

<https://doi.org/10.15407/frg2022.06.484>

УДК 575.113.2:577.112.82

LPA-МУТАЦІЇ І БІОФОРТИФІКАЦІЯ ГОЛОЗЕРНОГО ЯЧМЕНЮ (*HORDEUM VULGARE* L.) ЗА ВМІСТОМ У ЗЕРНІ МІНЕРАЛЬНОГО ФОСФОРУ

**О.І. РИБАЛКА^{1,2}, Б.В. МОРГУН^{2,3}, М.В. ЧЕРВОНІС¹, С.С. ПОЛІЩУК¹,
В.В. МОРГУН², І.Г. ТОПОРАШ¹, А.В. ТРОЯНІВСЬКА¹**

¹Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

³Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

Ключовий для організму тварин і людини мінерал фосфор у зерні злаків та бобових культур на дві третини (~65—85 %) загального вмісту зв'язаний у формі фітинової кислоти (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexa-kisphosphate) і є недоступним для засвоєння організмом людини і нежуйних тварин. Незасвоєний органічний фосфор у формі фітатів виводиться назовні з фекаліями й спричинює екологічну шкоду у вигляді «цвітіння» водоєм і погіршення якості питної води (евтрофікація водних шляхів). Створення сортів низькофітатного голозерного ячменю на основі *lpa*-мутацій дає змогу істотно поліпшити ефективність засвоєння (біодоступність) фосфору зерна ячменю людиною і тваринами й знизити шкідливе навантаження органічними фосфатами на навколишнє середовище. Серія оригінальних *lpa*-мутацій була використана у спеціальній селекційній програмі, спрямованій на створення сортів низькофітатного голозерного ячменю з підвищеним вмістом у зерні мінерального фосфору в комбінації з чорним перикарпом зернівки (від колекційного зразка Abyssinian 1105), як маркером підвищеного вмісту у зерні пігментів антоціанінів з високою антиоксидантною активністю. Як реципієнт *lpa*-мутацій використано комерційний сорт ярого голозерного ячменю Ахіллес. У результаті схрещування створено кілька популяцій, з яких дібрано перспективні генотипи голозерного ячменю з підвищеним вмістом у зерні мінерального фосфору та чорним перикарпом. Опрацьовано лабораторну процедуру ідентифікації в селекційних популяціях *lpa*-мутацій з метою їх подальшого застосування у селекційному процесі. Лабораторна процедура дає змогу детектувати ефекти *lpa*-мутацій з використанням для аналізу мінімум матеріалу, індивідуальні зернівки або їх частини.

Ключові слова: ячмінь голозерний, фітати, мінеральний фосфор, *lpa*-мутації, біофортificaція.

Цитування: Рибалка О.І., Моргун Б.В., Червоніс М.В., Поліщук С.С., Моргун В.В., Топораш І.Г., Троянівська А.В. *Lpa*-мутації і біофортificaція голозерного ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за вмістом у зерні мінерального фосфору. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022. 54, № 6. С. 484—497. <https://doi.org/10.15407/frg2022.06.484>

Жоден мінерал у тілі людини чи тварини не утворюється *de novo*, а надходить у живий організм винятково з їжею. Серед п'яти найважливіших мінералів (Ca, P, K, Na, Mg) фосфор є другим за функціональним значенням, оскільки відіграє стратегічну роль у клітинному метаболізмі, структурі фосфоліпідів, як складових клітинних мембран [1].

П'ятивалентний P^{5+} є частиною структури молекули АТФ — універсального джерела енергії у клітинному метаболізмі, бере участь у формуванні фосфодіестерного зв'язку між нуклеотидами нуклеїнових кислот, без якого відтворення структури та функціонування носіїв спадковості неможливе [2].

Зерно ячменю містить фосфору в середньому 470 мг/100 г маси сухої речовини, і переважає за вмістом цього мінералу зерно інших злаків, таких як пшениця (410), жито (380), овес (340), рис (285), кукурудза (310). Однак ~65–85 % загального вмісту фосфору у зернових і бобових культур зв'язано у структурі фітинової кислоти (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, або міоінозитол-1,2,3,4,5,6-гексакісфосфат, аббревіатура Ins P_6), як основного депонента зернового фосфору, що в органічній формі фітатів недоступний для засвоєння організмом з однокамерним шлунком і птиці [2].

Фітинова кислота несе сильний негативний заряд у широкому діапазоні рН. Шість її фосфатних груп утворюють солі («фітати», або «фітин») з різними катіонами мінералів. Поліаніонна структура фітатів здатна хелатувати (зв'язувати) позитивно заряджені двовалентні іони (катіони), знижуючи біодоступність, крім фосфору, також таких важливих мінералів, як залізо (Fe^{2+}), кальцій (Ca^{2+}), магній (Mg^{2+}), манган (Mn^{2+}), цинк (Zn^{2+}) і мідь (Cu^{2+}) [4] (рис. 1).

Фітати злаків представлені головним чином К/Мg солями і зв'язують в органічну форму понад 50 % загального вмісту у зерні К і Мg. Ці катіони разом із фосфором фітатів та міоінозитолом утворюють пул метаболітів і мінералів для проростка на ранніх стадіях його розвитку [3] (див. рис. 1).

