

УДК 633.1:663.031.031.2/.4

І. О. СУРЖЕНКО, мол. наук. співроб.,
М. В. ЧЕРВОНІС, к. с.-г. н., пров. наук. співроб.,
І. Г. ТОПОРАШ, к. т. н., пров. наук. співроб.,
С. С. ПОЛІЩУК, мол. наук. співроб.,
СГІ-НЦНС, Одеса
e-mail: surzhenko-od@mail.ru

СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ПОЛІПШЕННЯ ТРИТИКАЛЕ ЯК БІОЕНЕРГЕТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ ТА ЙОГО ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ З ІНШИМИ ЗЕРНОВИМИ КУЛЬТУРАМИ

Проведено порівняльний аналіз сортів тритикале з сортами основних зернових культур за показниками ефективності трансформації збіжжя в біоетанол та побічні продукти. Досліджено вплив генотипу ваксі на ферментабельність крохмалю пшениці, ячменю і кукурудзи та зроблено висновок про доцільність поліпшення крохмалю тритикале шляхом введення в його геном ваксі генів. Створено селекційний матеріал озимого тритикале з високою зерною продуктивністю, морозостійкістю та ферментабельністю. Розроблено програму та започатковано дослідження зі створення тритикале ваксі з використанням спеціальних генетичних систем.

Ключові слова: зернові культури, крохмаль, ферментабельність, біоетанол, гени *Wx*, *Ha*, критерії селекції.

Вступ. Широке використання біологічних видів палива у відповідності з принципами екологічно раціонального ведення сільського господарства відкриває нові можливості для стійкого розвитку сільських районів у межах ринково орієнтованої аграрної політики. Розвиток у сфері виробництва біоетанолу в Україні дасть можливість суттєво скоротити імпорт нафтопродуктів, підвищити енергетичну незалежність країни та екологічну безпеку довкілля. Згідно розрахунків українських аналітиків, застосування біоетанолу в споживчому бензині у межах 10 % скоротить об'єм імпортованої нафти до 700 тисяч тонн.

У той же час Україна має потужну зернову сировинну базу, яка може стати стабільним джерелом поновлюваного палива.

Тритикале завдяки унікальному поєднанню господарсько цінних ознак — стабільному та високому потенціалу урожайності зерна, високим адаптивним властивостям, комплексному імунітету до грибкових захворювань [1], високій ферментативній активності, кормовій цінності сухого збродженого залишку — є перспективною біоенергетичною культурою. Посівні площі під тритикале в світі перевищили 5,5 млн га, значна

частина з них знаходиться в Європі (у Польщі — 900 тис. га, у Німеччині — 600, у Білорусі — понад 500 тис. га. Вагому частину валового збору тритикале використовують для виробництва біоетанолу, оскільки саме ця культура найбільш вигідна для виробництва біопалива з-поміж основних зернових культур. На жаль, в Україні тритикале використовують в основному як кормову культуру, оскільки вона не набула поширення у хлібопекарстві, тому що алельний склад Gli/Glu локусів, які кодуєть біосинтез клейковинних білків, представлені, головним чином, алелями, характерними для сортів твердої пшениці. А це означає, що, незважаючи на участь у схрещуваннях м'якої пшениці, Gli/Glu алелі у більшості зразків тритикале відсутні. Потенціал хлібопекарської якості тритикале з урахуванням генетичної варіабельності Gli/Glu і Sec локусів є досить низький і може бути поліпшений лише шляхом цілеспрямованої інтрогресії в його геном алелів Gli/Glu локусів з позитивним ефектом на якість борошна та елімінації Sec локусів жита, що є дуже складною проблемою для селекціонера. Також слабкість тритикалевого борошна пояснюється фракційним складом його білків, які містять підвищену, порівняно з пшеничним борошном, кількість водорозчинних і солерозчинних фракцій та високою активністю протеолітичних ферментів.

Отже, цільове використання тритикале для переробки в технічний біоетанол чи харчовий спирт може бути найбільш прийнятним напрямом його технологічного використання. Воно успадкувало від жита високий рівень ендогенної ферментативної (амілазної) активності, яка має надзвичайно велике значення в процесі розщеплення молекул крохмалю до низькомолекулярних вуглеводів і зброджування їх до етилового спирту. Також зерно тритикале збагачене незамінними амінокислотами, в тому числі лізином, тому сухий зброджений залишок після ферментації та дистиляції зерна є цінним кормом для тварин.

