

**В. І. Січка**, доктор біологічних наук

*Селекційно-генетичний інститут*

## **МЕТОДИ СТВОРЕННЯ СОРТІВ СОЇ З ПОКРАЩЕНИМ БІОХІМІЧНИМ СКЛАДОМ НАСІННЯ**

*Наведені результати селекційної роботи по створенню високобілкових сортів сої з підвищеним рівнем насінневої продуктивності. Показані можливості поєднання обох цих показників у одному генотипі. Шляхом гібридизації географічно і генетично віддалених форм вивели сорти з вмістом білка в насінні 39—41%, які занесені до державного реєстру рослин України. Обговорені методичні питання подальшого збільшення вмісту білка в насінні сої селекційним шляхом.*

Соє є головною білково-олійною культурою світу, посівні площі якої перевищують 100 млн гектарів. Суттєве збільшення виробництва культури в останні роки має місце і в Україні. Якщо у 2002 році її висівали на площі близько 100 тис. гектарів, то у 2010—2011 роках нею зайняли більше 1 млн гектарів. Така динаміка виробництва обумовлена високою цінністю її насіння, яке містить багато збалансованого за амінокислотним складом білка і досить цінну олію. За цими показниками соє є унікальною культурою. Крім того, в симбіозі із бульбочковими бактеріями вона здатна за вегетаційний період зв'язати з повітря на одному гектарі 100—120 кг азоту. Враховуючи цінний склад насіння, на сьогоднішній день культура складає основу як рослинного білка, так і харчової олії.

Незважаючи на високі кормові й харчові якості насіння сої, у світі проводяться інтенсивні наукові дослідження, направлені на поліпшення біохімічного його складу. Так в останньому десятиріччі генетико-селекційними методами створені безінгібіторні лінії, виділений ряд форм зі зміненим жирнокислотним складом олії, виявлені колекційні сортозразки, у яких частково або повністю відсутня ліпоксигеназна активність.

На сьогоднішній день найбільш актуальним напрямом такої діяльності є підвищення білка в насінні, оскільки майже у всіх країнах світу відчувається його дефіцит. Завдання нашого дослідження полягає в аналізі мінливості основних компонентів соєвого насіння, а також деяких факторів, які впливають на його кормові та харчові якості. Серед останніх суттєве значення мають інгібітори трипсину і уреазна активність, які значно погіршують ефективність використання сирової сої тваринами та птицею, та фе-

рмент ліпоксигеназа, який надає неприємні «трав'яний» присмак і запах при застосуванні сої як сировини для одержання харчових продуктів.

Якщо на початку інтенсивного впровадження сої ставку робили як на олійну культуру, то в останні роки акцент все більше переноситься на її роль як джерела білка, особливо харчового.

Продукти переробки сої, шрот і макуха, є основними компонентами комбікормів для годівлі сільськогосподарських тварин, птиці, риб і домашніх тварин. Їх кількість, яка йде на ці цілі, щорічно зростає і в наші дні шрот є ведучим серед високопротеїнових компонентів. Особлива його цінність полягає в добре збалансованому складі незамінних амінокислот, особливо лізину, на який бідні всі злакові фуражні культури. На сьогоднішній день соєвий шрот або макуха є самим дешевим джерелом кормового і харчового лізину. Крім того, соєпродукти містять багато вітамінів, макро- та мікроелементів, а також інших біологічно активних компонентів.

**Матеріали та методика досліджень.** У польових умовах степової зони України вивчали урожай колекційних форм, нових і районованих сортів, а також селекційних ліній сої, створених в науково-дослідних установах країни. Площа ділянок 15 м<sup>2</sup>, повторність – 5-кратна. Фенологічні спостереження, обліки та аналізи проводили згідно методики державного сортовипробування сільськогосподарських культур. Насіння перед сівбою обов'язково обробляли виробничими штамми бульбочкових бактерій.

Вміст білка визначали методом К'ельдаля, олії – за Рушковським.