Незасвоєний організмом людини, нежуйними тваринами з однокамерним шлунком (свині) і птицею, фосфор фітатів, як форма органічних фосфатів, виводиться з фекаліями у навколишнє середовище. За підрахунками американських фахівців, лише у США з екскрементами птиці викиди в навколишнє середовище органічного фосфору

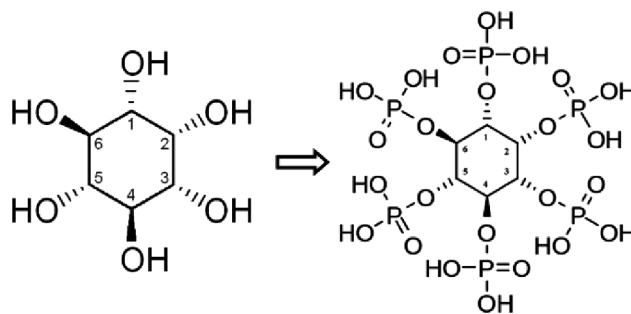


Рис. 1. Молекулярна структура міоінозитолу і фітинової кислоти <https://en.wikipedia.org/wiki/Phytase>

від індустріального птахівництва оцінюються у понад 250 тис. т щорічно з тенденцією до зростання [5].

Насичені фосфатами поверхневі стоки еродованих ґрунтів стікають у річки та озера, стимулюють активний ріст біомаси водоростей, фітопланктону, спричиняючи екологічну шкоду (eutrophication) у вигляді істотного погіршення якості води [5].

Отже, високий вміст фітатів у зерні та зернових кормах (харчах) створює дві масштабні проблеми: кормову (харчову) й екологічну. Звідси очевидно, що посилення біодоступності фосфору фітатів вирішує водночас ці дві важливі проблеми: поліпшення засвоюваності мінерального фосфору фітатів та запобігання забрудненню навколишнього середовища органічними фосфатами.

З початку усвідомлення означених вище проблем, було ініційовано отримання генотипів зернових культур з генетично контрольованим низьким вмістом у зерні фітатів (low phytic acid — *lpa*). Генотипи основних зернових культур з низьким вмістом у зерні фітатів отримано з використанням хімічного й променевого мутагенезу рослин включно з такими культурами, як ячмінь [6–8], рис [9–14], пшениця [15], кукурудза [16–20], соя [21–23] і боби [24].

Зважаючи на стратегічну важливість зазначених проблем, ми вперше в Україні на основі використання *lpa*-генів ініціювали селекційно-генетичну програму зі створення сортів голозерного харчового й кормового ячменю зі зниженим вмістом у зерні фітатів і підвищеною біодоступністю фосфору зерна і ключових мінералів. Крім того, наша робота спрямована на отримання низькофітатного матеріалу голозерного ячменю у комбінації з кольоровим (чорним, синім, фіолетовим) зерном і підвищеним вмістом біоактивних пігментів антоціанінів, як додатковим чинником поліпшення біологічної цінності зерна — підвищення його антиоксидантної активності.

Перший етап наших досліджень передбачав вирішення двох взаємопов'язаних завдань: 1) опрацювання лабораторної процедури ідентифікації *lpa*-генотипів, яка була би максимально придатною для аналізу селекційних популяцій і доборів; 2) виділення *lpa*-генотипів голозерного ячменю (в тому числі із чорним зерном) за агрономічними характеристиками на рівні ярого дворядного голозерного сорту-стандарту Ахіллес. Результати досліджень викладено у цій статті.

Методика

Дослідним матеріалом у роботі слугував оригінальний генетичний матеріал мутаційного походження з низьким вмістом у зерні фітатів: *LP1-2581* — ярий, плівчастий, дворядний; *LP1-2163H* — ярий, голозерний, шестирядний; *LP3-1159* — ярий, плівчастий, шестирядний; *LP640-1304* — ярий, плівчастий, шестирядний. Усі перелічені зразки надані нам Prof. Phil Bregitzer (USDA-ARS, National Small Grains Germplasm Research Facility, Aberdeen, South Dakota, USA).

Зразок ярого, голозерного, дворядного ячменю, зареєстрований сорт CDC Lophy (*lpa3-1*) надісланий нам Prof. Brian Rossnagel (University of Saskatchewan, Crop Development Centre, Saskatoon, Canada).

Зразки ярого плівчастого дворядного ячменю Jersey (Нідерланди) та ярого плівчастого дворядного ячменю Abyssinian 1105 (Ефіопія) з чорним зерном отримані з колекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва — Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Зразок ярого голозерного дворядного ячменю Ахіллес (селекції СГІ—НЦНС) використаний нами як стандарт і компонент схрещування.

У роботі досліджували перспективні селекційні зразки винятково дворядного ячменю голозерного морфотипу, які були дібрані за ключовими агрономічними ознаками (урожай зерна, стійкість до полягання, стійкість до захворювань, продуктивна кущистість, продуктивність колоса, вимолот зерна, маса 1000 насінин та ін.) зі значеннями не нижче рівня стандарту. Дослідний матеріал дібраний у популяціях від п'яти бінарних та одного складного схрещувань: F4 (Ахіллес × LP640-1304); F4 (LP3-1159 × Ахіллес); F4 (LP1-2163Н × Ахіллес); F4 (LP1-2581 × Ахіллес); F5 (Lophy × Abyssinian 1105) ч. з.); F6 (Lophy × (F2 (Ахіллес × 120708в б/о)) × Jersey.

Тестування дібраних перспективних селекційних доборів голозерного ячменю за вмістом у зерні мінерального фосфору виконували за допомогою модифікації лабораторних протоколів, викладених у роботах [25, 28]. Кожний зразок аналізували з використанням кількох (3—4) зернівок на наявність цільової *lpa*-мутації. Зразок з позитивним сигналом на *lpa*-мутацію аналізували з використанням окремих індивідуальних зернівок (не менш 20) на виявлення гомо/гетерогенності дібраного зразка.

Вміст антоціанинів у зерні селекційних доборів голозерного ячменю з чорним зерном визначали згідно з лабораторним протоколом [29, 30].