Наші дослідження були сфокусовані на порівняльний аналіз тритикале з іншими зерновими культурами, вивчення ферментабельності його сортів та селекційних ліній, залучення в селекційний процес генетичного матеріалу, що контролює специфічні властивості крохмалю та зернову продуктивність.

Матеріал та методи дослідження. Вихід біоетанолу та побічних продуктів його переробки визначали за галузевим стандартом ГСТУ 46.045–2003 з власними модифікаціями; концентрацію етанолу — за допомогою пікнометрів та спеціальних розрахункових таблиць; вміст крохмалю — поляриметрично за ГОСТ 10845; вміст білка в зерні та сухому збродженому залишку — за ГОСТ 10846 методом Кьельдаля; вміст вологи у зерні — згідно ГОСТ 13586.5, у сухому збродженому залишку — згідно ГОСТ 13979.1.

Для дослідження використовували районовані сорти пшениці, тритикале, ячменю та гібриди кукурудзи Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, селекційний матеріал відділу генетичних основ селекції

СГІ — лінії пшениці ваксі та голозерного ячменю ваксі, лінії тритикале, які отримані від схрещування тритикале (Богдан) з лінією мексиканського тритикале ССТ, яка має хромосомне заміщення (5B)5D, лінії кукурудзи ваксі, створені у відділі селекції та насінництва кукурудзи СГІ.

Результати дослідження. Першим етапом досліджень був порівняльний аналіз ферментабельних властивостей основних зернових культур. Важливою генетично-селекційною ознакою є показник ефективності трансформації крохмалю зерна пшениці в біоетанол — вихід його на 1000 кг крохмалю. Саме цьому показнику, а не виходу біоетанолу з одиниці зерна, слід віддавати перевагу при селекції спиртодистильного напрямку [1]. За цим критерієм, як видно з таблиці 1, тритикале займає провідне місце.

Таблиця 1

Вихід абсолютного етанолу з 1 тонни крохмалю, л/1000 кг

Культура	n	Середнє значення	Максимальне значення	Мінімальне значення
Яре тритикале	12	573	604	540
Кукурудза	10	563	575	523
Озиме тритикале	10	549	593	511
Пшениця	6	547	571	529
Ячмінь	8	546	580	496
Просо	10	543	568	517
НСР _{0,05}	9,0			
НСР _{0,01}	12,2			

Крім етанолу важливим за значенням продуктом переробки зерна в біоетанол є сухий зброджений залишок. За технологією трансформації зерна в біоетанол він проходить кілька температурних стадій обробки, зокрема високотемпературну фазу (90–95 °С) протягом кількох годин, фази ферментації, дріжджового бродіння та дистиляції і висушування. Сухий зброджений залишок добре зберігається і може застосовуватися на корм як у чистому вигляді, так і у формі кормових сумішей. Висока кормова цінність зброженого залишку сортів та гібридів зернових культур зумовлюється високим вмістом легкоперетравлюваного білка, наявністю залишку крохмалю та бактеріальними добавками. Сухий зброджений залишок зерна тритикале має більш високу кормову цінність, ніж інших зернових культур, за вмістом вітамінів, кальцію, фосфору, токоферолів та амінокислотним складом білка.

Сорти та гібриди зернових культур суттєво відрізняються між собою за вмістом білка у зброженому залишку, який варіюється від 217 до 300 кг на тонну вихідної зернової маси (табл. 2). Та, як відомо, за амінокислотним складом білок зерна тритикале вигідно відрізняється за вмістом незамінних амінокислот — лізину, метіоніну, триптофану, треоніну.

