



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 575.113.2:577.112.82

© 2018

НОВІ НАПРЯМИ В СЕЛЕКЦІЇ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР НА ЯКІСТЬ ЗЕРНА

О.І. Рибалка¹, С.С. Поліщук², Б.В. Моргун³

¹доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України

²кандидат сільськогосподарських наук, ³кандидат біологічних наук

^{1,2}Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення
Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна

³Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. акад. Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна

e-mail: ¹rybalkaalexander@gmail.com, ²Pol.sergey@ukr.net, ³bmorgun@gmail.com

Надійшла 9.09.2018

Мета. Привернути увагу до проблеми поліпшення якості зерна злаків, яка є питанням № 1 у розвинених країнах світу. **Методи.** Польові, лабораторні, електрофорезу білків, полімеразної ланцюгової реакції, технологічного аналізу зерна і борошна, визначення антиоксидантної активності зерна, хроматографічного аналізу. Використано також оригінальні методи електрофоретичного аналізу та аналізу якості зерна, розроблені у відділі генетичних основ селекції Селекційно-генетичного інституту, які стали наразі стандартними аналітичними процедурами. **Результати.** Одним із перспективних напрямів поліпшення якості зерна пшениці та комплексу інших агрономічних характеристик є використання генетичної плазми дикорослих видів-носіїв ключового геному D культурної пшениці егілопсів *Ae. tauschii* ($2n=2x=14$) та *Ae. cylindrica* ($2n=4x=28$). Генетичні маніпуляції з генами *Wx* (*Wax*) та *SBE1a* дають змогу ефективно керувати співвідношенням амілоза/амілопектин у складі крохмалю, змінювати його біохімічні властивості і технологічні характеристики зерна пшениці, ячменю і тритикале. Використання в селекції пшениці, голозерного ячменю і тритикале генетичних факторів впливу на біохімічний склад крохмалю відкриє нові напрями селекції сортів цих культур з особливими біохімічними та технологічними характеристиками зерна як сировини для створення нових харчових продуктів. Викладено концепцію селекції нового технологічного класу м'якої пшениці в Україні — круп'яного напрямку використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна. **Висновки.** Зерно злаків є головним харчовим джерелом унікальної дієтичної клітковини, рослинних антиоксидантів і ключових мінералів — 3-х складових, що становлять основу сучасної нутриціології і дієтології та здорового харчування. Результати проведених досліджень підтверджують, що поліпшення харчової цінності зерна зла-

ків маніпуляцією з генами, які впливають на біохімічні властивості зерна, має стати першочерговим завданням у стратегії поліпшенні якості зерна злакових культур, як основи для створення продуктів здорового (функціонального) харчування української нації.

Ключові слова: *pre-breeding*, пшениця, ячмінь голозерний, тритикале, якість зерна, білки, резистентний крохмаль, інтрогресія генів, амілоза, амілопектин.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-16>

Сучасні селекційні програми потребують постійного збагачення новою генетичною плазмою — це умова, без якої прогрес у селекції неможливий. У розвинених країнах світу кожна поважна селекційна установа має спеціальний підрозділ, що зветься *pre-breeding*, метою якого є створення вихідного матеріалу для селекції на основі використання новітніх біотехнологічних розробок. Сучасні трансгенні технології та нетрансгенні технології редагування геномів, такі, як CRISPR-Cas9 (Cas13a) і технологія цілеспрямованих мутацій TILLING, дають змогу отримувати новітній генетичний матеріал для селекції, якого раніше ніколи не було в природі [1].

Мета роботи — узагальнення результатів багаторічних досліджень у галузі якості зерна злаків, які проводять у відділі генетичних основ селекції Селекційно-генетичного інституту. Головну увагу зосереджено на необхідності збагачення селекційних програм новим генетичним різноманіттям у системі *pre-breeding*, яка передувє власне селекції. Акцентовано на потребі впровадження в селекційний процес нового генетичного матеріалу як основи для створення нового покоління сортів злаків із технологічними особливостями зерна, необхідними для розробки та виробництва в Україні продуктів здорового (функціонального) харчування.

Методи досліджень. Використовували систему методів лабораторних і польових досліджень. Здійснювали методичну кооперацію з іншими науковими установами: Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України, Інститутом клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Інститутом рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН. Застосовано відомі методи електрофорезу білків, полімеразної ланцюгової

реакції (ПЛР), технологічного аналізу зерна і борошна, визначення антиоксидантної активності зерна, хроматографічного аналізу. Використано також оригінальні методи електрофоретичного аналізу та аналізу якості зерна, розроблені безпосередньо у відділі генетичних основ селекції Селекційно-генетичного інституту, які стали наразі стандартними аналітичними процедурами.

Польові дослідження виконували на 4-х культурах: пшениці озимій, тритикале озимому, ячменю озимому (альтернативному) та ярому голозерному.

Дослідження включають роботу з матеріалом від віддалених схрещувань і спеціальних схрещувань із використанням оригінального генетичного матеріалу: мутантних і рекомбінантних ліній, хромосомних транслокацій, колекційного матеріалу.

Результати досліджень. Попри фантастичні можливості новітніх технологій ресурс такого потужного джерела генетичної плазми, як відділена гібридизація, ще далеко невичерпаний. Прикладом може бути пшениця, де інтрогресія в культуру генетичного різноманіття віддалених видів триває вже не одне десятиліття і досі залишається джерелом цінних генів для поліпшення нових сортів. Донині для створення нового селекційного матеріалу пшениці в провідних селекційних центрах світу найактивніше використовують генетичне різноманіття дикорослого егілопсу *Ae. tauschii* (DD, $2n=2x=14$), який є донором ключового геному D культурної гексаплоїдної пшениці *T. aestivum* L., генетична варіабельність якого незрівнянно вища, ніж у м'якої пшениці. Найефективнішим напрямом інтрогресії в культуру генетичної плазми *Ae. tauschii* є використання в схрещуваннях із культурною пшеницею штучно створених

гексаплоїдних синтетиків із геномною формулою AABBDD ($2n=6x=42$), у яких геноми А і В походять від твердої пшениці чи дикорослої двозернянки, а геном D — від егілопсу *Ae. tauschii*. Доведено, що гексаплоїдні синтетики є потужним джерелом поліпшення культурної пшениці за комплексом агрономічних ознак, таких, як зернова продуктивність, стійкість до біотичних і абіотичних факторів, і є чи не єдиним джерелом поліпшення культурної пшениці за такою стратегічно важливою ознакою, як посухостійкість [2].