Результати та обговорення

Характеристики використаних нами мутацій ячменю за їх ефектом на вміст у зерні мінерального фосфору наведено у табл. 1.

Як видно з даних табл. 1, різні *lpa*-мутації мають неоднаковий вплив на вміст у зерні ячменю мінерального й органічного фосфору. Найбільше зниження вмісту у зерні фітатів (~75 %) і відповідне підвищення мінерального фосфору має ген *lpa3-1*. Сорт голозерного яч-

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив мутантних *lpa*-локусів на вміст у зерні ячменю органічного і мінерального фосфору [25, 26]

Локус	Позиція на хромосомі	Вплив на вміст органічного і мінерального фосфору
<i>lpa1-1</i> M422	2Н	Знижує на ~50 % вміст фітатів і еквівалентно підвищує вміст Р. На ~15 % знижує вміст загального фосфору
<i>lpa3-1</i> M635	1Н	Знижує на ~75 % вміст фітатів і еквівалентно підвищує вміст Р
M640	7Н	Знижує на ~50 % вміст фітатів і еквівалентно підвищує вміст Р. На ~15 % знижує вміст загального фосфору

меню Lophy також містить ген *lpa3-1*. Решта досліджених нами мутацій знижують вміст фітатів на ~50 %.

Як додаткову до *lpa*-мутацій ознаку, що істотно поліпшує харчову (біологічну) цінність зерна, ми обрали чорне забарвлення зерна ячменю, пов'язане з наявністю у периферійних шарах зернівки пігментів антоціанінів і меланіноподібних пігментів фітомеланінів з високою антиоксидантною активністю [31]. Як донор чорної пігментації у схрещуваннях використано зразок ячменю Abyssinian 1105 (рис. 2).

Спочатку потрібно було опрацювати лабораторну процедуру ідентифікації *lpa*-генотипів голозерного ячменю, яка була б достатньо продуктивною і придатною для використання у селекційній програмі для аналізу популяцій і доборів з *lpa*-мутаціями. Крім того, необхідно було визначитися, які з наявних у нашій колекції *lpa*-мутантів можна з найвищою ефективністю використовувати у селекційних програмах за цільовою ознакою максимально високого вмісту в зерні мінерального фосфору.

Принцип методу ідентифікації *lpa*-генотипів і хід якісного та кількісного визначення вмісту в зерні мінерального фосфору подаємо нижче.

Принцип методу. У ході реакції утворюється фосформолібденовий комплекс синього забарвлення, оптична густина якого прямо пропорційна вмісту мінерального фосфору, що вивільнюється у зерні в ході кислотної реакції.

Лабораторне обладнання. 1. Спектрофотометр двопроменеви UV-1800 Shimadzu, укомплектований кварцевими кюветами 10 мм (або аналог).

2. Термостат Memmert UM/SM 100 (або аналог).

3. Мішалка механічна «Вортекс» (Vortex) VELP Scientifica ZX3 (або аналог).

4. Ваги електронні 224i-IS Sartorius (або аналог).

5. Ударний пристрій плунжерного типу.

6. Пробірки центрифужні Eppendorf із застіркою 2 мл.

7. Мікропланшети для імуноферментного аналізу на 96 лунок.

8. Дозатор піпетковий.

Реактиви. 1. Кислота аскорбінова, х. ч.

2. Амоній молібденовокислий, х. ч.



Рис. 2. Зразки ячменю з різним забарвленням зерна: голозерний Ахіллес — жовте зерно; плівчастий Abyssinian 1105 — чорне зерно; голозерна селекційна лінія похідна від схрещування з Abyssinian 1105 — чорне зерно

3. Кислота сірчана концентрована, х. ч.

4. Кислота соляна концентрована, х. ч.

Робочі розчини. 1. Кислота аскорбінова, 10 %-й (маса/об'єм) розчин у дистильованій воді, зберігати за температури 4 °С не більше 1 місяця.

2. Амоній молібденовокислий, 2,5 %-й (маса/об'єм) розчин у дистильованій воді, можна зберігати за кімнатної температури.

3. Кислота сірчана 6 N (об'єм/об'єм, 18 мл концентрованої сірчаної кислоти до 108 мл дистильованою водою).

4. Кислота соляна 0,4 M (об'єм/об'єм, залежно від фактичної концентрації кислоти).

Приготування робочого реагенту (готується свіжий кожного дня). Змішували 2 частини води дистильованої, 1 частину 6 N кислоти сірчаної, 1 частину 2,5 %-го амонію молібденовокислого, 1 частину 10 %-ї кислоти аскорбінової.

Якісний аналіз на наявність мінерального фосфору. 1. Індивідуально окреме зерно (або кілька зернин залежно від завдання) зважували, подрібнювали ударним пристроєм плунжерного типу і вміщували у пробірку Eppendorf. Додавали 0,4 M HCl (із розрахунку 10 мкл на кожен мг зерна). Суміш перемішували і залишали на ніч для кислотної екстракції.

2. У кожен лунку планшета дозатором вміщували 10 мкл кислотного екстракту, туди ж додавали 90 мкл дистильованої води і 100 мкл робочого реагенту. Через 15—20 хв спостерігали утворення фосформолібденового комплексу синього кольору різної інтенсивності залежно від вмісту мінерального фосфору.

3. Фіксували наявність та інтенсивність синього забарвлення, порівнювали з різними колориметричними стандартами з концентраціями фосфору (у формі K_2HPO_4) від 0 до 10 000 нг (рис. 3).

Кількісний аналіз вмісту мінерального фосфору. 1. Для кількісного визначення мінерального фосфору проводили кислотний гідроліз як описано в п. 1 для якісного визначення.