Таблиця 2

Вміст білка в сухому збродженому залишку, %

Культура	n	Середнє значення	Максимальне значення	Мінімальне значення
Пшениця	6	40,1	45,5	36,5
Озиме тритикале	10	39,1	44,5	33,7
Яре тритикале	12	33,7	41,1	26,9
Ячмінь	8	33,7	41,1	26,9
Кукурудза	10	32,7	38,3	29,8
Просо	10	25,4	29,6	22,9
НСР _{0,05}	2,7			
НСР _{0,01}	3,6			

І ще одним продуктом трансформації зернового збіжжя в біоетанол є вуглекислий газ, який продукують у великій кількості дріжджі під час спиртового бродіння. Вуглекислий газ органічного походження, який, на відміну від синтетичного CO₂, не містить жодних токсичних домішок, має високий попит у компаній, що виготовляють газовані напої. Тому на сучасних технологічних лініях індустріального виробництва біоетанолу вуглекислий газ збирають, очищають та осушують (або зріджують) і використовують для газування харчових напоїв.

Як видно з таблиці 3, найактивніша емісія вуглекислого газу спостерігалася у гібридів кукурудзи (142,3 літра CO₂ на 1000 кг зерна), тоді як сорти ячменю, проса характеризувалися найнижчим виходом вуглекислого газу (120,3 та 122,6 літра відповідно).

Таблиця 3

Вихід вуглекислого газу під час спиртового бродіння, л/1000 кг збіжжя

Культура	n	Середнє значення	Максимальне значення	Мінімальне значення
Кукурудза	10	142,3	152,0	132,4
Озиме тритикале	10	135,8	142,5	128,1
Пшениця	6	135,2	137,5	131,4
Яре тритикале	12	132,5	137,5	127,3
Просо	10	122,6	127,3	117,1
Ячмінь	8	120,3	127,3	112,0
НСР _{0,05}	3,4			
НСР _{0,01}	4,5			

Сорти пшениці та тритикале за кількістю виділеного газу на однаковому рівні.

Порівняльний аналіз зернових культур за основними показниками ефективності трансформації збіжжя в біоетанол та побічні продукти виділяє тритикале як перспективну біоенергетичну культуру. Але виробництво біоетанолу з цієї культури може бути економічнішим та ефективнішим при підвищенні продуктивності та ферментабельних властивостей

крохмалю селекційно-генетичними методами — включенням у селекційний процес нових генів, що контролюють зернову продуктивність та беруть участь у синтезі крохмалю зерна.

Для створення селекційного матеріалу озимого тритикале з високою зерною продуктивністю та морозостійкістю залучали спеціальний генетичний матеріал. Як один з компонентів схрещування використали короткостеблеве високоморозостійке тритикале (сорт Богдан), отримане від схрещувань гексаплоїдного амфіплоїда синтетика ($2n=42$) зі зразком короткостеблового жита походженням від німецької компанії Петкус. У якості другого компонента схрещувань використали лінію мексиканського тритикале ССТ з хромосомним заміщенням (5B)5D. Ця унікальна лінія отримана від проф. Адама Лукашевського (Каліфорнійський університет, Ріверсайд, США) [2].

Відсутність хромосоми 5B створює умови для гомологічного спарювання не тільки хромосом пшениці, що належать до різних геномів, а також хромосом пшениці і жита. Слід зазначити, що пшениця і жито належать до різних ботанічних субтриб і генетично дуже віддалені. Тому в нормі при схрещуванні пшениці та жита хромосоми цих генетично різних культур не кон'югують, а тим більше не рекомбінують. Це по-перше. І по-друге, присутність хромосоми 5D, яка в нормі у гексаплоїдного тритикале відсутня, призводить до формування гранул крохмалю зі специфічною структурою. Тому при схрещуваннях тритикале за участю хромосомно-заміщеної (5B)5D лінії у гібридному потомстві відбувається потужний рекомбінаційний процес за участю гомеологічних хромосом як пшениці, так і жита. В результаті ми маємо різноманітний селекційний матеріал з широкою генетичною основою для добору.

Протягом декількох сезонів відібрані кращі зразки тритикале випробовувалися на морозостійкість. У 2011 році в результаті тривалої осінньої посухи перспективні лінії тритикале увійшли в зиму у фазі 2–3 листків і навіть без зачатків вузла кущіння. І все ж рослини вийшли на весну в чудовому стані, отримавши найвищий бал перезимівлі за умов, коли температура повітря опускалася до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ без снігового покриву. Жоден сорт озимої пшениці у цьому сезоні не одержав такої оцінки за морозостійкістю. Зразки тритикале випробовувалися також в незалежних дослідах Інституту фізіології рослин і генетики НАНУ. Умови перезимівлі дослідних посівів узимку 2013 р. характеризувалися потужними снігопадами та паводками у період відновлення весняної вегетації. І все ж наші зразки тритикале отримали найвищий бал за станом рослин після виходу із зими. Отже, ми маємо всі підстави стверджувати, що отримали цінний селекційний матеріал з високою морозо- і зимостійкістю.

