травлення.

Розглянемо механізм формування резистентного крохмалю у зерні пшениці. ***В його основі лежить співвідношення між вмістом у крохмалі амілози і амілопектину***. ***Підвищення у складі крохмалю вмісту амілози, яка суттєво гірша за амілопектин А, перетравлюється у шлунково-кишковому тракті, тісно позитивно корелює з формуванням резистентного крохмалю*** [12]. Молекула амілопектину має значно більші розміри, ніж молекула амілози. Як наслідок, вона має більшу площу, яку спроможні атакувати амілолітичні ферменти і тому швид-

ше перетравлюється у шлунково-кишковому тракті. Молекули ж амілози тісно пов'язані одна з одною водневими зав'язками, що підвищує стійкість амілози до дії ферментів і лежить в основі формування резистентного крохмалю [13].

Отже, що вище вміст амілози у крохмалі, то гірше такий крохмаль желатинізується, то більш чутливий він до ретроградації. Відповідно високоамілозний крохмаль як in vitro, так і in vivo значно гірше перетравлюється у порівнянні зі звичайним крохмалем з типовим співвідношенням амілоза/амілопектин 25–28 % / 75–72 % [14].

Яким же чином можна підвищити вміст амілози у складі крохмалю пшениці? На це запитання дає чітку відповідь сучасна генетика і біотехнологія. На сьогодні генетика біосинтезу крохмалю пшениці достатньо добре вивчена і розроблені ефективні методи експериментальної зміни вмісту амілози в крохмалі як у бік її часткового зниження (пшениця часткова ваксі) або повного блокування біосинтезу (пшениця ваксі), так і її суттєвого підвищення (високоамілозна пшениця).

На рисунку 8 і таблиці 1 подано схему біосинтезу крохмалю зерна пшениці, роль ключових ферментів у трансформації глюкози в амілозу і амілопектин та локалізацію у хромосомах генів, що кодують біосинтез ключових ферментів біосинтезу крохмалю.

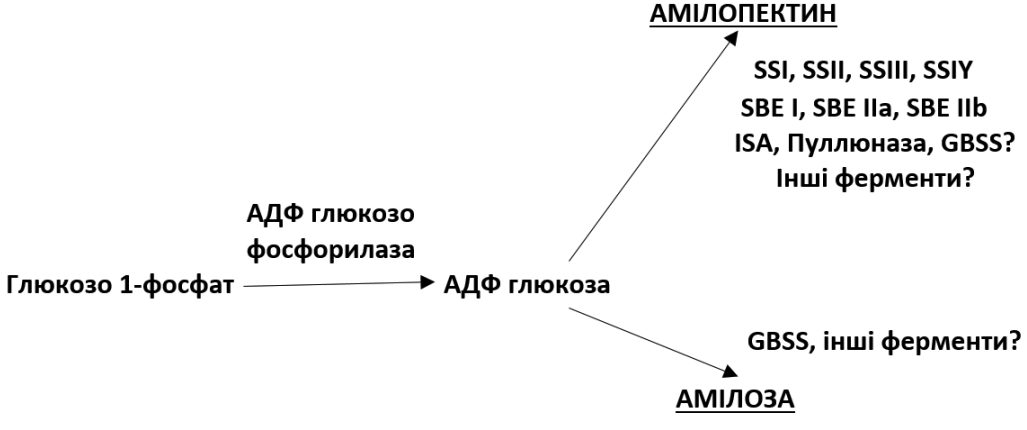

Рис. 8. Схема біосинтезу крохмалю зерна пшениці [16]

У таблиці 1 подано також інформацію про те, серед яких генетичних систем контролю біосинтезу крохмалю ідентифіковано мутантні алелі. Наведемо коротко характеристику окремих ключових ферментів біосинтезу крохмалю та їхні функції.

GBSS I — синтаза крохмалю, фермент відповідає за функцію елонгації ланцюгів глюкози шляхом додавання залишків глюкози з нередукованого кінця. Фермент відомий ще як «протеїн ваксі» і є одноланцюговим поліпептидом з молекулярною масою близько 68 кДа, кодується домінантними алелями *Wx* відповідних генів [17]. Відсутність активності

Таблиця 1

Генетичний контроль ключових ферментів біосинтезу крохмалю в зерні пшениці [16]

Гени для ключових ферментів	Розмір кодованого поліпептиду, кДа	Локалізація генів у хромосомах	Ідентифіковані мутації
АДФ-глюкозо пірофосфорилаза велика субодиниця	57,8	1AS,1B,1D	Ні
АДФ-глюкозо пірофосфорилаза мала субодиниця	52,1	7AS,7B,7D	Ні
Асоційована з гранулами синтаза крохмалю I (GBSS I)	67,7	7AS,4AL,7DS	Так
Синтаза крохмалю I (SS I)	71	7AS,7BS,7DS	Ні
Синтаза крохмалю II (SS II)	87,2	7AS,7BS,7DS	Так
Синтаза крохмалю III (SS III)	183,1	1AS	Ні
Синтаза крохмалю IY (SS IY)	103,1	?	Ні
Фермент гілкування I (SBE I)	91,3	7AL,7BL,7DL	Так
Фермент гілкування IIa (SBE IIa)	92,6	2AL,2BL,2DL	Ні
Фермент гілкування IIb (SBE IIb)	94,4	2A,2B,2D	Ні
Ізоамілаза I (ISA 3)	88,7	7AS,7BS,7DS	Ні