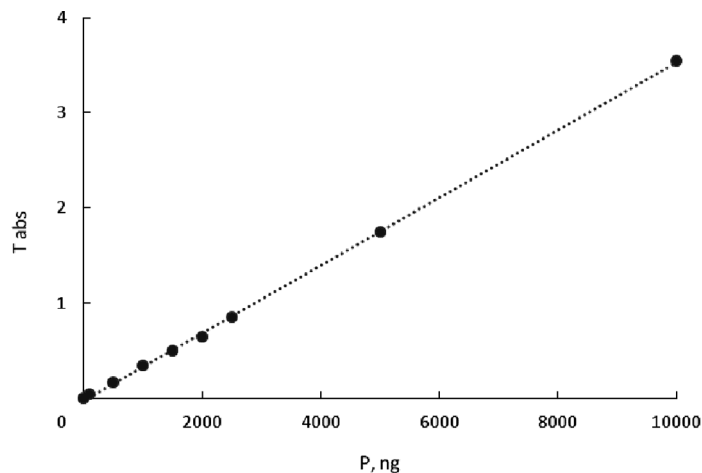


Рис. 3. Калібрувальний графік залежності оптичної густини розчинів і молярної концентрації фосфору

2. У чисту пробірку Eppendorf відбирали 50 мкл кислотного екстракту, додавали 1450 мкл дистильованої води і 100 мкл робочого реагенту, розмішували на Vortex протягом кількох секунд. Штатив із пробірками залишали на 2—4 год у термостаті за температури 37 °С.

3. Після закінченні реакції вимірювали оптичну густина кожного зразка в кюветі 10 мм, за довжини хвилі 820 нм порівняно з холодним зразком.

Побудова калібрувального графіка. Готували колориметричні стандартні зразки з вмістом фосфору (K_2HPO_4) — 0, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000 і 10 000 нг. До розчину з відомим вмістом фосфору додавали робочий реагент і після 2—4 год інкубації на спектрофотометрі визначали оптичну густина розчинів за довжини хвилі 820 нм порівняно з холодним зразком. Будували калібрувальний графік залежності оптичної густини розчинів і молярної концентрації фосфору (див. рис. 3).

Визначення вмісту у зерні ячменю мінерального фосфору показало високу відтворюваність і надійність ідентифікації *lpa*-генотипів з можливістю використання для аналізу, у разі потреби, лише однієї зернівки. Ї головне — лабораторний метод має досить високу продуктивність (не менш як 100 зразків за зміну на одного виконавця) оцінки зразків за вмістом у зерні мінерального фосфору і відповідає вимогам селекційного процесу, де оцінюються великі об'єми матеріалу.

Дослідження вихідних *lpa*-мутантних ліній показало досить істотну відмінність між ними за вмістом у зерні мінерального фосфору порівняно із колориметричними стандартами з відомим вмістом 0, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000 і 10000 нг мінерального фосфору.

На рис. 4 (верхній планшет) показано різницю у забарвленні стандартних розчинів і вихідних *lpa*-мутантних ліній. Можна бачити, що сорт голозерного ячменю CDC Lophy (*lpa3-1*) виявив найвищу інтенсивність забарвлення тест-розчину і, відповідно, мав найвищий вміст мінерального фосфору у зерні. Нижчу інтенсивність забарвлення тест-розчину показали *lpa*-мутантні лінії *LP1-2581* і *LP3-1159*, ще нижчою інтенсивність тест-розчину була у ліній *LP1-2163H* і *LP640-1304*. Тест-розчин зерна сорту-стандарту Ахіллес був практично безбарвним.

Ми добирали цільові генотипи дворядного голозерного ячменю у кожній з досліджуваних популяцій з урахуванням передусім агрономічних характеристик безвідносно до вмісту у зерні мінерального фосфору, оскільки нашим пріоритетним завданням було отримати перспективний селекційний матеріал, який не поступається за агрономічними характеристиками сорту-стандарту Ахіллес. Лише згодом отримані добори були досліджені за наявністю *lpa*-мутацій.

На рис. 5 наведено приклад аналізу зразків зерна доборів за наявністю *lpa*-мутацій на фактичному дослідному матеріалі з використанням для аналізу кожного зразка трьох індивідуальних зернин. Для прикладу обрано планшети зі зразками, які показали гетерогенність за наявністю *lpa*-мутацій. Збільшенні гетерогенні зразки sample 6 і sample 7 наведено на нижньому планшеті рис. 4.

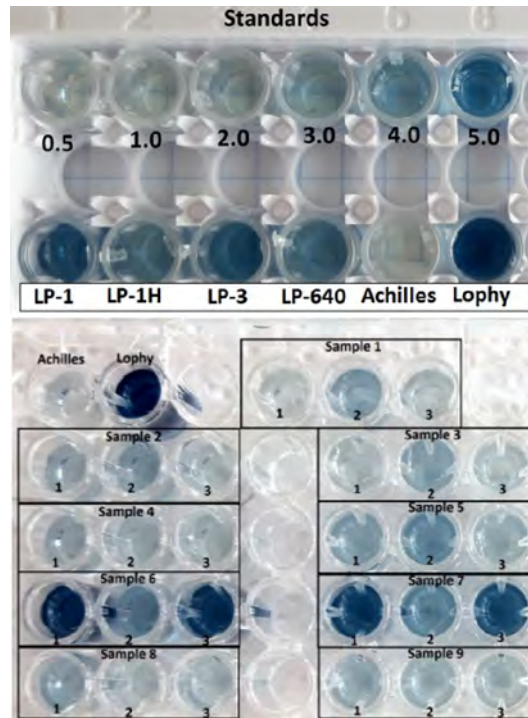


Рис. 4. Інтенсивність забарвлення тест-розчину як індикатор вмісту у зразку зерна мінерального фосфору: верхній планшет — колориметричні стандарти з інтервалом 500—5000 нг і вихідні *lpa*-мутантні лінії; нижній планшет — приклади генетичної гетерогенності доборів за вмістом мінерального фосфору — sample 6 і sample 7

У даному досліді нас цікавили винятково *lpa*-гомогенні зразки дворядного голозерного ячменю з агрономічними характеристиками не нижчими від сорту-стандарту Ахіллес. Остаточню *lpa*-гомогенність доборів визначали аналізом щонайменше 20 зернин кожного зразка, попередньо визначеного як *lpa*-позитивний.