Результати оцінки продуктивності зерна наших ліній тритикале наведені у таблиці 4. Можна бачити, що при середньому урожаї зерна стандартного сорту озимої пшениці Перлина Лісостепу 44,3 ц/га наші

лінії тритикале показали середній урожай 71,2 ц/га. А деякі з ліній наших тритикале перевищили сорт-стандарт озимої пшениці майже удвоє.

Таблиця 4

Результати випробування зразків озимого тритикале в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України, 2013 р.

Стандарт, зразок	Врожайність, ц/га			
	середнє значення	мінімальне значення	максимальне значення	± до стандарту
Перлина Лісостепу, ст.	44,3	37,0	49,5	–
ССТ(5В)5D х Богдан	71,2	50,5	89,0	+26

На цей час селекційний матеріал тритикале проходить лабораторну оцінку за виходом етанолу. Попередні результати свідчать, що ми отримали прекрасний селекційний матеріал з високою ферментабельністю та відмінними агрономічними показниками.

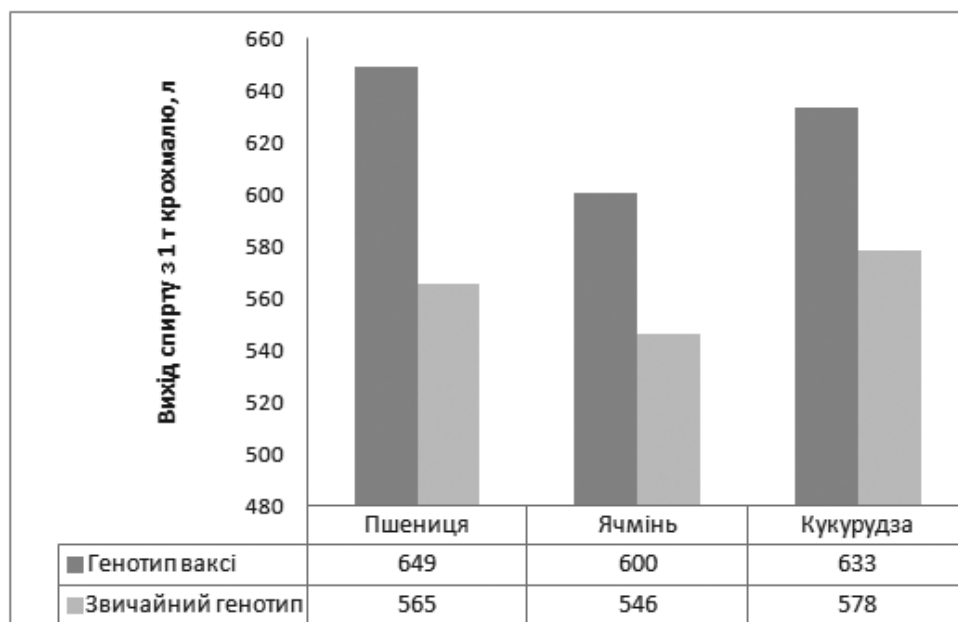


Рис. 1. Вплив генотипу ваксі на вихід абсолютного етанолу з 1 т крохмалю основних зернових культур

Виконані раніше у відділі генетичних основ селекції дослідження ефективності трансформації крохмалю зерна в етанол у різних зернових культур (пшениця, кукурудза, ячмінь) показали, що найвищу ферментабельність зерна мають генотипи з геном ваксі **Wx** і, відповідно, зміненим хімічним складом (нульовий вміст амілози) крохмалю та домінуючим геном, що контролює твердість зерна **Ha** [4, 5]. Оскільки ген **Ha** розміщений у хромосомі 5D, а тритикале в нормі цієї хромосоми не мають, то

переважна більшість сортів тритикале є м'якозерними і проблем у наявності у них гена **Ha** нема. Крохмаль ваксі має високі ферментабельні властивості завдяки тому, що він більш чутливий до механічної дії робочих органів млина [6].