GBSS I призводить до появи відомого фенотипу «ваксі» і практично повного блокування біосинтезу амілози. Ген *Wx* для *GBSS I* містить 11 ексонів і має відносно невеликий розмір, приблизно 3 кб від першого до останнього ексону. Гени *Wx* для GBSS I локалізовані на кінцях коротких плечей гомеологічних хромосом 7A (*Wx-A1*) і 7D (*Wx-D1*) та в довгому плечі хромосоми 4A (*Wx-B1*) — як результат транслокації короткого плеча хромосоми 7B (7BS.4AL). Геном-специфічні гомеологічні ізоформи *GBSS I* характеризуються 95 %-ою ідентичністю у послідовності нуклеотидів. Активність *GBSS I* і відповідно біосинтез амілози повністю заблокований, а фенотип «ваксі» проявляється у генотипів, що несуть у гомозиготному стані всі три рецесивні алелі генів *Wx*.

SS I — синтаза крохмалю, асоційована з крохмальними гранулами. Синтаза крохмалю — це поліпептид масою 70 кДа. Ген, що кодує *SS I,* локалізований у короткому плечі хромосом гомеологічної групи 7 проксимально *GBSS I* генів. Ген для *SS I* має розмір 10 кб і містить 15 ексонів. Ідентичність нуклеотидних гомеологічних послідовностей генів для *SS I*, як і для *GBSS I*, становить 95 %. Конкретна роль цього ферменту у пшениці не відома [18]. Дослідження аналогічного ферменту у кукурудзи дає підстави для припущення, що він здійснює елонгацію коротких ланцюгів до 10 залишків глюкози.

SS II — синтаза крохмалю, фермент, асоційований з крохмальними гранулами, представлений кількома поліпептидами *SS IIa* і *SS IIb* різної молекулярної маси. *SS IIb* в ендоспермі не експресується. Ген для *SS IIa* локалізований у коротких плечах хромосом гомеологічної групи 7 проксимально гена для *SS I*. Він містить 8 ексонів і має розмір 10 кб. За від-

сутності активності *SS IIa* у мутантної форми пшениці крохмаль містить до 35 % амілози разом з підвищеною часткою резистентного крохмалю і має температуру желатинізації на 10°С нижчу від норми [19].

SS III — синтаза крохмалю, поліпептид масою 184 кДа, кодується геном, що розміщений у короткому плечі хромосоми 1AS пшениці. У кукурудзи відсутність активності *SS III* призводить до скорочення довжини ланцюгів амілопектину та підвищення густини крохмалю. У пшениці функція *SS III* залишається малодослідженою [20].

SS IY — синтаза крохмалю добре досліджена на культурі рису. У пшениці фермент ідентифікований у листях і наразі мало досліджений.

SBE I — фермент гілкування амілопектину, асоційований з крохмальними гранулами великих розмірів. Ген, що кодує *SBE I*, містить 22 екзони і розміщений у довгому плечі хромосом гомеологічної групи 7. Відсутність цього гена у мутантної лінії пшениці не приводить до якихось суттєвих змін у складі та фізичних властивостях крохмалю [21].

SBE II — фермент гілкування амілопектину. В усіх злаків фермент *SBE II* представлений у двох ізоформах — *SBE IIa* та *SBE IIb*. В ендоспермі пшениці ізоформа *SBE IIa* є домінуючим ферментом гілкування амілопектину. Однак у крохмальних гранулах домінує ізоформа *SBE IIb* у співвідношенні до *SBE IIa* як 3:2. Обидві ізоформи мають однакову молекулярну масу і не розділяються шляхом електрофорезу, а лише шляхом йонообмінної хроматографії. *SBE IIa* ген містить 22 екзони, і має розмір 17 кб. У пшениці гени для обох *SBE IIa* та *SBE IIb* ферментів локалізовані у довгих плечах хромосом гомеологічної групи 2. Є ще кілька ферментів, роль яких у біосинтезі крохмалю є мінорною, тому ми не зупинятимемось на них.

Отже, за логікою процесу біосинтезу крохмалю в основі технології підвищення вмісту амілози (і відповідно RS крохмалю) мають бути генетичні маніпуляції, спрямовані на інактивацію ключових ферментів біосинтезу амілопектину. ***Особливо це стосується ферментів***, ***які виконують функцію гілкування молекули амілопектину, адже молекула амілопектину, що не гілкується***, ***практично трансформується в молекулу амілози***. Сьогодні цільовими генами, на блокування експресії яких спрямовані сучасні біотехнологічні методи, головним чином є гени, що кодують ферменти гілкування амілопектину класу II (*SBE IIa/b*) та синтаза II (*SS II* або *SGP-1*) [22]. Найбільш ефективними за отриманими результатами підвищення вмісту амілози в зерні пшениці сьогодні визнані методи РНК інтерференції (RNAi, або технологія мовчазних генів *gene silencing*) та метод, відомий під назвою TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*). Метод RNAi належить до розділу типових трансгенних технологій. Метод TILLING — це різновид сучасного високотехнологічного мутагенезу, спрямованого на отримання мутацій специфічних генів та детекцію цілеспрямованих мутацій шляхом скринінгу індукованого SNP (*single nucleotide polymorphism*) поліморфізму. Зупинимось коротко на цих двох процедурах.