У результаті оцінювання доборів з кожної комбінації схрещування виділено від 2 до 19 перспективних *lpa*-гомогенних селекційних доборів дворядного голозерного ячменю. Загалом із кожної популяції для статистичного аналізу на вміст у зерні мінерального фосфору було дібрано по 50 доборів, які показали *lpa*-позитивний тест, включно з доборами *lpa*-гетерогенними і *lpa*-гомогенними. Результати цього дослідження наведено в табл. 2.

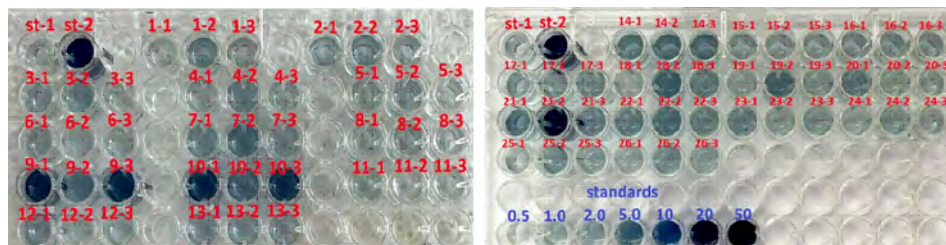


Рис. 5. Приклад ідентифікації *lpa*-доборів у популяції генотипів ячменю F5 Lophy × Abyssinian 1105 (чорне зерно)

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст мінерального фосфору в зерні селекційних доборів ярого дворядного голозерного ячменю (урожай 2021 р.)

Кількість досліджених зразків	Вміст мінерального фосфору, ppm		Кількість перспективних доборів
	min.	max.	
F5 Lophy × Abyssinian 1105 (ч. з.) (Lophy – 11,27 ppm)			
n = 50	1,67	11,27	19 (ч. з.)
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		12,49**	
F6 (Lophy × (F2(Ахіллес × 120708в б/о) × Jersey) (Lophy – 11,27 ppm)			
n = 50	0,91	11,25	2
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		5,84**	
F4 (LP1-2581 × Ахіллес) (LP1-2581 – 8,02 ppm)			
n = 50	1,24	7,82	3
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		10,62**	
F4 (LP1-2163H × Ахіллес) (LP1-2163H – 8,02 ppm)			
n = 50	0,94	8,15	4
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		7,76**	
F4 (LP3-1159 × Ахіллес) (LP3-1159 – 8,90 ppm)			
n = 50	1,27	8,90	12
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		7,43**	
F4 (Ахіллес × LP640-1304) (LP640-1304 – 7,10 ppm)			
n = 50	1,02	7,20	2
St Ахіллес (n = 5)	0,65	0,87	
t _{факт}		9,80**	

Всі 19 перспективних доборів із популяції F5 Lophy × Abyssinian 1105 ч. з., крім агрономічних характеристик близько рівня стандарту, мали добре виповнене чорне зерно з високим вимолотом колоса не нижче 90—95 % і вмістом у зерні мінерального фосфору на рівні сорту CDC Lophy (див. рис. 2, табл. 2).

З популяції F4 (LP3-1159 × Ахіллес) дібрано 12 перспективних *lra*-гомогенних доборів, у решти популяцій дібрано від 2 до 4 перспективних доборів зі значеннями вмісту в зерні мінерального фосфору на рівні вихідних *lra*-мутантних ліній.

Різна кількість дібраних із кожної популяції перспективних доборів пов'язана насамперед з різними агрономічними характери-

ками вихідних *lpa*-мутантних ліній. Нечисленні перспективні добори за вмістом у зерні мінерального фосфору були отримані саме з тих популяцій, у яких вихідні компоненти схрещування *lpa*-мутанти мали незадовільні агрономічні характеристики (схильність до хвороб, слабка адаптація й низька зернова продуктивність).

Як видно з отриманих даних, найперспективнішим для селекційного поліпшення голозерного ячменю за вмістом у зерні мінерального фосфору може бути канадський сорт Lophy, як джерело гена *lpa3-1*, що серед досліджених нами *lpa*-мутацій забезпечує найвищий відсоток вивільнення мінерального фосфору зерна. Другу за значенням позицію займають мутації *LP1-2581* та *LP3-1159*, решта *lpa*-мутацій поступаються їм за вмістом у зерні мінерального фосфору.