Як видно з рисунка 1, генотипи ваксі значно перевищують за виходом етанолу з 1 т крохмалю генотипи звичайних комерційних сортів та гібридів досліджуваних культур.

Якщо порівнювати вплив генотипу ваксі по культурах, відсутність амілози в крохмалі найбільше вплинула на ферментабельність крохмалю пшениці, що підтверджує доцільність поліпшення крохмалю тритикале шляхом введення в його геном ваксі генів. Тому було започатковано дослідження зі створення тритикале ваксі. Робоча гіпотеза і програма досліджень базується на використанні у схрещуваннях створеного у відділі генетичних основ селекції СГІ сорту пшениці ваксі Софійка та кращих селекційних зразків тритикале, отриманих з використанням хромосомного заміщення 5B(5D). Фактично два рецесивні алелі гена *Wx*, а саме: *wx-A1* (7AS) і *wx-B1* (4AL) локалізовані в геномі А пшениці, в геномі В *wx*-алеля нема взагалі, а алель *wx-D1* (7DS) у тритикале, на відміну від пшениці м'якої, взагалі відсутній. Стосовно локалізації гена *Wx* у геномі тритикале ми інформації не маємо. Імовірно, що одна з житніх хромосом містить домінантний алель гена *Wx*, але яка саме, нам не відомо (рис. 2).

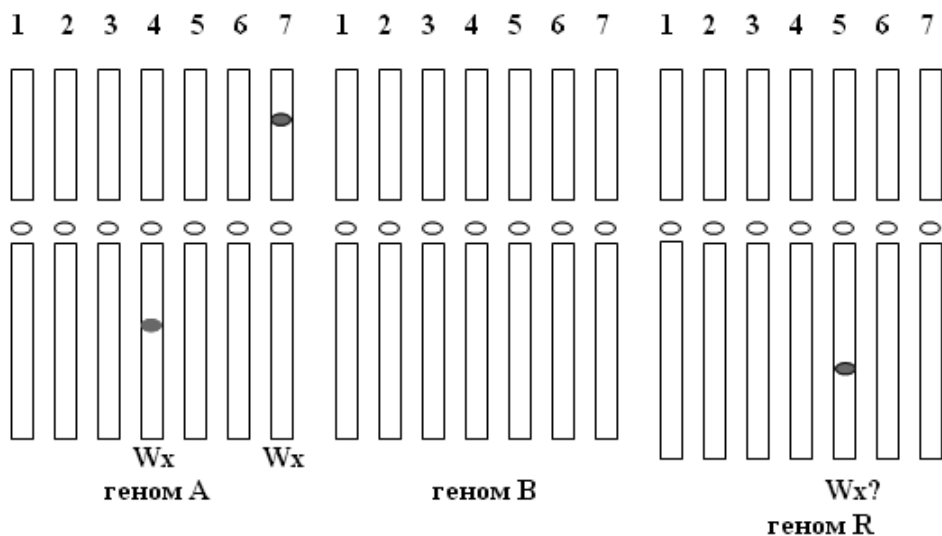


Рис. 2. Гіпотетична цитогенетична геномна структура тритикале за локалізацією алелів гена *Wx*

Для здійснення цієї доволі складної роботи нами у співробітництві з Інститутом клітинної біології і генної інженерії опрацьована процедура ідентифікації генотипів «частково ваксі» на матеріалі пшениці за допомогою оптимізованої процедури ПЛР. Ця процедура буде застосовуватися при скринінгу генотипів ваксі на гібридному матеріалі тритикале.

Досліджуваним матеріалом були гібриди F_5 пшениці, отримані від схрещування сорту Куяльник з ярою ваксі лінією (потрійний рецесив $wx/wx/wx$) $Wx-12$.

Як позитивний контроль на наявність нуль-алелів за всіма генами Wx використовували сорт пшениці ваксі Софійка.

На цей час нами отримані рослини F_1 і зерно F_2 від схрещування кількох наших кращих зразків тритикале з комбінації ССТ(5В)5D х Богдан з сортом пшениці ваксі Софійка. Матеріал планується оцінити за комплексною системою методів оцінки якості селекційного матеріалу спирто-дистилятного напрямку.