**Результати досліджень.** Об'єктивно оцінити такі показники якості насіння сої як вміст білка та жиру, активність інгібітора трипсину і ліпоксигенази можливо лише на основі аналізу за ряд років, оскільки на них суттєво впливають фактори довкілля. У зв'язку з цим ми вивчаємо колекційні форми, нові та районовані сорти, селекційні лінії протягом тривалого часу, що дає змогу прослідкувати їх реакцію на дуже контрастні умови, які складаються у південній зоні України. В окремі роки тут має місце оптимальна кількість опадів, за якої урожай насіння сої знаходиться на рівні 20 ц/га і вище. Дуже часто трапляються посушливі роки, коли урожай знижується до 3—4 ц/га. Таким чином у цій зоні існує можливість виявити генетичну мінливість генотипів сої за широкої амплітуди факторів зовнішнього середовища і на цій основі виділити форми зі стабільними показниками якості насіння. Наші попередні дослідження свідчать про високий рівень мінливості як вмісту білка, так і жиру [1, 2]. На цьому етапі було показано, що рівень білковості насіння сої не залежить від тривалості як вегетаційного періоду, так і окремих його фаз. На основі цього ми зробили висновок про можливість виведення селекційним шляхом високобілкових форм сої різних груп стиглості. У цих дослідженнях було чітко показана різна мінливість як за вмістом білка, так і за активністю інгібітора трипсину, уреазы та ліпоксигенази [2].

Подальші дослідження проводили з більш розширеним набором сортів (табл. 1). У середньому за п'ять років вміст білка в насінні вище 39% мав місце у сортів Одеська 150А і Берегиня. Це досить високе значення і, що особливо важливо, ці сорти також виділяються істотними рівнями насінневої продуктивності та займають значні площі у виробництві. У сортів одеської селекції Васильківська, Валентія, Чорнобура, Мар'яна, Альтаір, Аркадія одеська, Хаджибей, Успіх білковість насіння знаходилась в межах 38—38,7%. Це теж вагомий показник. Високим вмістом білка в насінні виділялись також сорти селекції ННЦ «Інститут землеробства» Київська 98 і Єлена, де цей компонент досяг значення 38,4 і 38,3% відповідно. Ці сорти характеризуються також скоростиглістю та суттєвою насінневою продуктивністю. Необхідно зазначити, що наведені в таблиці 1 всі сорти мають істотний рівень білковості насіння, за виключенням Юг 30. Це твердження відноситься також до американських сортів нетрансгенного походження Еванс, Ламберт, Паркер, Хардін 91 і Маркус. Хотів би зазначити, що, як правило, нові генетично модифіковані американські сорти мають у своєму насінні досить мало білка (28—32%).

Наведені в таблиці 1 вітчизняні сорти практично всі занесені до державного реєстру і більшість вирощується на великих площах. Ці дані свідчать про великі можливості поєднання в одному генотипі підвищених врожайності та білковості насіння селекційними методами.

Приблизно такий же рівень білка, як і у національних стандартів різних груп стиглості, спостерігається і у ліній конкурсного випробування (табл. 2). Ці форми, в середньому за кілька років, переважали свої стандарти за насінневою продуктивністю й одночасно виділялись підвищеним рівнем білковості.

На даному етапі селекції нами виведені сорти сої, у яких поєднується висока урожайність з рівнем білковості насіння в залежності від умов 39—41%. На наступному етапі роботи плануємо створити сорти ще з більш високим рівнем білка.

Для вирішення цього завдання в селекційну роботу залучаємо японські, китайські та корейські сорти, які виділяються дуже високим значенням цього компоненту насіння. Рівень білковості деяких із них наведений у таблиці 3. Ми вважаємо, що залучення їх у гібридизацію дасть змогу створити нові форми, білковість насіння яких буде на 1—2% вищим порівняно з сучасними стандартами.