Усі 19 доборів комбінації F5 Lophy × Abyssinian 1105 (ч. з.) з ознакою «чорне зерно» були досліджені за вмістом у зерні пігментів антоціанінів. Вихідний чорнозерний зразок Abyssinian 1105 показав вміст у зерні антоціанінів на рівні 30 мг/кг, тоді як у сорту Lophy вміст антоціанінів наближався до нуля. Чорнозерні добори мали також вміст антоціанінів на рівні 30±5 мг/кг. Це невисокий рівень, який свідчить, що інтенсивний чорний колір зернівок Abyssinian 1105 зумовлений швидше за все не пігментами антоціанінами, а фітомеланінами, які у ячменю, на відміну від пшениці, досить часто є в зернінках з чорним забарвленням. Фітомеланіни, як і антоціаніни, зумовлюють високу антиоксидантну активність зерна і, як наслідок, його високу харчову (біологічну) цінність [32]. У подальших наших дослідженнях матеріал із кольоровим зерном і низьким вмістом фітатів неодмінно буде охарактеризований також за вмістом фітомеланінів.

Для успішної селекції низькофітатних сортів ячменю важливо мати інформацію про локалізацію *lpa*-мутацій у хромосомах та їхню асоціацію з іншими морфологічними і господарськими ознаками ячменю.

На рис. 6 схематично подано чотири генетичні групи зчеплення ячменю та приблизні позиції 17 *lpa*-локусів разом із геном MIPS (*myo*-Inositol-3-P1 synthase), який кодує біосинтез ключового ферменту біосинтезу Ins. Мутантні *lpa*-локуси та ген MIPS розміщені на

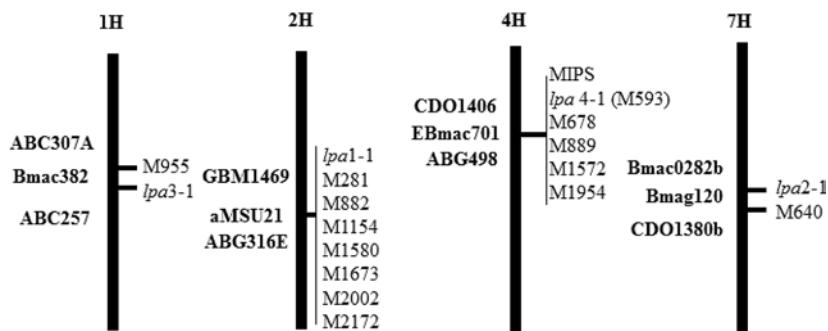


Рис. 6. Хромосомна локалізація 17 *lpa*-мутацій та гена MIPS (*myo*-Inositol-3-P1 synthase) ячменю (позначені на карті праворуч) і зчеплених з ними маркерних локусів (позначені на карті ліворуч) [33]

карті праворуч. ДНК-маркери для детекції цих локусів позначені на карті ліворуч.

Мутантний ген *lpa1-1* був картований у довгому плечі хромосоми 2Н у тісному зчепленні з STS-PCR маркером, aMSU21 маркером, RELP маркером ABC 157 близько до локусу, що контролює 2/6-рядність колоса. Мутації *lpa3-1* і LP640 розміщені у хромосомах 1Н і 7Н відповідно [7].

Селекція низькофітатних сортів ячменю, як спосіб поліпшення біологічної цінності зерна і захисту навколишнього середовища від засмічення органічними фосфатами, нині активно здійснюється у низці країн світу. Першість у створенні *lpa*-мутацій та їхнє всебічне вивчення належать групі вчених Національної колекції дрібнозерних злаків Департаменту сільського господарства США (USDA, Aberdeen). Після появи *lpa*-мутантних ліній вчені США та Канади (Crop Development Centre, University Saskatchewan) створили перші сорти *lpa*-ячменю з низьким вмістом у зерні фітатів. Це зареєстровані селекційні лінії LP1, LP2, LP3, LP4, що несли мутації *lpa1-1*, *lpa2-1*, *lpa3-1* та Pmut995 відповідно [34]. Згодом були зареєстровані перші *lpa*-сорти ячменю, такі як плівчасті сорти Herald (*lpa1-1*) [35], Clearwater (*Pmut640*) [36] та голозерні — CDC Lophy (*lpa3-1*) і Sawtooth (*lpa1-1*) [37, 38].

Програма селекції *lpa*-сортів ячменю неодмінно потребує використання спеціальних лабораторних методів контролю *lpa*-мутацій та оцінювання їхніх ефектів у селекційних популяціях. Використання у селекції відомих молекулярних маркерів *lpa*-мутацій (MAS-селекція) уможливує такий контроль. Однак селекція сортів *lpa*-ячменю потребує швидкого аналізу великих за розміром селекційних популяцій, а застосування методу молекулярних маркерів для цієї мети є досить коштовним. Тому для селекційного використання опрацьовувалися простіші, але досить надійні, лабораторні тести детекції *lpa*-мутацій, які дають змогу виконувати скринінг гомозиготних *lpa*-генотипів з використанням обмеженої кількості зернівок (3—5) або навіть окремих зернівок [25, 28].

Ми опрацьовали таку лабораторну процедуру і перевірили практично на конкретному селекційному матеріалі доборів голозерного ячменю з цільовими *lpa*-мутаціями. У результаті цього дослідження залучено у схрещування й оцінено за потенційними агрономічними характеристиками наявні *lpa*-мутації, що можуть бути найціннішими як окремо, так і в комбінації кількох мутацій для селекції сортів голозерного *lpa*-ячменю харчового і кормового напрямів використання зерна. Практичним результатом нашого дослідження є дібрані цінні у агрономічному відношенні селекційні *lpa*-генотипи (в тому числі з чорним зерном), які слугуватимуть перспективним вихідним матеріалом у нашій поки що єдиній в Україні селекційній програмі створення *lpa*-сортів голозерного ячменю.