Висновки. Отже, за результатами досліджень можна зробити висновок, що тритикале має високий потенціал для промислової переробки зерна в етанол та харчовий спирт за найбільш доцільним напрямом його використання.

Порівняльний аналіз сортів тритикале з сортами основних зернових культур виділив тритикале як перспективну біоенергетичну культуру за виходом абсолютного етанолу з 1 тонни крохмалю, вмістом білка в сухому збродженому залишку, виходом вуглекислого газу під час спиртового бродіння.

Для створення селекційного матеріалу з ознаками високої продуктивності, зимостійкості та ферментабельності використали такі селекційно-генетичні прийоми:

– хромосомне заміщення 5В(5D) як джерело індукованої відсутності хромосоми 5В (ген **рН**) міжхромосомної (пшениця / жито) рекомбінації, що є ефективним способом індукування (алосиндезу) генетичної варіабільності;

– залучення генів ваксі, які беруть участь у блокуванні синтезу амілози.

Залучення у селекційний процес нових генів, що контролюють зернову продуктивність та беруть участь у синтезі крохмалю зерна, підвищать економічність та ефективність виробництва біоетанолу з тритикале.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Спеціальна селекція польових культур / [В. С. Гірко, В. Д. Бугайов, С. П. Васильківський та ін.]. — Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2010. — 369 с.
2. Червоніс М. В., Сурженко І. О. Селекційні критерії сортів та гібридів зернових культур для виробництва біоетанолу // Збірник наукових праць СГІ. — 2009. — № 4 (54). — С. 27–36.
3. Рибалка О. І., Червоніс М. В., Моргун Б. В. та ін. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна // Физиология и биохимия культурных растений. — 2013. — Т. 45, № 1. — С. 3–19.
4. Червоніс М. В., Сурженко І. О., Аксельруд Д. В. Створення і дослідження генетичного матеріалу для селекції пшениці спирто-дистилятного напрямку // Збірник наукових праць СГІ, вип. 16 (56). — Одеса, 2010. — С. 33–38.

5. Рибалка О. І., Топораш І. Г., Червоніс М. В., Сурженко І. О. Пшениця ваксі з унікальними властивостями крохмалю: можливі напрямки її використання // Хранение и переработка зерна. — 2005. — № 7 (73). — С. 24–28.
6. Bettge A. Susceptibility of waxy starch granules to mechanical damage / A. Bettge, M. Giroux, C. Morris // Cereal Chemistry. — 2000. — Vol. 77. — P. 750–753.

Надійшла 04.11.2014.

UDC 633.1:663.031.031.2/.4

Surzhenko I. O., Chervonis M. V., Toporash I. G., Policshuk S. S.
Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

BREEDING AND GENETIC METHODS OF TRITICALE IMPROVEMENT AS BIOENERGETIC CROP AND ITS COMPARATIVE ANALYSIS WITH OTHER GRAIN CROPS

A comparative analysis of triticale varieties with varieties of major cereals by transformation criteria of grain to ethanol and by-products was made. The effect of wax genotype on starch transformation efficiency of wheat, barley and maize was investigated. Concluded feasibility of improving triticale starch by introducing Wax genes. A breeding stuff of winter triticale with high productivity, frost resistance and starch transformation efficiency was created. The program and researches of creation of wax triticale using special genetic systems were developed.

УДК 633.1:663.031.031.2/.4

Сурженко И. А., Червонис М. В., Топораш И. Г., Полищук С. С.

СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УЛУЧШЕНИЯ ТРИТИКАЛЕ КАК БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И ЕГО СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С ДРУГИМИ ЗЕРНОВЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Проведен сравнительный анализ сортов тритикале с сортами основных зерновых культур по показателям эффективности трансформации зерна в биоэтанол и побочные продукты. Исследовано влияние генотипа вакси на ферментативность крахмала пшеницы, ячменя и кукурузы, сделан вывод о целесообразности улучшения крахмала тритикале путем введения в его геном генов вакси. Создан селекционный материал озимого тритикале с высокой зерновой производительностью, морозостойкостью и ферментативностью. Разработана программа создания тритикале вакси с использованием специальных генетических приемов.