У програмі *pre-breeding* використовуємо в схрещуваннях із культурною пшеницею генетично близькі дикорослі егілопси — ендемічний *Ae. cylindrica* (CCDD, $2n=4x=28$) та *Ae. tauschii* у формі гексаплоїдних синтетиків (рис. 1).

Отримано серію генетичних інтрогресивних ліній пшениці з екзотичними *Gli/Glu* алелями від дикорослих видів, що мають позитивний вплив на хлібопекарські властивості борошна і підвищують твердість зерна як важливу борошномельну характеристику [3].

Використовуючи цей матеріал у схрещуваннях, отримали інтрогресивні селекційні лінії пшениці з урожаєм зерна вище 12 т/га, відмінною хлібопекарською якістю зерна та високою посухостійкістю. Від схрещувань з *Ae. tauschii* в геном пшениці від дикуна перенесли унікальний чужинний алель гена *Ha*, що детермінує екстраекспресію білків крохмальних гранул *фріабілінів* і відповідно *екстрам'який* тип консистенції ендосперму пшениці. Алель гена *Ha* є генетичною основою для *створення нового для України класу сортів (extra-soft) з екстрам'яким ендоспермом бісквітного (кондитерського) напрямку використання* [4]. На основі використання цього унікального генетичного матеріалу нами створено і занесено до Держреєстру сортів рослин України 2 сорти *екстрам'якозерної* пшениці — червонозерний Оксана та перший в Україні сорт білозерної пшениці Білява.

У світовій селекції пшениці (і в Україні також) широко використовують *центричну житньо-пшеничну транслокацію 1RS.1BL*, яка несе комплекс генів стійкості

до фітозахворювань (*Lr26, Sr31, Yr9, Pm8*) і має позитивний вплив на врожай зерна [5]. Однак житній локус *Sec-1* у короткому плечі хромосоми жита 1RS різко знижує хлібопекарську якість борошна (рис. 2).

У співробітництві з проф. А. Лукашевським (A. Lukaszewsky, California University, Riverside, U.S.A.) нами отримано генетичну лінію пшениці з хромосомно-інженерною модифікованою житньо-пшеничною 1RSm.1BL транслокацією, в якій лише житній локус *Sec-1* заміщений на пшеничний *Gli-B1*, а інші селекційно-позитивні ефекти збережено. Тим самим дефект локусу *Sec-1* на хлібопекарську якість борошна пшениці генетично елімінований. На основі цієї хромосомної транслокації нами цілеспрямовано отримано рекомбінантну лінію пшениці, в якій у довгому плечі хромосоми 1BL алель *Glu-B1(17+18)* замінений на алель *Glu-B1a1* із сильним позитивним впливом на хлібопекарські властивості борошна. Генетичну лінію 1RSm.1BL(*Glu-B177+8*) активно використовують у селекційно-генетичному інституті та Інституті фізіології рослин і генетики НАН України в селекції пшениці на хлібопекарську якість борошна (рис. 3) [4].

Для селекції сортів хлібопекарської пшениці з генетично детермінованою високою і екстрависокою хлібопекарською якістю особливо цінними є гени із сильними позитивними ефектами на цю ознаку. У нашій *pre-breeding* програмі використовуємо 3 унікальні алелі: алель *Glu-B1a1(77+8)* (з екстраекспресією субодиноці 7-ми високомолекулярних глютенінів), який виник у результаті спонтанної тандемної дуплікації гена, що контролює біосинтез субодиноці 7 [6]; алель *Glu-D1x5* зі штучно індукованою екстраекспресією субодиноці 5 високомолекулярних глютенінів; алель *Glu-A1x2** зі штучно індукованою екстраекспресією субодиноці 2* високомолекулярних глютенінів [7]. Усі ці 3 алелі локалізовані в різних хромосомах, успадковуються незалежно, легко детектуються за допомогою відповідних функціональних та молекулярних маркерів і комбінуються в одному генотипі, що дає змогу створювати селекційний матеріал пшениці із запрограмованою



Рис. 1. Зразки колосся дикорослих видів-носіїв ключового геному D м'якої пшениці: а – *Aegilops tauschii* (DD, $2n=2x=14$); б – *Aegilops cylindrica* (CCDD, $2n=4x=28$)



Рис. 2. Вплив на хлібопекарську якість борошна житніх білків секалінів, що кодується локусом *Sec-1* у короткому плечі житньої хромосоми 1RS житньо-пшеничної транслокації 1RS.1BL. У модифікованій 1RSm.1BL транслокації локус *Sec-1* заміщений на позитивний щодо якості пшеничний кластер *Gli-B1* (*Glu-B3*)

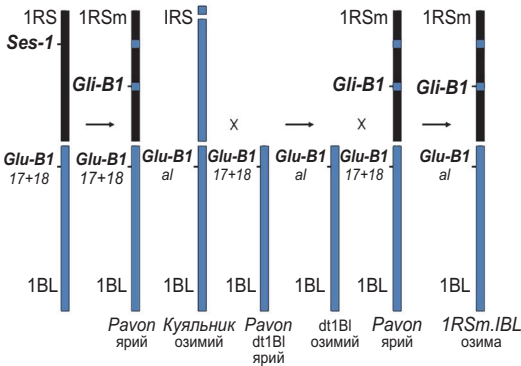


Рис. 3. Цитогенетична модифікація центричної житньо-пшеничної транслокації 1RS.1BL через заміщення житнього локусу *Sec-1* на пшеничний *Gli-B1* (1RSm.1BL) та рекомбінація довгого плеча 1BL транслокації з використанням телосомика 1BL сорту Pavon

екстрависокою хлібопекарською якістю борошна. Для підвищення твердості зерна, яка є головною борошномельною характеристикою, і хлібопекарської якості борошна також використовуємо екзотичний алель *Gli-D1* (*Glu-D3*) *cul*, інтрогресований у культурну пшеницю від егілопсу *Ae. cylindrica* [4].