Створення в Україні сортів *lpa*-ячменю має надзвичайно важливе значення насамперед у харчовому плані, оскільки, як зазначалось, поліаніонна структура фітатів зв'язує у недоступну для засвоювання форму крім фосфору також позитивно заряджені двовалентні іони заліза, кальцію, магнію, мангану, цинку і міді [4]. У разі інтен-

сифікації в Україні тваринництва і птахівництва *lpa*-сорти голозерного ячменю будуть мати важливе господарське значення і в кормовиробництві.

Звісно ж, як харчове, так і кормове використання голозерного *lpa*-ячменю сприятиме зниженню також шкідливого екологічного навантаження навколишнього середовища органічними фосфатами.

У світовому масштабі популярність відносно нової (швидше знову відкритої) культури голозерного ячменю, як харчового продукту із функціональним статусом, невпинно зростає, особливо за останні 10–15 років [39].

REFERENCES

1. Key, M.N., Zwilling, Ch.E., Talukdar, T. & Barbey, A.K. (2019). Essential amino acids, vitamins, and minerals moderate the relationship between the right frontal pole and measures of memory. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 53, No. 15, p. 1801048. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801048>
2. Berdanier, C., Dwyer, J. & Herber, D. (2013). *Handbook of nutrition and food* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15294>
3. Harland, B. & Morris, E. (1995). Phytate: a good or bad food component? *Nutr. Res.*, 15, No. 5, pp. 733-754. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00040-P](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00040-P)
4. Horii, S., Matsuno, T., Tagomor, J., Mukai, M., Adhikari, D. & Kubo, M. (2013). Isolation and identification of phytate-degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil. *J. Genet. Appl. Microbiol.*, 59, No. 5, pp. 353-360. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.353>
5. Li, Y., Ledoux, D., Veum, T., Raboy, V., Zyla, K. & Wikiera, A. (2001). Bioavailability of phosphorus in low phytic acid barley. *J. Appl. Poultry Res.*, 10, No. 1, pp. 86-91. <https://doi.org/10.1093/japr/10.1.86>
6. Dorsch, J., Cook, A., Young, K., Anderson, J.M., Bauman, A.T. & Volkmann, C.S. (2003). Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry*, 62, No. 5, pp. 691-706. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00610-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00610-6)
7. Larson, S., Young, K., Cook, A., Blake, T.K. & Raboy, V. (1998). Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theor. Appl. Genet.*, 97, pp. 141-146. <https://doi.org/10.1007/s001220050878>
8. Oliver, R., Yang, C., Hu, G., Raboy, V. & Zhang, M. (2009). Identification of PCR-based DNA markers flanking three low phytic acid mutant loci in barley. *J. Plant Breed. Crop. Sci.*, 1, No. 4, pp. 87-93. <http://www.academicjournals.org/jpbcs>
9. Kim, S., Andaya, C. & Goyal, S. (2008). The rice OsLpa1 gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism. *Theor. Appl. Genet.*, 117, No. 5, pp. 769-779. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0818-z>
10. Larson, S., Rutger, J., Young, K. & Raboy, V. (2000). Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Sci.*, 40, No. 5, pp. 1397-1405. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051397x>
11. Liu, Q., Xu, X., Ren, X., Fu, H., Wu, D. & Shu, Q. (2007). Generation and characterization of low phytic acid germplasm in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 114, pp. 803-814. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0478-9>
12. Ren, X., Liu, Q., Fu, H., Wu, D. & Shu, Q. (2007). Density alteration of nutrient elements in rice grains of a low phytate mutant. *Food Chem.*, 102, No. 4, pp. 1400-1406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.065>
13. Zhao, H., Liu, Q., Fu, H., Xu, X., Wu, D. & Shu, Q. (2008). Effect of non-lethal low phytic acid mutations on grain yield and seed viability in rice. *Field Crops Res.*, 108, No. 3, pp. 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.05.006>
14. Zhao, H., Liu, Q., Ren, X., Wu, D. & Shu, Q. (2008). Gene identification and allele-specific marker development for two allelic low phytic acid mutations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.*, 22, pp. 603-612. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9202-6>