Метод RNAi з метою створення високоамілозної пшениці був уперше застосований у 2005 році співробітниками австралійської компанії CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) [23]. У результаті блокування активності обох *SBE IIa/b* генів автори отримали трансгенні рослини хлібопекарської пшениці, у яких вміст амілози в зерні було підвищено з 25 % до 70 % [24].

Ці оригінальні дослідження виконані шляхом створення ДНК конструкції, за допомогою якої індуковано експресію специфічної шпильки-РНК (*hp*-RNA). Конструкція створена шляхом клонування фрагмента кДНК генів пшениці *SBE IIa* та *SBE IIb*, що відповідає регіону між 1 і 3 екзонами цих генів з інвертованою послідовністю, яка розділяє інтрон 3. Ендосперм-специфічний промотор гена для субодиниці *Dx5* високомолекулярних глютенінів (зразок *GenBank* № X12928) був інтегрований з 5' кінця інвертованої ділянки. А термінальна ділянка гена, що кодує фермент опалін-синтазу, була інтегрована до 3' кінця (рис. 9).

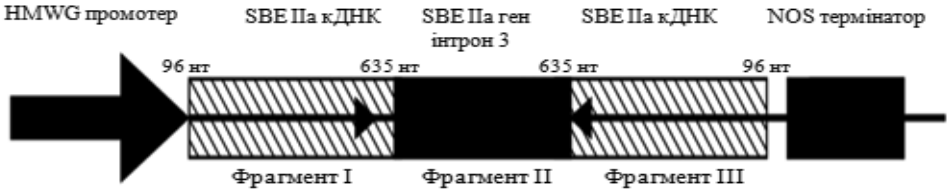

Рис. 9. RNAi конструкція hp-*SBE IIa* створена для трансгенної супресії ферментів гілкування амілопектину *SBE IIa* та *SBE IIb* [23]

Створена «промотор-інверсія / повтор-термінатор» конструкція була перенесена до бінарного трансформаційного вектора, похідного від векторів pSB11та pSB1, і була використана для бактеріальної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Позитивні трансформаційні події фіксували за допомогою ПЛР та Southern blot гібридизації. В результаті отримано два типи трансгенних ліній *hp-SBE IIa* та *hp-SBE IIb*. Конструкція *hp-SBE IIa* блокувала експресію обох *SBE IIa* та *SBE IIb* ферментів, тоді як конструкція трансгенних ліній з супресією *SBE IIa/b* (А) та *SBE IIb* (Б). Перший пік — амілопектин, другий пік — амілоза [23].

Ендосперми Т2 рослин Т1 були досліджені за експресією *SBE IIa* та *SBE IIb* імуно-блот методом з антисироваткою, специфічною до цих білків. Аналіз показав ефект від часткового до повного блокування біосинтезу *SBE IIa* та *SBE IIb* у трансформованих рослин.

Склад крохмалю у зерні трансформованих ліній з RNAi-супресією *SBE IIa* та *SBE IIb* досліджено методом розподільної гель-хроматографії за розміром часток. У ліній з супресією *SBE IIb* вміст амілози в крохмалі зріс несуттєво, тоді як у ліній з супресією *SBE IIa/b* спостерігалося значне зростання вмісту амілози до 74 % (рис. 10).

Трансгенні лінії *hp-SBE Iia* та *hp-SBE IIb* відрізнялись також за морфологією крохмальних гранул (рис. 11).

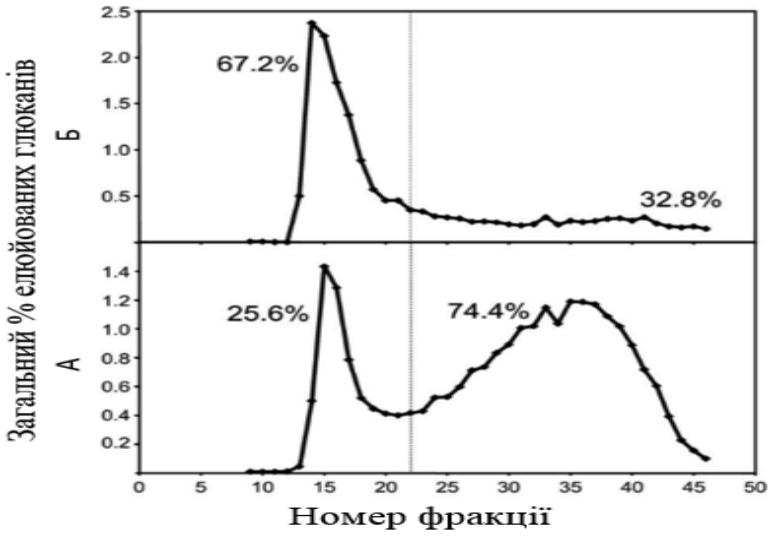

Рис. 10. Гель-хроматографія за розміром часток
у CL2B сефарозі крохмалю зерна

Крохмальні гранули ліній *hp-SBE IIa* були надто нерегулярні за розміром, а великі гранули мали серповидну форму. В той же час крохмальні гранули ліній *hp-SBE IIb* за формою і розмірами практично не відрізнялися від гранул нетрансформованої пшениці.