Харчова (біологічна) цінність зернових злаків, продуктами з яких щоденно харчується населення України, є першочерговим питанням стратегічного значення, яке, на жаль, залишається поза увагою фундаментальних наукових досліджень у системі академії країни.

Уміст білка в зерні є першим показником, що лімітує харчові і технологічні характеристики зерна. Найвідоміші фундаментальні дослідження, спрямовані на підвищення вмісту в зерні пшениці протеїну, були ініційовані Департаментом сільського господарства США (USDA ARS) спільно з Університетом штату Небраска (Prof. V. Johnson) ще в 1954 р. Упродовж більш ніж 30-ти років (1954–1985) було досліджено генетичну варіабельність за вмістом протеїну в зерні серед 12600 сортів пшениці, яка загалом становила лише 5%. У результаті цих і численних інших досліджень було встановлено, що вміст у зерні пшениці протеїну є досить складною кількісною ознакою з чітко вираженою

зворотною залежністю від рівня врожаю зерна, яка значно більшою мірою залежить від середовища та умов вирощування, ніж від генотипу, контролюється комплексом генів з адитивними і неадитивними ефектами і є важкодосяжною для істотного поліпшення методами традиційної селекції [8]. Майже в кожній з 21 хромосом пшениці локалізовано гени з помітним або мінорним впливом на загальний уміст білка в зерні пшениці [9].

Серед колекційних зразків пшениці Ізраїлю нещодавно виявлено дикорослу пшеницю емер *T. turgidum ssp. dicoccoides* (*Körn*) *Thell*, у хромосомі 6В якої ідентифіковано QTL-фактор *Gpc-B1*, що істотно підвищує вміст білка в зерні і ключових (Fe, Zn, Mn) мінералів [10, 11].

Детальне дослідження гена *Gpc-B1* як фактора, що кодує NAC-домейний білок, дало можливість чітко визначити його позицію на хромосомі 6В, ідентифіковану як послідовність розміром 7400 п. н., розміщену між маркерними локусами *Xucw* 109 та *Xuhw* 106. А маркерний локус *Xuhw* 84, ортологічний гену рису OSJNBa002E05.19–1, виявився тісно зчепленим із *Gpc-B1* і може використовуватися як досить надійний маркер для детекції *Gpc-B1* у селекційних популяціях. Для контролю гена *Gpc-B1* у селекційних популяціях використовують також маркерні локуси *Xucw* 67, *Xucw* 71, *Xucw* 79, *Xcdo* 365 та інші, дистанційовані від *Gpc-B1* на відстані 0,3–1,5 сМ, або локус *Xuhw* 89, розміщений від *Gpc-B1* на відстані 0,1 сМ [12, 13]. Ефективність гена *Gpc-B1* як фактора, здатного істотно підвищити вміст у зерні пшениці білка і мікроелементів (без зниження врожаю), доведена в численних дослідженнях у різних країнах упродовж понад 10-ти останніх років і рекомендовано його широке використання в селекції [14].

Джерело гена *Gpc-B1* отримано нами від професора Д. Дубковського (Prof. J. Dubcowsky, California University, Davis, U.S.A) у вигляді 6В хромосомно-заміщеної лінії від *T. turgidum ssp. dicoccoides*. Цей цінний генетичний матеріал разом із асоційованими з геном *Gpc-B1* молекулярними маркерами успішно використовуємо в програмі *pre-breeding*, спрямованій на підвищення

в зерні пшениці білка і ключових мікроелементів [15, 16].

Крохмаль пшениці є основним інгредієнтом хліба і хлібопродуктів. Крохмаль зернових культур становить 65–70% від маси зерна, складається з 2-х водонерозчинних гомоглюканів, 25–28% амілози (лінійний полімер глюкози) та 72–75% амілопектину (розгалужений полімер глюкози) і використовується в харчовій галузі та промисловості. Співвідношення компонентів крохмалю амілоза/амілопектин для всіх ключових зернових культур має стратегічно велике технологічне і харчове значення. Це співвідношення в гексаплоїдній пшениці регулюється генетично через часткове чи повне блокування функції ключового ферменту *GBSS* біосинтезу амілози, який кодують 3 гени *WxA1* (хромосома 7AS), *WxB1* (хромосома 4AL) та *WxD1* (хромосома 7DS). За наявності в генотипу 3-х рецесивних алелів цих генів синтезується крохмаль *ваксі* з нульовим або мінімальним умістом амілози [17].

Використовуючи цю генетичну систему, нами вперше створено і зареєстровано в Україні сорт пшениці *ваксі озимі Софійка*. Пшениця *ваксі* є прекрасною зерною сировиною для виготовлення харчового спирту чи біоетанолу. Крохмаль пшениці *ваксі* з температурою желатинізації майже на 10°C нижчою, ніж у звичайної пшениці, нині широко використовують у харчовій промисловості для виготовлення харчових згущувачів на основі хімічно модифікованого крохмалю. Пшеницю *ваксі* розглядають як основу для створення сортів пшениці кормового використання, оскільки крохмаль цієї пшениці практично повністю, на відміну від звичайної пшениці, метаболізується в шлунково-кишковому тракті (ШКТ) тварин забезпечуючи високу метаболічно засвоювану енергію.