Наведені дані свідчать про те, що вітчизняна селекція сої досягла значних успіхів у покращанні біохімічного складу насіння. Сучасні сорти добре поєднують високу насінневу продуктивність і підвищений рівень білка. Це свідчить про те, що у сої не існує дуже тісної негативної кореляції між вмістом білка та продуктивністю. Як правило, від'ємний зв'язок у цієї культури має місце між кількістю білка та жиру. Тому в селекційному

процесі при створенні сортів універсального типу поєднують середні значення цих показників. Але при виведенні форм харчового типу перевагу надають білковості, в певній мірі нехтуючи рівнем олійності.

### 1. Вміст білка в насінні сортів сої екологічного випробування

Сорт	Вміст білка, %					
	Роки					середній
	2004	2005	2006	2007	2008	
1	2	3	4	5	6	7
Устя	37,1	34,7	39,6	38,7	39,0	37,8
Юг 30	33,6	31,9	35,9	36,7	36,5	34,9
Медея	37,3	34,5	38,5	36,4	37,4	36,8
Мар'яна	39,1	35,3	39,6	38,8	38,0	38,2
Васильківська	38,2	34,4	39,2	40,7	38,6	38,2
Валентія	39,3	34,7	38,1	40,9	39,1	38,4
Чорнобура	38,7	33,8	40,3	38,2	39,0	38,0
Аполон	36,9	32,2	36,9	38,3	37,4	36,3
Альтаір	37,7	40,2	39,6	38,6	37,3	38,7
Фаетон	35,9	36,3	39,5	38,7	37,3	37,5
Аркадія одеська	41,1	35,3	40,1	39,0	37,0	38,5
Романтика	36,6	35,6	37,8	39,4	36,2	37,1
Чернівецька 9	37,5	35,3	36,5	37,9	35,6	36,6
Ізмурдна	37,9	35,4	39,1	37,8	37,0	37,4
Валюта	37,4	36,8	38,6	37,5	36,0	37,3
Донька	38,7	35,0	36,5	38,8	36,5	37,1
Хаджибей	39,6	36,1	39,3	41,4	36,0	38,5
Одеська 150	40,9	37,1	40,4	41,2	38,2	39,6
Берегиня	39,2	37,1	39,4	40,8	39,5	39,2
Успіх	37,3	35,8	38,5	41,0	37,9	38,0
Деймос	37,1	35,1	38,3	39,4	37,5	37,5
Ельдорадо	36,5	34,0	38,1	39,9	38,0	37,3
Ятрань	37,5	34,7	38,3	38,0	36,0	36,9
Степовичка 4	37,2	35,6	39,2	39,6	36,1	37,5
Київська 98	40,3	34,7	39,4	40,1	37,4	38,4
Єлена	39,7	33,8	40,0	38,9	38,9	38,3
Юр'ївка	37,5	35,2	38,8	39,8	40,3	38,3
Ювілейна	37,6	35,0	37,8	38,3	36,6	37,1
Знахідка	36,3	30,9	40,5	38,5	38,0	36,8
Еванс	37,0	37,3	35,3	39,2	35,8	37,6
Ламберт	37,9	35,9	37,3	38,8	38,1	37,6
Паркер	38,3	34,6	36,8	38,9	37,0	37,1
Хардін 91	38,1	35,1	36,3	38,4	37,6	37,1
Маркус	37,3	35,7	36,4	38,6	36,3	36,9
Аметист	37,5	34,1	38,0	38,5	37,4	37,1

Високобілкові форми сої були одержані також в інших країнах. Наприклад в Кореї на Національній експериментальній станції польових культур шляхом гібридизації створили сорти *Danbaegkong* і *Kwangankong* з вмістом білка в насінні 48 і 45% відповідно [3]. У Китаї серед 16000 колек-

ційних сортозразків культурної сої виявили 32,7% з кількістю білка 45—48%, а у 6,6% форм рівень даного компоненту насіння сягав 48—50% [4]. Із колекції дикої сої *G. soja*, яка налічувала 6000 зразків, виділили 6,3% з вмістом білка в насінні більше 50%.