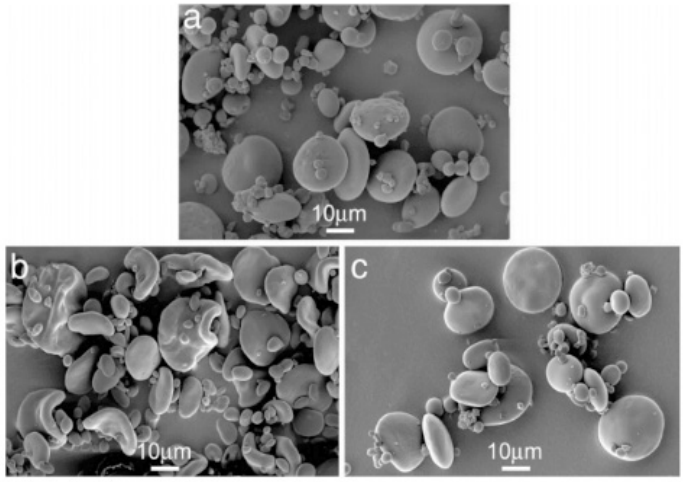

Рис. 11. Крохмальні гранули нетрансформованої пшениці (a)
та трансгенних ліній *hp-SBE IIa* (b) та *hp-SBE IIb* (c) [23]

Зерно отриманих трансгенних ліній з високим вмістом амілози включили в раціон для годівлі лабораторних щурів. Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Високий вміст амілози в зерні пшениці, як наголошувалося раніше, тісно пов'язаний з вмістом резистентного до ферментів травлення крохмалю. Як наслідок, він стимулює активність бактеріаль-

ної мікрофлори кишківника і синтез цінних для організму людини КЛЖК, особливо бутилової, що й підтверджено даними таблиці 2.

Таблиця 2

Вміст коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) у товстому кишківнику лабораторних щурів [23]

Дієта	Концентрація КЛЖК, мкмоль/л			
	оцтова	пропіонова	бутилова	загальна
Звичайна пшениця	44	14	31	88
Високоамілозна пшениця	106	38	57	202

Виявлений у цьому унікальному дослідженні феномен блокування конструкцією *hp-SBE IIa* експресії обох ферментів гілкування амілопектину *SBE IIa* та *SBE IIb* і відповідне зростання вмісту амілози в крохмалі до 70 % і більше, а також факт блокування конструкцією *hp-SBE IIb* лише одного *SBE IIb* з несуттєвим підвищенням вмісту амілози, залишаються поки що без пояснення. ***Разом з тим, отриманий генетичний матеріал з високим вмістом амілози в крохмалі слід вважати історичним етапом у біотехнології і селекції пшениці, спрямованим на радикальну генетичну зміну харчового статусу пшениці як одного з найважливіших продуктів, що вживає людина***.

Слідом за цитованою вище піонерською роботою вчених австралійського CSIRO подібні дослідження з використанням RNAi технології було виконано на культурі твердої пшениці в Італії в університеті Tuscia (Viterbo, Italy). Трансформації у цих дослідах здійснювалися як шляхом бактеріальної *Agrobacterium*-опосередкованої, так і біолістичної трансформації [25].

Процедура біолістичної трансформації здійснювалася з використанням 1954 недозрілих зародків твердої пшениці сорту Svevo. Зародки були ко-трансформовані за допомогою касети експресії pRDPT+*SBEIIa*(RNAi) і селективного маркера *bar*, інтегрованих у плазміду. У результаті було отримано 48 рослин To, стійких до гербіциду біалафос, що містили RNAi-касету з ефективністю ко-трансформації 2,5 %. Детекція трансгенів виконувалася за допомогою ПЛР аналізу геномної ДНК регенерованих рослин з використанням двох пар праймерів: один специфічний до промотора конструкції (PromDx5Fw/PromDx5R), а інший до *bar* гена (BarFx/BarR) та продуктів ампліфікації розміром 473пн і 405пн відповідно.

Agrobacterium-опосередкована трансформація здійснювалася з використанням у досліді 1759 недозрілих зародків твердої пшениці сорту Ofanto та конструкції pGUB-G+*SBEIIa*(RNAi) у поєднанні з геном *bar*. У результаті було отримано 13 рослин To з ефективністю трансформації 0,74 %. Детекція трансформованих рослин виконувалася у такий же спосіб, як і при біолістичній трансформації. Як у досліді з використанням біолістичної трансформації, так і *Agrobacterium*-опосередкованої транс-

формовані рослини за морфологічними ознаками не відрізнялися від нетрансформованих.