Сучасна селекція пшениці досягла значних успіхів у підвищенні врожаю зерна культури. Однак харчовий статус крохмалю зерна сучасних сортів звичайної пшениці є досить низьким, оскільки пшеничний крохмаль містить у своєму складі до 70–75% амілопектину (тип А), який дуже швидко метаболізується у ШКТ людини, трансформуючись у глюкозу, високий пік концентрації

якої в плазмі крові людини є підґрунтям для розвитку таких небезпечних патологій, як метаболічний синдром і цукровий діабет (тип 2). Тому для поліпшення харчового статусу пшеничного крохмалю (як і будь-якого іншого зернового) важливо змінити співвідношення амілоза/амілопектин у бік підвищення вмісту амілози, яка значно повільніше за амілопектин метаболізується в глюкозу і формує в зерні фракцію так званого резистентного до ферментів травлення ШКТ крохмалю. Резистентний крохмаль практично не гідролізується ферментами травлення в ШКТ людини і проявляє властивості, подібні до некрохмалистих полісахаридів (дієтичної клітковини) типу пентозанів, арабіноксиланів і β-глюканів, які є типовими *пробіотиками*, що метаболізуються кишковими бактеріями *пробіотиками*, забезпечуючи фізичне здоров'я кишківника, а відтак і здоров'я всього організму людини.

Підвищення вмісту амілози в крохмалі понад 70% досягається використанням технології РНК інтерференції (RNAi) і блокуванням функції одного з ключових ферментів *SBEIIa*, відповідального за гілкування амілопектину, або використанням технології TILLING, утворенням стоп-кодону в смисловій послідовності цільового *SBEIIa* гена та повного блокування його транскрипції. Вихідні генотипи пшениці з блокованим *SBEIIa* геном, отримані від їх оригінаторів (Prof. D. Lafiandra, Tuscia University, Viterbo, Italy; Prof. J. Dubcowsky, California University, Davis, U.S.A), використовуються нами в схрещуваннях для створення пшениці з високим умістом у крохмалі (>70%) амілози, підвищеним умістом резистентного крохмалю та радикально поліпшеним харчовим статусом зерна.

Обидві генетичні системи (3 гени *Wx* у пшениці та тритикале і 1 ген *Wx* у ячменю) використовуються нами для створення селекційного матеріалу відповідних зернових культур з нульовим умістом у крохмалі (*ваксі*) амілози [17]. Пшениця *ваксі* і тритикале *ваксі* відрізняються від звичайних пшениці й тритикале високою ферментабельністю і відповідно високим виходом етанолу, тому мають технологічні перспективи використання в кормовій

і технічній спирто-дистилятній галузях. Крохмаль ваксі, на відміну від звичайного, є практично на 100% доступним для засвоєння тваринами, що підвищує кормовий (енергетичний) потенціал зерна. Тому пшениця ваксі є генетичною основою для створення сортів пшениці кормового використання. Крім того, крохмаль пшениці ваксі вже широко використовують за кордоном у харчовій промисловості у вигляді хімічно модифікованого крохмалю, харчових згущувачів. Ячмінь ваксі має підвищений (до 10%) уміст у зерні β-глюканів (цінна розчинна дієтична клітковина), що істотно поліпшує його харчовий статус.

Інша генетична система *SBE11a* у пшениці та ячменю використовується нами в селекційних програмах для створення сортів із високим умістом амілози в пшениці (>70%) та голозерного ячменю (>40 і >70%). Високоамілозна пшениця і голозерний високоамілозний ячмінь порівняно зі звичайними пшеницею і ячменем мають значно вищий уміст у зерні *резистентного до травлення крохмалю*, подібного за властивостями до дієтичної клітковини. Завдяки чому біологічна цінність крохмалю і загалом зерна радикально поліпшуються внаслідок істотного (до 20–30 одиниць) зниження глікемічного індексу (ГІ — швидкість зростання концентрації цукру в крові) як головного показника дієтичної цінності вуглеводистих харчових продуктів. Чим менший ГІ, тим нижчий рівень глікемічного відгуку за вживання таких продуктів і нижча ймовірність розвитку метаболічного синдрому та діабету другого типу [18].

Нами ініційовано програму селекції сортів *м'якої пшениці круп'яного напрямку використання* (крупки, пластівці), якої в Україні раніше взагалі не було. Серед пшениць статус круп'яної культури має лише тверда пшениця. Сорти м'якої пшениці практично всі, зареєстровані в Україні, належать до категорії твердозерних червонозерних і призначені лише для хлібопекарського використання.

Слід наголосити, що такий продукт, як крупа, яку виготовляють із цільного зерна, у сучасних супермаркетах є чи не єдиним цінним для здоров'я натуральним продуктом, харчова цінність якого, на відміну від

інших продуктів (навіть звичайного хліба) масового вжитку, не зіпсована глибокою технологічною переробкою, різними добавками типу пальмової олії, консервантів, барвників, аналогів і підсилювачів смаку тощо, які масово використовують виробники харчових продуктів, руйнуючи при цьому натуральність і, головне, — харчову (біологічну) цінність продукту. Крупа (пластівці) із цільного зерна — це найефективніший спосіб використання харчового біологічного потенціалу цілого зерна, зосередженого, головним чином, у периферійних шарах зернівки.

Пшениця для виробництва крупки не потребує високого вмісту клейковини та відмінних хлібопекарських характеристик. Вона повинна мати високий уміст повноцінного розчинного білка, мікроелементів, вітамінів і підвищений уміст резистентного до ферментів травлення крохмалю, бути збалансованою за всіма біологічно цінними елементами зерна і мати не лише енергетичне, а й профілактично-лікувальне значення. На цьому особливо наголошує сучасна національна програма здорового харчування, скажімо Франції [19].

Генетичною основою для створення сортів пшениці круп'яного використання можуть бути такі характеристики зерна, як його колір та консистенція ендосперму (твердість). Колір зерна червонозерної пшениці контролюється домінуючими алелями від 1-го до 3-х генів: *R-A1b* (хромосома 3AL), *R-B1b* (хромосома 3BL) та *R-D1b* (хромосома 3DL) [20].