15. Guttieri, M., Bowen, D., Dorsch, J., Raboy, V. & Souza, E. (2003). Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.*, 44, No. 2, pp. 418-424. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.4180>
16. Pilu, R., Panzeri, D., Gavazzi, G., Rasmussen, S.K., Consonni, G. & Nielsen, E. (2003). Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (lpa241). *Theor. Appl. Genet.*, 107, pp. 980-987. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1316-y>
17. Raboy, V., Gerbasi, P., Young, K., Stoneberg, S.D., Pickett, S.C., Bauman, A.T., Murthy, P.P.N., Sheridan, W.F. & Ertl, D.S. (2000). Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.*, 124, No. 1, pp. 355-368. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.355>
18. Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, S., Meeley, R.B. & Ertl, D.S. (2003). The maize low-phytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.*, 131, No. 2, pp. 507-515. <https://doi.org/10.1104/pp.014258>
19. Shi, J., Wang, H., Hazebroek, J., Ertl, D.S. & Halp, T. (2005). The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant J.*, 42, No. 5, pp. 708-719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02412.x>
20. Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J.M., Meeley, R.B., Ertl, D.S., Ranch, J.P. & Glassman, K. (2007). Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.*, 25, pp. 930-937. <https://doi.org/10.1038/nbt1322>
21. Hitz, W., Carlson, T., Kerr, P. & Sebastian, S.A. (2002). Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.*, 128, No. 2, pp. 650-660. <https://doi.org/10.1104/pp.010585>
22. Wilcox, J., Premachandra, G., Young, K. & Raboy, V. (2000). Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci.*, 40, No. 6, pp. 1601-1605. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4061601x>
23. Yuan, F., Zhao, H., Ren, X., Zhu, S., Fu, X. & Shu, Q. (2007). Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Genet.*, 115, pp. 945-957. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0621-2>
24. Campion, B., Sparvoli, F., Doria, E. & Nielsen, E. (2009). Isolation and characterization of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 118, pp. 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0975-8>
25. Raboy, V. (2002). Progress in breeding low phytate crops. *J. Nutr.*, 132, No. 3, pp. 503-505. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.503S>
26. Raboy, V., Young, K., Dorsch, J. & Cook, A. (2001). Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J. Plant Physiol.*, 158, No. 4, pp. 489-497. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00361>
27. Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanisovich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K., Tuveison, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganai, M., Powell, W. & Waugh, R. (2000). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156, pp. 1997-2005. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1997>
28. Chen, P., Toribara, T. & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Biochem.*, 28, No. 11, pp. 1756-1758. <https://doi.org/10.1021/ac60119a033>
29. Abdel-Aal, E.-S. & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.*, 76, pp. 350-354.
30. Abdel-Aal, E.-S. & Hucl, P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 51, No. 8, pp. 2174-2180. <https://doi.org/10.1021/jf021043x>
31. Siebenhandl, S., Grausgruber, H., Pellegrini, N., Fogliano, V. & Pernice, R. (2007). Phytochemical profile of main antioxidants in different fractions of purple and blue wheat, and black barley. *J. Agric. Food Chem.*, 55, No. 21, pp. 8541-8547. <https://doi.org/10.1021/jf072021j>
32. Glagoleva, A., Shoeva, O. & Khlestkina, E. (2020). Melanin pigment in plants. *Front. Plant Sci.*, 11, p. 770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>
33. Raboy, V., Peterson, K., Jackson, C., Marshall, J.M., Hu, G., Saneoka, H. & Bregitzer, P. (2015). A substantial fraction of barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid mutations

- have little or no effect on yield across diverse production environments. *Plants*, 4, No. 2, pp. 225-239. <https://doi.org/10.3390/plants4020225>
34. Harvey, B. & Rosnagel, B. (1984). Harrington barley. *Can. J. Plant Sci.*, 64, No. 1, pp. 193-194. <https://doi.org/10.4141/cjps84-024>
 35. Bregitzer, P. & Raboy, V. (2007). Registration of four low-phytate/wild type pairs of barley germplasm. *J. Plant Reg.*, 1, No. 2, pp. 139-140. <https://doi.org/10.3198/jpr2007.02.0070crg>
 36. Bregitzer, P., Raboy, V., Obert, D., Windes, S. & Whitmore, J.C. (2008). Registration of 'Clearwater' low-phytate hull-less spring barley. *J. Plant Reg.*, 2, No. 1, pp. 1-4. <https://doi.org/10.3198/jpr2007.07.0388crg>
 37. Rosnagel, B., Zatorski, T., Arganosa, G. & Beattie, A.D. (2008). Registration of «CDC Lophy» barley. *J. Plant Reg.*, 2, No. 3, pp. 169-173. <https://doi.org/10.3198/jpr2008.02.0095crg>
 38. Bregitzer, Ph., Hu, G., Marshall, J. & Raboy, V. (2017). Registration of «Sawtooth» low-phytate, hullless, spring barley. *J. Plant Reg.*, 11, No. 2, pp. 81-84. <https://doi.org/10.3198/jpr2016.09.0049crg>
 39. Shaveta, H., Kaur, H. & Kaur, S. (2019). Hullless barley: a new era of research for food purposes. *J. Cereal Res.*, 11, No. 2, pp. 114-124. <https://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/JWR>

Received 10.11.2022

LPA-MUTATIONS AND HULL-LESS BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)
BIOFORTIFICATION IN GRAIN MINERAL PHOSPHORUS

O.I. Rybalka^{1,2}, B.V. Morgun^{2,3}, M.V. Chervonis¹, S.S. Polyshchuk¹, V.V. Morgun²,
I.G. Toporash¹, A.V. Trojanyvska¹

¹Plant Breeding and Genetics Institute—National Centre of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine

3 Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

³Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Academic Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine
e-mail: molgen@icbge.org.ua

Phosphorus is a key mineral for a human as well as an animal body. Approximately 65–85 % of total seed phosphorus content of cereals and legumes are stored in a bounded form of phytic acid (*mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexa-kisphosphate*) and therefore is not available for human and non-ruminant animals' nutrition. Inaccessible to digestion organic phosphorus in form of phytates excreted from the body of non-ruminant animals and poultry with feces creates an ecological problem displayed as drinking water pollution (eutrophication of waterways). Development of low-phytate hull-less barley varieties on the base of *lpa*-mutations allows to enhance substantially the grain phosphorus uptake (bioavailability) by animals and humans thereby decreasing the harmful ecological load with organic phosphates. Series of original *lpa*-mutations was used in a special breeding program aimed on development of low-phytate hull-less barley with grain enhanced mineral phosphorus in combination with black seed pericarp (from Abyssinian 1105 collection strain) as a marker of increased anthocyanin pigments content possessing with elevated grain antioxidant activity. As a *lpa*-mutations recipient spring hull-less barley commercial variety Achilles was used. On the base of crosses several segregating populations were developed. The number of advanced breeding hull-less barley lines with elevated grain mineral phosphorus combined with black pericarp were isolated. Laboratory protocol needed for detection of *lpa*-mutations in breeding populations was used with some modifications and improvements required for efficient selection of the target *lpa*-genotypes. Laboratory procedure sensitivity allows reliable detection of *lpa*-mutations in breeding population using minimal sample size as single individual seeds or parts of them.

Key words: hull-less barley, phytates, mineral phosphorus, *lpa*-mutations, biofortification.