Відсутність *SBEIIa* транскриптів досліджували напівкількісним аналізом ПЛР у реальному часі на загальній РНК екстрагованій з недозрілих зерен (18-й день після колосіння) рослин Т2 з використанням пари специфічних для *SBEIIa* гена праймерів (*SBEIIaFw/ SBEIIaR*). Для подальших досліджень було взято три трансгенні лінії від біолістичної і три лінії від *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Повне блокування гена *SBEIIa* спостерігали у чотирьох і часткове у двох ліній. У ліній, отриманих шляхом біолістичного бомбардування, дві мали часткове блокування *SBEIIa* гена. У ліній, отриманих опосередкованою *Agrobacterium* трансформацією, спостерігали повне блокування *SBEIIa*.

Значення вмісту амілози у крохмалі зерна отриманих трансгенних ліній варіювали від 30,8 до 75 %. Найвищий показник вмісту амілози в крохмалі спостерігали у лінії MJ16–112, яка за морфологічними ознаками та ознаками зерна і урожаєм зерна не відрізнялася від нетрансформованого контролю (рис. 12).

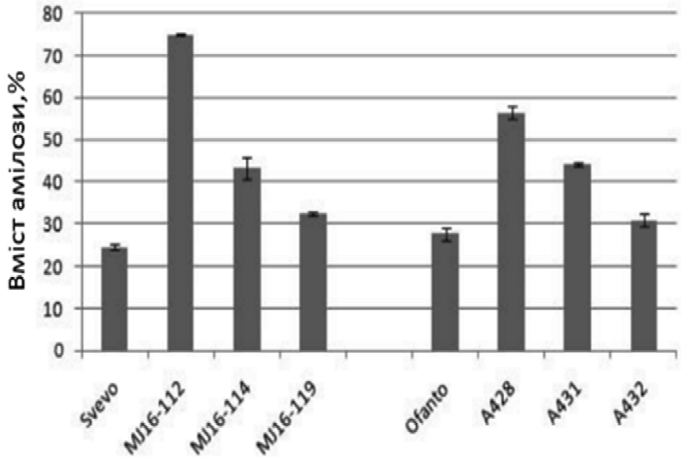

Рис. 12. Вміст амілози в крохмалі SBEIIa/RNAi трансформованих ліній та сортів Svevo і Ofanto [25]

Електронно-мікроскопічне сканування крохмальних гранул трансгенних ліній твердої пшениці показало, що гранули типу А лінії MJ16–112 з найвищим вмістом амілози у порівнянні з гранулами контрольного сорту Svevo були значно менші за розмірами, а гранули типу В втратили сферичну форму (рис. 13).

Дослідження фізичних властивостей крохмалю трансгенної лінії MJ16–112 за допомогою швидкого віско-аналізатора (RVA) показало суттєві відмінності в поведінці крохмалю у порівнянні з нетрансформованим сортом за всіма показниками.

Автори цієї роботи провели цікаві спостереження взаємодії заблокованого *SBEIIa* гена з іншими генами, що беруть участь у біосинтезі

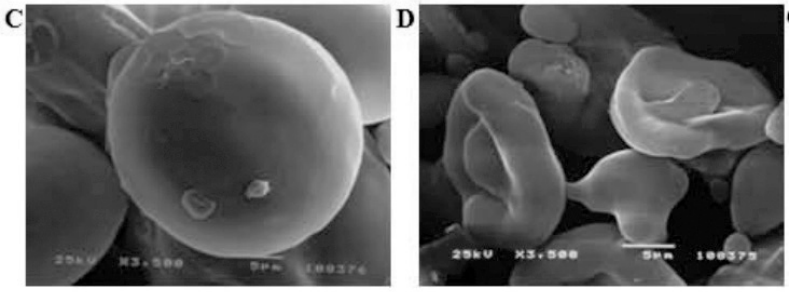

Рис. 13. Крохмальні гранули сорту Svevo (C) і трансгенної лінії (D) SBEIIa/RNAi MJ16–112 [25]

крохмалю *GBSSI, SSI, SSII, SSIII, SBEI, SBEIIb, ISA1* та *LD* за допомогою напівкількісного ПЛР аналізу у реальному часі. Особливо помітне було підвищення експресії гена *GBSSI*, яке сягало від 12 до 28 разів у порівнянні з контролем. Активність транскрипції генів *GBSSI*, *SSIII*, *LD* та *ISA1* у порівнянні з контрольним сортом була суттєво підвищеною, в той час як транскрипти генів *SSI*, *SSII*, *SBEI* та *SBEIIb* залишалися без значних змін.

Отримані результати цитованих вище унікальних праць показують, що трансгенні технології здатні радикально змінювати механізми біосинтезу крохмалю, спрямовуючи кількісний перерозподіл складових пшеничного крохмалю та його властивості у бажаному для експериментатора напрямі.

Другою сучасною нетрансгенною технологією молекулярної генетики, за допомогою якої вдалося суттєво вплинути на вміст амілози в крохмалі зерна пшениці, є метод TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Це сучасний високотехнологічний метод хімічного мутагенезу, який дозволяє цілеспрямовано здійснювати як індукцію, так і ідентифікацію нових мутацій у специфічних генах, отримувати мутації цільових генів у бажаному для експериментатора напрямі. TILLING — метод так званої реверсивної генетики, яка на відміну від класичної, досліджує фенотипові ефекти специфічних ДНК послідовностей, отриманих шляхом секвенування ДНК. Метод був вперше використаний у 2000 році на модельній рослині *Arabidopsis thaliana* і відтоді активно застосовується на різних культурах [26].