## 2. Високобілкові лінії сої конкурсного сортовипробування

Походження	Вміст білка, %			Сер.
	Роки			
	2007	2008	2009	
Устя, ст.	40,8	40,3	41,6	40,9
Васильківська, ст.	41,7	40,2	43,3	41,7
Аркадія одеська, ст.	40,9	39,5	41,4	40,6
Ятрань, ст.	40,4	38,8	39,7	39,6
Успіх, ст.	41,1	39,6	41,2	40,6
Мельпомена, ст.	40,7	39,8	40,4	40,3
№ 7293/98	41,4	39,7	42,0	41,0
№ 5028/99	41,0	39,3	42,4	40,9
№ 8739/95	39,7	40,9	42,3	41,0
K-532x ms <sub>1</sub> Urbana	40,4	39,6	42,3	40,8
№ 25913/95	40,3	39,5	42,1	40,6
№ 6922-95	41,0	40,8	42,0	41,3
Смена x Свіфт	40,7	38,9	42,2	40,6
Іскра x ВНІМК 9186	41,9	39,2	42,1	41,1
№ 17725/99	40,8	39,9	42,1	40,9
№ 7638/99	42,0	39,2	42,2	41,1
№ 25736/96	41,5	39,3	42,0	40,9
№ 5883/95	40,8	39,7	42,1	40,9

Основними запасними білками сої є глобуліни –  $\beta$ -конгліцінін (7S) і гліцінін (11S), які різняться амінокислотним складом і суттєво впливають на функціональні властивості сумарних білків насіння. Соевий гліцінін являє собою комплекс шести різних субодиниць, кожна із яких складається із кислотної та основної білкових молекул, сполучених між собою дисульфідним зв'язком. У результаті молекулярно-генетичних досліджень ідентифікували як кислотні молекули ( $A_{1a}$ ,  $A_{1b}$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  і  $A_5$ ), так і основні ( $B_{1a}$ ,  $B_{1b}$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ) [5, 6]. Нагромаджені дані свідчать про те, що поліпептиди запасних білків кодуються близькоспорідненою сім'єю генів, які походять від одного локусу. Показано, що субодиниці  $A_{1a}B_2$ ,  $A_{1b}B_{1b}$  і  $A_2B_{1a}$  містять в 3—4 рази більше метіонінових залишків, ніж інші [7].

$\beta$ -конгліцінін являє собою тример, до складу якого входить 3 субодиниці, позначені як  $\alpha'$ ,  $\alpha$  і  $\beta$ . Молекулярна маса перших субодиниць дорівнює відповідно 72 і 68 кД, другої – 52 кД. Важливо відмітити, що  $\alpha'$  і  $\alpha$  несуть по одному залишку SH, тоді як у  $\beta$  він відсутній. У жодній із цих субодиниць не виявлено залишок SS [8].

Гени, які кодують цей запасний білок, являють собою мультигенну сім'ю, частина із них формує тандеми, інші розташовані в хромосомах ди-

сперсно [9]. У цьому дослідженні ідентифікували 15 генів, які беруть участь у синтезі різних субодиниць.

### 3. Вміст білка у колекційних форм сої

Назва сорту	Вміст білка, %		
	2008 р.	2009 р.	середнє
Амурська 41	42,7	41,3	42,0
Rana	41,6	44,1	42,8
Semu 8001	41,5	43,5	42,5
Baltimore	40,9	43,4	42,2
РАН-182xDong nong	42,3	46,0	44,2
Сорт овочевого типу	44,8	47,6	46,0
Otunato	42,0	43,6	42,8
BIP-5048	42,6	43,7	43,2
Pagoda	41,2	44,2	42,7

Проведені у Японії досліди чітко довели, що фізико-хімічні особливості сумарних соєвих білків суттєво залежать від співвідношення 7S і 11S фракцій. Гліцінін формує мутний, більш твердий гель, який слабо деформує, тоді як у $\beta$ -конгліцініну він м'який, прозорий і еластичний [10]. Збільшення кількості –SH груп призводить до підвищення твердості й зменшення еластичності гелю. Поліпептид  $A_2$  тісно пов'язаний з його мутністю, а  $A_3$  з твердістю. Субодиниця  $A_5A_4V_3$  сприяє легкості формування гелю. Якості емульсії суттєво залежать від зв'язування води. Відомо, що  $\beta$ -конгліцінін є більш гідрофобним, його здатність як до формування емульсії, так і її стабілізації є значно кращою, ніж у гліцініну.