На відміну від червонозерної пшениці, білий колір зерна детермінується рецесивними алелями цих генів, і генотип білозерної пшениці має таку генетичну формулу: *R-A1a; R-B1a; R-D1a*. Білозерні пшениці широко розповсюджені у світі, особливо в США, Канаді, Австралії, але, на жаль, не в Україні. Продукти із зерна білозерної пшениці, на відміну від червонозерної, мають м'який приємний смак без гіркоти, характерної для червонозерної пшениці. Нами створено високопродуктивний селекційний матеріал білозерної пшениці для круп'яного напрямку використання. Особливо приємний смак має різдвяна крупа, виготовлена на основі цілого зерна



а



б



Рис. 4. Звичайна червонозерна (зверху) і чорнозерна (знизу) пшениця (а); жовтозерний голозерний (зверху) і чорнозерний голозерний (знизу) ячмінь (б)

білозерної м'якозерної пшениці, яка без замочування вариться до готовності всього 30–40 хв. Нами вперше в Україні створено і зареєстровано сорт білозерної пшениці Білява.

Перенесені в геном пшениці хромосомні транслокації від пирію спричиняють появу чорного кольору зерна і пов'язане

з ним підвищення вмісту в зерні вітамінів, цінних мінералів (у т.ч. селену) та рівня його загальної антиоксидантної активності (рис. 4).

Ці транслокації (від донора, китайського сорту *Heilixiaoma1 76*) використовуємо в селекційній програмі зі створення сортів чорнозерної пшениці *круп'яного напрямку*

використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна. Нами вперше в Україні створено і зареєстровано сорт чорнозерної пшениці озимої круп'яного використання з поліпшеною біологічною цінністю зерна Чорноброва. Цей сорт набирає популярності також для виготовлення хліба з пропущеного зерна (без борошна і дріжджів) та цілющого соку із зелених 8–9-денних проростків. Слід наголосити, що сорти чорнозерної пшениці нині особливо популярні в Китаї за їх найвищу порівняно з червонозерними пшеницями антиоксидантну активність зерна [21].

Антиоксиданти в продуктах харчування мають стратегічне значення для здоров'я, оскільки вони здатні нейтралізувати агресивні вільні радикали в клітинах та органах людини, які пришвидшують старіння, і є рушійною силою для виникнення таких смертоносних патологій, як рак, серцево-судинні захворювання, цукровий діабет (тип 2).

На основі чужинних хромосомних транслокацій від пирію створюємо також чорнозерну пшеницю спельту круп'яного напрямку використання, яка найближчими роками вперше з'явиться в Україні.

Ще одним перспективним донором для створення сортів пшениці круп'яного напрямку, який нами використано в схрещуваннях, є австрійський сорт *Skorpion* (отриманий із колекції Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН) із блакитним кольором зерна та його високою антиоксидантною активністю за рахунок високого вмісту антоціанінів в алейроновому шарі

зерна. Блакитне забарвлення зерна в цього сорту контролюється 2-ма генами: геном *Va1*, локалізованим у хромосомі 4BS ($4e1_2$) і перенесеним у геном пшениці від пирію *Thinopyrum ponticum* Podp та геном *Va2*, що розташований у довгому плечі хромосоми 4A^m і перенесений у гексаплоїдну пшеницю від дикорослої пшениці-однозернянки *Triticum monococcum* L. [22].

Крім генів забарвлення зерна (пов'язаних із високою антиоксидантною активністю), для круп'яної пшениці велике значення має твердість зерна, яка контролюється головним геном *Ha*, локалізованим у хромосомі 5DS, та серією генів-модифікаторів. Рецесивний алель гена *Ha* детермінує високу твердість зерна, а домігантний — м'яке зерно. Висока твердість зерна потрібна для виготовлення крупки, і навпаки, низька твердість важлива для виробництва пластівців.

Голозерний ячмінь за останні 10–15 років набирає популярності в розвинених країнах світу як культура харчового напрямку використання (рис. 5). Скажімо, у Канаді та Австралії ячмінь характеризують як супер-фуд. А світова селекція голозерного ячменю спрямовує цю культуру передусім у напрямі харчового використання [23].

Рецесивний алель гена *nud* у ячменю контролює ознаку «голозерність» або відсутність зв'язного ліпідного прошарку між оболонкою зерна і плівкою ячменю. Мутантний ген *Ira-3* детермінує низький вміст органічного (зв'язаного) та підвищений вміст мінерального (доступного)



Рис. 5. Зерно плівчастого (зліва) і голозерного (справа) ячменю

фосфору в зерні ячменю, а ген *wax* блокує біосинтез амілози і відповідно зумовлює високий уміст цінної в харчовому плані розчинної дієтичної клітковини β-глюканів у зерні ячменю. Цю систему генів та генний комплекс, що контролює біосинтез пігментів зерна з антиоксидантною функцією, впроваджено нами в найбільшу в Україні селекційну програму створення сортів *голозерного ячменю харчового напрямку використання* з високим умістом у зерні білка, β-глюканів, мінерального фосфору, ключових мінералів та загальною антиоксидантною активністю зерна.

Як джерело радикального поліпшення харчової цінності зерна голозерного ячменю за вмістом розчинної клітковини і резистентного крохмалю нами використано в схрещуваннях унікальний мутантний сорт ячменю *Himalaya 292*, створений відомою австралійською корпорацією CSIRO (незалежне федеральне науково-виробниче об'єднання Австралії). Цей сорт голозерного ячменю містить індуквану азидом натрію мутацію в регіоні гена *Sex6* у вигляді стоп-кодону, який блокує трансляцію транскриптів гена синтази крохмалю *SSIIa*. У результаті сорт *Himalaya 292* містить усього лише близько 18% крохмалю, який складається із 71% амілози, 25 — загального вмісту некрохмалистих полісахаридів і більше 10% — β-глюканів [24, 25]. Ця наукова програма нині є на стадії отримання і вивчення популяцій F_2 та F_3 .

З метою поліпшення антиоксидантної активності зерна голозерного ячменю використовуємо в схрещуваннях кілька джерел чорнозерного ячменю, головним чином африканського походження (скажімо, африканський аборигенний зразок R 118 отриманий із колекції Великої Британії, Норвіч). Чорнозерні зразки ячменю містять високоактивний антиоксидант дельфінін 3-глюкозид (*delphinin 3-glucoside*), тісно пов'язаний із чорною пігментацією зернівки (див. рис. 4). Зразки голозерного ячменю з блакитним зерном також мають вищу антиоксидантну активність, ніж ячмінь із жовтим чи білим кольорами зернівки [21].