Суть методу TILLING полягає у тому, що в цільовому гені шляхом хімічного мутагенезу індукується поліморфізм окремих нуклеотидів — single nucleotide polymorphism (SNPs). Наприклад, під дією хімічного мутагену етилметансульфонату (ЕМС) відбувається алкілювання нуклеотидів, в результаті якого залишок гуаніну (G) трансформується в аденін (A), або залишок цитозіну (C) трансформується в тімін (T), що призводить до так званих точкових або місенс (missense) мутацій. Отримані таким чином SNPs спричинюють появу в цільовому гені нових алелів, які ідентифікуються за допомогою ПЛР аналізу шляхом використання специфічних праймерів.

Метод TILLING уперше був запропонований Colbert et al. у 2001 році [27], а з метою підвищення вмісту амілози в крохмалі зерна пшениці цей метод уперше був застосований групою американських вчених у 2012 році [28]. Автори цієї роботи виконували дослідження одночасно на культурі твердої і м'якої пшениці. З метою оптимізації детекції мутацій гена *SBEIIa* ПЛР праймери були сконструйовані таким чином, щоб ампліфікація ділянки цього гена відбувалася одночасно в трьох A, B і D геномах між екзонами 11 і 12 і екзонами 14 і 15. Ділянка, що містить екзони 12 і 14 із 22 екзонів *SBEIIa* гена, був обраний для TILLING тому, що він містить позиції 8 нуклеотидів, які під дією ЕМС високою імовірністю можуть мутувати у stop-кодон та блокувати таким чином експресію *SBEIIa* гена і відповідно гілкування амілопектину. В отриманій популяції мутантних генотипів твердої і м'якої пшениці були ідентифіковані лінії зі stop-мутаціями у послідовності гена *SBEIIa*. Як показав кількісний ПЛР аналіз кДНК, експресія гена *SBEIIa* в ендоспермі у stop-мутацій була знижена від 6 до 12 разів у порівнянні з вихідними зразками пшениці. Відповідно спостерігали підвищення вмісту амілози в ендоспермі з цікавою закономірністю. Підвищення вмісту амілози в зерні незначною мірою спостерігалося лише у подвійних stop-мутацій сполученням з різних геномів A, B і D (рис. 14).

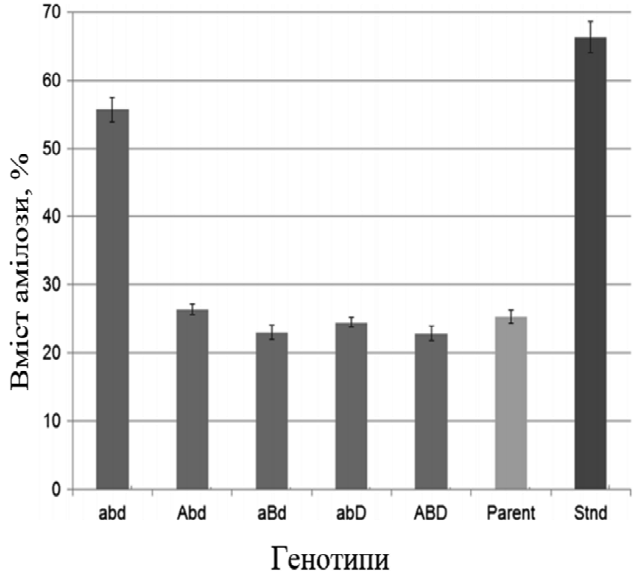

Рис. 14. Вміст амілози в зерні ліній м'якої пшениці з подвійною (Abd, aBd, abD) і потрійною (abd) stop-мутацією у послідовності гена SBEIIa. Stnd — високоамілозна кукурудза (66 %)

І лише у ліній м'якої пшениці з потрійною stop-мутацією гена *SBEIIa* в різних геномах A, B і D спостерігалося суттєве підвищення вмісту амілози (55 %). Аналогічний генотип твердої пшениці містив амілози 45 %. Відповідно вміст резистентного крохмалю у зерні генотипів з потрійною

stop-мутацією м'якої пшениці зріс від вихідного 0,83 до 11,22 %, а у твердої пшениці ці величини становили відповідно 1,58 і 6,21 %.

На жаль, слід констатувати, що дослідження з підвищення вмісту амілози в зерні пшениці подібні до тих, що наведені у цій статті, до сих пір не виконуються в жодній науковій лабораторії України.

У Селекційно-генетичному інституті доктором біологічних наук, професором, академіком НААН Ю. М. Сиволапом та доктором біологічних наук О. І. Рибалкою були ініційовані дослідження щодо оптимізації методів прогнозування та контролю вмісту амілози у крохмалі селекційного матеріалу пшениці української селекції [30].