Одержані в останні роки результати свідчать про значну мінливість як за складом основних запасних білків сої, так і за їх співвідношенням. Ягасакі з співавторами створили 8 ізогенних ліній сої на базі сорту Енрей, у яких були відсутні субодиниці групи I ( $A_{1a}V_2$ ,  $A_{1b}V_{1b}$  і  $A_2V_{1a}$ ), а також  $A_5A_4V_3$  і  $A_3V_4$  [1]. У сорту Енрей співвідношення між 11S і 7S фракціями білка у молоці складало 58 і 42% при наявності субодиниць групи I і  $A_3V_4$  та відсутності  $A_5A_4V_3$ . У ізогенної лінії  $EnV_2 - 111$ , у білку якої були наявні всі вищеназвані субодиниці, це співвідношення досягло 66 : 34%. Нарешті, у ізолінії  $EnV_2-000$ , у білку якої були відсутні всі три субодиниці, кількість 11S фракції у молоці зменшилась до 12%, а 7S зросла до 88%. Між цими крайніми генотипами мала місце значна кількість проміжних варіантів. Важливо зауважити, що одержане із молока цих ізоліній тофу дуже різнилось за технологічною оцінкою. Якщо для розриву одержаного із вихідного сорту тофу необхідно прикласти зусилля в 9,9 Ра, то розірвати цей продукт, виготовлений із молока ізолінії  $EnV_2 - 100$ , можливо при зусиллі в 7,2 Ра, а із ізолінії  $EnV_2 - 000$  – при зусиллі 3,0 Ра. Ці приклади наглядно ілюструють величезні можливості технологічних змін соєвого молока й виготовлених з нього продуктів шляхом комбінування різних генів, які ко-

дують синтез запасних білків сої. Наявність значної кількості фракції гліциніну 11S забезпечує підвищену твердість утворюваного гелю. Ці експериментальні дані свідчать про можливість створення сортів сої з запланованим співвідношенням 11S і 7S фракцій білків. В Японії серед колекційного матеріалу виявили дику лінію сої QT<sub>2</sub>, у якої повністю відсутній β-конгліцінін [11]. Дана ознака контролюється однією парою домінуючих алелей Scg. Шляхом бекросу цей ген перенесли у культурний сорт сої *Fukiuyutaka*. Гомозиготні лінії з геном Scg суттєво не відрізнялись від вихідного сорту за тривалістю вегетації і періодом від сходів до цвітіння, габітусом куща, насінневою продуктивністю, масою 1000 насінин, вмістом білка й олії. В результаті виділили лінію Куу - Кеї 305, у насінні якої повністю відсутній β-конгліцінін і яка має досить добрий набір агрономічних ознак. Крім того, її білок має значно менші алергенні властивості за рахунок відсутності α- і β- субодиниць 7S білка. Мутанти подібного типу одержали також шляхом опромінення насіння культурної сої гама-променями [12]. В результаті створили сорт *Tohoku 124* з підвищеним рівнем гліциніну і зменшеною кількістю компонентів білка, які здатні спричинити алергію у людей.

Наші дослідження також виявили неоднакове співвідношення 7S і 11S фракцій в залежності від сорту та умов вирощування [13, 14]. Електрофоретичний аналіз показав наявність 4 компонентів у кожній із цих фракцій, які характеризувались різною молекулярною масою.