Першим етапом нашої програми *pre-breeding* створення селекційного матеріалу

для сортів голозерного ячменю є занесення до Держреєстру сортів рослин України першого в країні сорту голозерного ячменю *Ахіллес* харчового напрямку технологічного використання зерна.

Клейковина пшениці і ячменю (хоч і значно меншою мірою, ніж пшениці) характеризується імунореактивністю, або здатністю індукувати в кишківнику чутливих осіб аутоімунну реакцію (запалення). Крайнім проявом гострої патологічної реакції на клейковину є спадкова хвороба целиація, яка спричиняє цілковите несприйняття харчових продуктів, виготовлених із зерна пшениці, жита, тритикале чи ячменю. Причому частота осіб-носіїв цієї патології у світі невпинно зростає [26]. Тому в розвинених країнах активно здійснюють біотехнологічні дослідження, спрямовані на створення безглютенових пшениці та (*gluten free*) ячменю. Із застосуванням сучасних трансгенних технологій блокування генів (RNAi) або редагування геному з використанням технології TUNR (CRISPR-Cas9) уже створено безглютенову пшеницю [27].

Групою вчених із CSIRO (Австралія) звичайною селекцією створено безглютеновий ячмінь [28].

Безглютенові пшениця і ячмінь — це сучасні надприбуткові багатомільярдні комерційні проекти. Створити такий матеріал в Україні за відсутністю сучасних біотехнологій чи придбати готовий у авторів-оригінальних практично неможливо.

Біосинтез гордеїнів (білків клейковини, глутену) ячменю кодується складною мультигенною системою, яка включає 4 локуси (*Hor1*, *Hor2*, *Hor5* та *Hor3*). Три перших локуси розміщені в короткому плечі хромосоми 1Н, а локус *Hor3* — у довгому плечі цієї самої хромосоми. Мультигенний локус *Hor1* кодує біосинтез сімейства С-гордеїнів із молекулярною масою 50–60 кДа, а супресію цього локусу здійснює локус *lys3a*, локалізований у хромосомі 5Н. Біосинтез сімейства В-гордеїнів масою 35–45 кДа (~12 протеїнів) кодує локус *Hor2*. D-гордеїн ячменю представлений 1-м протеїном масою 106 кДа і кодується локусом *Hor3*. Локус *Hor5*, який включає 2 гени (3 протеїни масою 36–45 кДа), тісно зчеплений із локусом *Hor2* і кодує біосинтез γ-гордеїнів

(3 протеїни масою 36–45 кДа) [29].

Нами здійснюється наукова програма зі створення безглютенового ячменю за австралійською моделлю з використанням 3-х мутантів ячменю Ris \emptyset 1508 (відсутні С-гордеїни), Ris \emptyset 56 (відсутні В-гордеїни) та місцевого спонтанного мутанта голозерного ячменю з Ефіопії R 118 (відсутні D-гордеїни). Мутанти Ris \emptyset 1508 і Ris \emptyset 56 отримано нами з колекції Департаменту сільського господарства США. Комбінування цих 3-х генетично незалежних мутацій в одному генотипі дасть змогу створити ячмінь з ультранизьким умістом глютену не більш як 5 ppm, що вчетверо нижче мінімального порогу 20 ppm, визначеного FDA (Food and Drug Administration, U.S.A.) для харчових продуктів, які ідентифікуються як безглютенові (gluten free) [28, 29].

Наші дослідження харчового голозерного ячменю цілком узгоджуються зі світовою тенденцією активного відродження харчового ячменю, який згідно з даними численних клінічних досліджень останніх 15–20-ти років, визнаний *продуктом функціонального харчування*, що знижує ризик захворювання на найбільш смертоносні патології сучасного людства: коронарну хворобу серця, діабет другого типу і рак [30].

Культура тритикале, якій в Україні бракує належної уваги, не поступається або перевершує пшеницю за врожаєм і біологічною цінністю зерна, морозозимостійкістю та стійкістю до фітозахворювань, є невибагливою до умов вирощування.

Задля розширення генетичної варіабельності пшениці і тритикале та підвищення їхньої продуктивності використовуємо в схрещуваннях лінію тритикале з хромосомним заміщенням CCT(5B)5D (отримано від проф. А. Лукашевського, UCR, U.S.A.), яке індукує аллосинтез (кон'югацію і рекомбінацію) хромосом жита і пшениці. У результаті використання в схрещуваннях хромосомного заміщення (5B)5D нами отримано перспективні селекційні лінії тритикале з морозозимостійкістю значно вищою, ніж у пшениці, урожаєм зерна в межах 14 т/га, твердозерні, з ідеальним вимолотом і виповненістю зерна та виходом при ферментації зернового збіжжя абсолютного

етанолу понад 400 л з 1 т. На основі виконаних досліджень цілком обґрунтовано вважаємо, що культура тритикале, яка нині фактично не має в Україні визначеного напрямку технологічного використання зерна, може успішно зайняти *нішу індустріальної спирто-дистилятної переробки зерна для виробництва питного етанолу і біоетанолу та побічного цінного кормового шроту* (вихід 300–330 кг з 1 т зерна і вмістом біологічно цінного перетравного протеїну вище 35%) [31].

Зерно тритикале поєднує в собі властивості 2-х культур: жита і пшениці. А тому немає жодних обмежень за комплексом харчових характеристик продуктів його переробки. Твердозерні тритикале є також перспективною сировиною для виготовлення крупи з цільного зерна тритикале, яке перевершує зерно сучасних сортів пшениці за характеристиками харчової (біологічної) цінності. Зерно тритикале є технологічно придатною сировиною для виготовлення пластівців, сухих сніданків і широкого асортименту бісквітних виробів із цільного зерна. На жаль, потенціал культури тритикале як харчової, кормової і технічної культури в Україні, на відміну від сусідів, Польщі та Білорусі, практично не використовується.