На жаль, масштабної селекційної роботи розгорнуто не було. Складність полягала в тому, що лінії пшениці з високим вмістом амілози є високотехнологічними і доступ до їх використання в іноземних програмах селекції є суворо обмеженим. Однак нам пощастило отримати від авторів цитованого вище дослідження з Італії (проф. Д. Лафіандра) лінію *SBEIIa*/RNAi ярої твердої пшениці MJ16–112 сорту Svevo з вмістом амілози до 75 %. Цей матеріал, як вихідне джерело високого вмісту амілози, ми використали в міжвидових схрещуваннях з метою підвищення вмісту амілози і резистентного крохмалю в зерні м'якої хлібопекарської пшениці. Схрещування виконано в 2014 році і отримано достатню кількість зерен F_1 від схрещування лінії MJ16–112 з сортом озимої пшениці Куяльник. Ці дослідження започатковують в Україні нову програму зі створення сортів м'якої хлібопекарської і твердої пшениці з підвищеним вмістом у зерні амілози і резистентного крохмалю.

Висновки. Як видно з наведених вище результатів досліджень, вміст амілози в зерні пшениці і, відповідно, вміст критично важливого для здорового харчування людини резистентного крохмалю можна суттєво підвищити шляхом використання сучасних високотехнологічних методів генної інженерії. Для створення високоамілозної пшениці у світовій практиці використовуються методи звичайної мутаційної селекції [29], метод сучасного високотехнологічного мутагенезу TILLING та метод РНК інтерференції RNAi, який є, очевидно, найбільш результативним. ***Створення високоамілозної пшениці є докорінно новим словом у сучасній селекції цієї важливої продовольчої культури, є реальним шляхом радикального поліпшення харчової цінності зерна пшениці та продуктів її переробки***.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Colonna P. A. New insights on starch structure and properties. In: Cereal chemistry and technology: a long past and a bright future / P. Colonna, A. Buléon // Proceedings of the 9th international cereal and bread congress. — Institut de Recherche Technologique Agroalimentaire des Céréales (IRTAC). — Paris, France. — 1992. — P. 25–42.
2. Bulйon A. Starch granules: structure and biosynthesis / A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball // Int. Journal Biol. Macromol. — 1998. — Vol. 23. — P. 85–112.

3. Liu Q. Understanding starches and their role in foods / Q. Liu // In Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and applications (ed. S. W. Cui). — CRC Press, Boca Raton, USA. — 2005. — P. 309–355.
4. Manners D. J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure / D. J. Manners // Carbohydrate Polymorphism. — 1989. — Vol. 11. — P. 87–112.
5. Wei C. Physicochemical properties and development of wheat large and small starch granules during endosperm development / C. Wei, J. Zhang, Y. Chen, W. Zhou, B. Xu, Y. Wang // Acta Physiol. Plant. — 2010. — Vol. 32. — P. 905–916.
6. Butardo Jr V. M. Biomolecular analyses of starch and starch granule proteins in the high-amylose rice mutant goami 2 / Jr V. M. Butardo, V. D. Daygon, M. L. Colgrave, P. M. Campbell, A. Resurreccion, R. P. Cuevas // Journal of Agriculture Food Chemistry. — 2012. — Vol. 60. — P.11576–11585.
7. Mária Hódsági. Recent results of investigations of resistant starches. — Ph.D. thesis / Hódsági Mária. — Budapest, 2011. — 108 p.
8. Englyst H. N. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions / H. N. Englyst, S. M. Kingman, J. H. Cummings // European Journal of Clinical Nutrition. — 1992. — Vol. 46(2). — P. 33–50.
9. Englyst H. N. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates / H. N. Englyst, H. S. Wiggins, J. H. Cummings // Analyst. — 1982. — Vol.107. — P. 307–318.
10. Faraj A. The effect of extrusion cooking on resistant starch formation in waxy and regular barley flours / A. Faraj, T. Vasanthan, R. Hoover // Food Research International. — 2004. — Vol. 37. — P. 517–525.
11. Nugent A. P. Health properties of resistant starch / A. P. Nugent // Nutrition Bulletin. — 2005. — Vol. 30. — P. 27–54.
12. Sajilata M. G. Resistant starch — A review / M. G. Sajilata, R. S. Singhal, P. R. Kulkarni // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. — 2006. — Vol. 5. — P. 1–17.
13. Singh J. Starch digestibility in food matrix: a review / J. Singh, A. Dartois, L. Kaur // Trends in Food Science & Technology. — 2010. — Vol. 21(4). — P. 168–180.
14. Gelencsér T. Comparative study of resistant starches and investigations of their application in starch-based products (bread and pasta). — PhD Thesis / Gelencsér T. — Department of Applied Biotechnology and Food Science. — Budapest University of Technology and Economics. — 2009. — Budapest, Hungary.
15. Mentschel J. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to stem cell compartment / J. Mentschel, R. Claus // Metabolism. — 2003. — Vol. 52(11). — P.1400–1405.
16. Rahman S. Genetic control of wheat starch biosynthesis Frontiers of Wheat Bioscience: Memorial Issue / S. Rahman, Z. Regina, B. Kosar-Hashemi, S. McMaugh, C. Konik-Rose, M. Morell // Wheat Information Service. — 2010. — № 100. — P. 77–87.
17. Vrinten P. L. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues / P. L. Vrinten, T. Nakamura // Plant Physioljgy. — 2000. — Vol. 122. — P. 255–263.