#### **Висновки.**

1. Шляхом гібридизації географічно і генетично віддалених форм сої вивели високопродуктивні сорти з рівнем білковості насіння 39—41%.

2. Серед нового колекційного матеріалу виявили генотипи, які за умов Степу України нагромаджують в насінні 44—46%. Ці сортозразки залучені до гібридизації з метою створення принципово нового вихідного матеріалу.

3. Кількісний вміст 7S і 11S глобулінів у вивчених нами сортів сої змінювався в межах 32,6—40,3% і 24,2—36,8% від загальної кількості білка відповідно.

#### **Бібліографічний список**

1. Сичкарь В. И., Левицкий А. П. Биологическая характеристика, генетическая изменчивость антипитательных веществ сои и перспективы селекции по улучшению питательного качества зерна // Биология, селекция и генетика сои. – Новосибирск, 1986. – С. 4—15.

2. Коруняк О. П., Сичкар В. І., Лаврова Г. Д., Мікус В. Є., Голохоринська М. Г. Виявлення вихідного матеріалу для створення сортів сої з покращеним біохімічним складом насіння // Збірник наукових праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса, 2006. – С. 179—189.

3. *Kim S. D., Kim K. H., Park H. K.* Soybean breeding for processing and utilization in Korea // Proc. The Third Int. Soybean Proc. And Util. Conf. October 15—20, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 2000. – P. 23—28.
4. *Fu Cuizhen, Qiu Lijuan, Chang Ruzhen.* Evaluation quality of China's soybean germplasm resources quality // Там же, С. 41—42.
5. *Moreira M. A., Hermodsen M. H., Larkins B. A., Nielsen N. C.* Comparison of the primary structure of the acidic polipeptides of glycinin // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – № 210. – P. 633—642.
6. *Staswick P. S., Nielsen N. C.* Characterization of a soybean cultivars lacking several glycinin subunits // Arch. Biochem. Biophys. – 1983. – V. 223. – P. 1—8.
7. *Nielsen N. C.* Molecular feature of proteins in soybeans // World Soybean Res. Conf. III. Proceeding.- Wesview Press, Boulder and London.- 1985.- P. 281—290.
8. *Fukushima D.* Recent progress in research and technology for processing and utilization of soybeans // Program Committee for ISPUC-III (Chair Saio Kyoko).- Korin Publishing Co., Japan.- 2000.- P. 11—16.
9. *Harada J. J., Barker S. J., Goldberg R. B.* Soybean  $\beta$ -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional processes // Plant Cell. – 1989.-№ 1. – P. 257—291.
10. *Utsumi S., Matsumura Y., Mori T.* Food proteins and their applications. Ed. Damodaran S., Paraf A., Marcel Dekker. – New York.- 1997. – P. 257—291.
11. *Hajika M., Takahashi M., Sakai S., Matsunaga R.* Dominant inheritance of a trait lacking  $\beta$ -conglycinin detected in a wild soybean line // Bred. Sci. – 1998. – № 48. – P. 383—386.
12. *Takahashi K., Sakai T., Takada Y., Shimada S.* High glycinin low allergen soybean developed by  $\gamma$ -ray irradiation // Program Committee for ISPUC – III (Chair Saio Kyoko).- Korin Publishing Co., Japan. – 2000. – P. 43—44.
13. *Адамовская В. Г., Молодченкова О. О., Сичкаръ В. И., Цисельская Л. И., Сагайдак Т. В.* Сравнительный анализ методов фракционирования запасных белков 7S и 11S глобулинов в зерне сои // Збірник наукових праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса, 2007. – Вип. 9 (49). – С. 103—112.
14. *Адамовская В. Г., Молодченкова О. О., Сичкаръ В. И., Цисельская Л. И., Сагайдак Т.* Белково-ферментный комплекс семян сои (*Glycine max* L.) и гороха (*Pisum sativum* L.) // Збірник наукових праць СГІ – НЦНС. – Одеса, 2009. – С. 151—159.