Рослина культурного жита є надзвичайно життєздатною генетичною системою, особливо в сенсі морозозимостійкості та стійкості до грибних захворювань, і тому є цінним джерелом для селекційного поліпшення пшениці. Тритикале як гібрид між пшеницею і житом світова селекція активно використовує для поліпшення пшениці, головним чином для отримання житньо-пшеничних хромосомних транслокацій на кшталт транслокації 1RS.1BL, про яку йшлося вище. Створені нами високопродуктивні та стійкі до захворювань лінії тритикале активно використовуємо в схрещуваннях із пшеницею озимою як досить перспективний напрям її селекційного поліпшення за ознаками зернової продуктивності, стійкості до фітозахворювань та іншими селекційно-цінними агрономічними характеристиками.

У результаті схрещування наших перспективних зразків тритикале озимого

з різними сортами пшениці нами отримано унікальні лінії тритикале з білим колосом, які, крім високої зернової продуктивності, відмінних показників вимолоту та вивпненості

зерна, у поточному гостропосушливому році показали високий рівень посухостійкості, істотно вищий, ніж у зразків тритикале з червоним колосом.

Висновки

Поліпшення якості зерна основних злаків, особливо їхньої харчової цінності, є проблемою № 1 у розвинених країнах світу. Зерно злаків — головне харчове джерело унікальної дієтичної клітковини, рослинних антиоксидантів і ключових мінералів — 3-х

складових, що становлять основу сучасної нутриціології і дієтології та здорового харчування. Питання харчової цінності зернових злаків в Україні має набути статусу стратегічної програми, спрямованої на оздоровлення української нації.

Рыбалка А.И.¹, Полищук С.С.², Моргун Б.В.³
^{1,2}Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Овидиопольская дорога, 3, г. Одесса, 65036, Украина, ³Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Заболотного, 148, г. Киев, 03143, Украина; e-mail: ¹rybalkaalexander@gmail.com, ²Pol.sergey@ukr.net, ³bmorgun@gmail.com

Новые направления в селекции зерновых культур на качество зерна

Цель. Привлечь внимание к проблеме улучшения качества зерна, которая является вопросом № 1 в развитых странах мира. **Методы.** Полевые, лабораторные, методы электрофореза белков, полимеразной цепной реакции, технологического анализа зерна и муки, определения антиоксидантной активности зерна, хроматографического анализа. Используются оригинальные методы электрофоретического анализа и анализа качества зерна, разработанные в отделе генетических основ селекции Селекционно-генетического института, которые стали сейчас стандартными аналитическими процедурами. **Результаты.** Одним из перспективных путей улучшения качества зерна пшеницы и комплекса других агрономических характеристик является использование генетической плазмы дикорастущих видов-носителей ключевого генома D мягкой пшеницы эгилопсов *Ae. tauschii* ($2n=2x=14$) и *Ae. cylindrica* ($2n=4x=28$). Генетические манипуляции с генами *Wx* (*Wax*) и *SBEIIa* дают возможность эффективно управлять соотношением амилоза/амилопектин в составе крахмала, изменять его биохимические свойства и технологические характеристики зерна пшеницы, ячменя и тритикале. Использование в селекции пшеницы, голозерного ячменя и тритикале генетических факторов влияния на биохимический состав крахмала открывает новые направления селекции сортов этих культур с особенными

биохимическими и технологическими характеристиками зерна как сырья для создания новых пищевых продуктов. Изложено концепцию селекции нового технологического класса мягкой пшеницы в Украине — крупяного направления использования с улучшенной пищевой ценностью зерна. **Выводы.** Зерно злаков является основным пищевым источником уникальной диетической клетчатки, растительных антиоксидантов и ключевых минералов — 3-х составляющих, которые вместе представляют основу современной нутрициологии, диетологии и здорового питания. Результаты проведенных исследований подтверждают, что улучшение пищевой ценности зерна злаков путем манипуляции с генами, которые влияют на биохимические свойства зерна, должно стать первоочередной задачей в стратегии улучшения качества зерна злаковых культур как основы для производства продуктов здорового (функционального) питания украинской нации.

Ключевые слова: *pre-breeding, пшеница, ячмень голозерный, тритикале, качество зерна, белки, резистентный крахмал, интрогрессия генов, амилоза, амилопектин.*

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-16>

Rybalka O.¹, Polishchuk S.², Morgun B.³
Selection-genetic institute — National center of seed-growing and variety investigation, Ovidiopol'ska doroga, 3, Odesa, 65036, Ukraine, ³Institute of cell biology and genetic engineering NASU, Acad. Zabolotnogo St., 148, Kyiv, 03143, Ukraine; e-mail: ¹rybalkaalexander@gmail.com, ²Pol.sergey@ukr.net, ³bmorgun@gmail.com

New directions in selection of cereal crops on quality of grain

The purpose. Cultivated cereal's grain quality is a question number one in the civilized world. **Methods.** Field, laboratory methods, methods of protein

electrophoresis, polymerase chain reaction (PCR), technological analysis of grain and flour, measuring of grain antioxidant activity, chromatographic analysis. In researches have used the original methods of electrophoretic analysis and grain quality analysis, developed in the Department of genetic bases of breeding of Plant Breeding & Genetics Institute which now became standard analytical procedures. **Results.** One of the perspective way of wheat quality amelioration as well as other agronomic characters is the use of germplasm of wild relatives *Aegilops Ae. tauschii* ($2n=2x=14$) and *Ae. cylindrica* ($2n=4x=28$) the D genome donors as a key genome of cultivated wheat. Genetic manipulation with *Wx* (*Wax*) and *SBEIIa* genes makes possible an efficient regulation of the starch amylose/amylopectin ratio, to manage of the starch biochemistry and rheology of wheat, barley and triticale. The use of genetic factors regulating of the starch biochemical composition reveals the new directions in breeding of wheat, hull-less barley and triticale possessing

with special of biochemical and technological grain characteristics as raw material for development of the new food products. Authors presented the breeding concept of the new common wheat technological class of the grouts end-use with promoted of the grain food value. **Conclusion.** The cereals grains is the main food source of unique dietary fibers, plant antioxidants and key minerals — three components that together form the basis of modern nutritions and dietetics, the foundation of a healthy diet. Based on the results conducted research authors noted, that cereals food quality amelioration by manipulation with genes regulating of grain biochemistry should become a key point in the strategy of cereals quality amelioration as a base for development and production of the healthy (functional) food products for Ukrainian nation.