18. Commuri P. D. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties / P. D. Commuri, P. L. Keeling // Plant Journal. — 2001. — Vol. 25. — P. 475–486.
19. Yamamori M. Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose / M. Yamamori, S. Fujita, K. Hayakawa, J. Matsuki // Theor. Appl. Genet. — 2000. — Vol. 101. — P. 21–29.
20. Li Z. The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase HI gene family / Z. Li, G. Mouille, B. Kosar-Hashemi, S. Rahman, B. Clarke, K. R. Gale, R. Appels, M. X. Morell // Plant Physiol. — 2000. — Vol. 123. — P. 613–624.
21. Regina A. Multiple isoforms of starch branching enzyme I in wheat: lack of the major SBE-I isoform does not alter starch phenotype / A. Regina, B. Kosar-Hashemi, Z. Li, L. Rampling, M. Cmiel, C. Gianibelli, C. Konik-Rose, O. Larroque, S. Rahman, M. K. Morell // Fund Plant Biol. — 2004. — Vol. 31. — P. 591–601.
22. Lafiandra D. Improving wheat health benefits through manipulation of starch composition / D. Lafiandra, F. Sestili, E. Botticella, A. Phillips // 19th Eucarpia General Congress. — Budapest, Hungary. — 2012. — P. 1–4.
23. Regina A. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats / A. Regina, A. Bird, D. Topping, S. Bowden, J. Freeman, T. Barsby, B. Kosar-Hashemi, Z. Li, S. Rahman, M. K. Morell // Proc. Natl. Acad. Sci. — U. S. A. — 2006. — Vol. 103. — P. 3546–3551.
24. Filmer M. New wheat promises dual benefits / M. Filmer // Farming Ahead. — 2006. — № 174. — P. 50–51.
25. Sestili F. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes / F. Sestili, M. Janni, A. Doherty, E. Botticella, R. D'Ovidio, S. Masci, H. Jones, D. Lafiandra // Plant Biology. — 2010. — Vol. 10. — № 144. — P. 2–12.
26. McCallum C. Targeted screening for induced mutations / C. McCallum, L. Comai, E. Greene, S. Henikoff // Nat. Biotechnol. — 2000. — Vol.18. — No 4. — P. 455–457.
27. Colbert T. High-throughput screening for induced point mutations / T. Colbert, B. Till, R. Tompa, S. Reynolds, M. Steine, A. Yeung, C. McCallum, L. Comai, S. Henikoff // Plant Physiol. — 2001. — Vol. 126. — P. 480–484.
28. Slade A. Development of high amylose wheat through TILLING / A. Slade, C. McGuire, D. Loeffler, J. Mullenberg, W. Skinner, G. Fazio, A. Holm, K. Brandt, M. Steine, J. Goodstal, V. Knauf // BMC Plant Biology. — 2012. — Vol.12. — P. 69–85.
29. Hogg A. Creation of a high-amylose durum wheat through mutagenesis of starch synthase II (SSIIa) / A. Hogg, K. Gause, P. Hofer, J. Martin, R. Graybosch, L. Hansen, M. Giroux // Journ. of Cereal Science. — 2013. — Vol. 57. — P. 377–383.
30. Петрова І. В. Оптимізація спектрометричного визначення вмісту амілози в зерновому крохмалі селекційного матеріалу пшениці / І. В. Петрова, О. М. Хохлов, С. В. Чеботар, О. І. Рибалка, Ю. М. Сиволап // Фізіологія та біохімія культурних рослин. — 2008. — Т. 40. — № 3(233). — С. 223–230.

Надійшла 17.06.2015.

UDK 633.16:631.527

Rybalka O. I., Shcherbyna Z. V. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

HIGH-AMYLOSE WHEAT — A NEW WORD IN THE WHEAT BREEDING

Wheat starch is an important source of energy in human nutrition. Starch with elevated level of amylose is of interest due to correlation between higher amylose content and increased level of resistant starch that have evidenced positive effects on human health for combating obesity and diabetes. A review of genetic approaches to elevate amylose content in wheat grain such as RNAi and TILLING are presented in the paper. The RNAi is the most efficient method allows increase the amylose content in wheat up to 70 %. The amylose up regulation is a drastic way of wheat nutritional quality amelioration.

УДК 633.16:631.527

Рыбалка А. И., Щербина З. В.

ПШЕНИЦА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АМИЛОЗЫ — НОВОЕ СЛОВО В СЕЛЕКЦИИ КУЛЬТУРЫ

Пшеничный крахмал является важным источником энергии в питании человека. Крахмал с высоким содержанием амилозы представляет особый интерес для исследований, поскольку существует высокая корреляционная зависимость между содержанием амилозы и резистентного крахмала, который оказывает позитивный эффект на здоровье человека, снижает риск ожирения и диабета. Представлены характеристики генетических методов RNAi и TILLING, использование которых позволяет существенно повысить содержание амилозы в зерне. Наиболее эффективным является метод RNAi, применение которого дает возможность повысить содержание амилозы до 70 % и более. Увеличение содержания амилозы в зерне пшеницы является радикальным путем повышения пищевой ценности пшеницы.