Key words: pre-breeding, wheat, hull-less barley, triticale, grain quality, proteins, resistant starch, gene introgression, amylose, amylopectin.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-16>

Бібліографія

1. Hsu P., Lander E., Zhang F. Development and application of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, Elsevier Inc., 2014. P. 1262–1278.
2. Cox T., Wu J., Wang Sh. et al. Comparing two approaches for introgression of germplasm from *Aegilops tauschii* into common wheat. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cj.2017.05.006>.
3. Рибалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення: монографія. Київ: Логос, 2011. 495 с.
4. Рибалка О.І., Моргун В.В., Починок В.М. Генетичні основи селекції сортів пшениці за спеціалізацією їх технологічного використання. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2012. Т. 44, № 2. С. 95–124.
5. Howell T., Hale I., Jankulosky L. et al. Mapping a region within 1RS.1BL translocation in common wheat affecting grain yield and canopy water status. *Theor. Appl. Genet.* 2014. V. 127. P. 2695–2709.
6. D'Ovidio R., Masci S., Porceddu E., Kasarda D. Duplication of the *Bx7* high-molecular-weight glutenin subunit gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Red River 68. *Plant Breeding*. 1997. V. 116. P. 525–531.
7. Blechl A., Anderson O. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 875–879.
8. Johnson V., Mattern P., Peterson C., Kuhr S. Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetic techniques. *Cereal Chemistry*. 1985. V. 62(5). P. 350–355.
9. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J. et al. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th Int. Wheat Genet. Symp. 8–13 Sept. 2013, Yokohama, Japan.
10. Cakmak I., Torun A., Millet E. et al. *T. dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 2004. V. 50. P. 1047–1054.
11. Uauy C., Brevis J., Dubcovsky J. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 2785–2794.
12. Uauy C., Distelfeld A., Fahima T. et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat. *Science*. 2006. V. 314. P. 1298–1301.
13. Distelfeld A., Uauy C., Fahima T., Dubcovsky J. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol.* 2006. V. 169. P. 753–763.
14. Tabbita F., Pearce S., Barneix A. Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the *GPC-B1* gene. *J. Cereal Sci.* 2017. V. 73. P. 183–191.
15. Степаненко А.И., Моргун В.В., Рибалка А.И. Молекулярные маркеры для детектирования в пшенице QTL *Gpc-B1*, перенесенного от *T. dicoccoides*. *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии*: сб. тезисов XIV Молодежной научной конференции. Москва, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 16 апреля 2014 г. С. 50–52.
16. Рибалка О.І., Моргун В.В., Полищук С.С. *GPC-B1*(*NAM-B1*) ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка

в зерні та мікроелементів. *Физиология растений и генетика*. 2018. Т. 50. № 1. С. 1–20.

17. Моргу́н Б.В., Степаненко О.В., Степаненко А.І., Рибалка О.І. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів *Wx* у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47. № 1. С. 25–35.

18. Рибалка О.І., Моргу́н В.В., Моргу́н Б.В. Високоамілозна пшениця — шлях до радикального поліпшення харчової цінності зерна. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47. №1. С. 25–35.

19. Herberg S., Chat-Yung S., Chauliac M. The French National Nutrition and Health Program: 2001–2006–2010. *Int. J. Public Health*. 2008. V. 53. P. 68–77.

20. Sherman J., Souza E., See D., Talbert L. Microsatellite markers for kernel color genes in wheat. *Crop Science*. 2008. V. 48. P. 1419–1424.

21. Li W., Shan F., Sun Sh. et al. Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *J. Agric. Food Chem*. 2005. V. 53(22). P. 8533–8536.

22. Martinek P., Scorpic M., Chrpova J. et al. Development of the new wheat variety Skorpio with blue grain. *Czech J. Genet. Plant Breed*. 2013. V. 49(20). P. 90–94.

23. Newman C., Newman R. Hulless barley for food and feed. In: Specialty grains for food and feed. E. Abdel-Aal, P. Wood eds. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. 2005. P. 167–202.

24. Morell M., Kosar-Hashemi B., Cmiel M. et al. Barley *sex6* mutants lack starch synthase *Ila* activity

and contain a starch with novel properties. *Plant J*. 2003. V. 34. P. 173–185.

25. Topping D., Morell M., King R. et al. Resistant starch and health — Himalaya 292, a novel barley cultivar to deliver benefits to consumers. *Starch*. 2003. V. 55. P. 539–545.

26. Fasano A., Berti I., Gerarduzzi T. et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States — a large multicenter study. *Arch. Intern. Med*. 2003. V. 163. P. 286–292.

27. Sanchez-Leon, Gil-Humanes J., Ozuna C. et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol*. 2018. V. 16. P. 902–910.

28. Tanner G., Blundell M., Colgrave M., Howitt C. Creation of the first ultra-low gluten barley (*Hordeum vulgare* L.) for coeliac and gluten-intolerant populations. *Plant Biotechnol*. 2016. V. 14. P. 1139–1150.

29. Brennan C., Smith D., Harris N., Shewry P. The production and characterization of *Hor3* null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *Cer. Sci*. 1998. V. 28. P. 291–299.

30. Рибалка О.І., Моргу́н Б.В., Поліщук С.С. Ячмінь як продукт функціонального харчування: монографія. Київ: Логос. 2016. 620 с.

31. Рибалка О.І., Моргу́н В.В., Моргу́н Б.В., Починок В.М. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47. № 2. С. 95–111.