

<https://doi.org/10.15407/frg2019.02.095>

УДК 575.113.2:577.112.82

ЗНИЖЕННЯ ВМІСТУ ФІТАТІВ ЯК ЗАСІБ БІОФОРТИФІКАЦІЇ ЯЧМЕНЮ ЗА МІНЕРАЛЬНИМ СКЛАДОМ ЗЕРНА

О.І. РИБАЛКА^{1,2}, В.В. ШВАРТАУ², С.С. ПОЛІЩУК¹, Б.В. МОРГУН^{2,3}

¹Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннезнавства 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 (фітатів) і недоступний для засвоєння. Незасвоєний органічний фосфор у формі фітатів, що виводиться з організму з фекаліями, створює екологічну проблему, передусім погіршує якість питної води. У статті наведено літературні дані щодо створення генотипів основних зернових культур і, зокрема, ячменю із генетично контрольованим низьким вмістом у зерні цієї речовини. На культурі ячменю наразі відомо понад 20 мутантів із низьким вмістом у зерні фітатів, які репрезентують щонайменше шість різних *lra*-локусів, кожен з яких по-різному впливає на вміст у зерні органічного та мінерального фосфору. Показано, що селекція *lra*-сортів цієї культури потребує неодмінного використання спеціальних лабораторних методів контролю *lra*-мутацій та оцінювання їх ефектів у селекційних популяціях. Отримані дані підтвердили, що *lra*-мутантні лінії навіть без попереднього селекційного добору істотно не поступаються лініям з алелями дикого типу. Продемонстровано, що створення зернових злаків із низьким вмістом у зерні фітатів відкриває принципово інші можливості виробництва високоякісного м'яса разом зі зниженням забруднення навколишнього середовища фосфатами. На підставі аналізу літературних джерел, в яких викладені результати досліджень із годівлі тварин різних видів раціонами кормів з низькофітатним і звичайним ячменем, встановлено, що ефективність утилізації фосфору низькофітатного ячменю порівняно зі звичайним значно вища. Крім того, згодовування тваринам низькофітатного ячменю сприяє зниженню викидів у навколишнє середовище неутілізованих фосфатів із фекаліями, поліпшує утилізацію мультивалентних катіонів у кормах. Показано, що створення сортів низькофітатного ячменю на основі *lra*-мутацій дає змогу істотно поліпшити ефективність засвоєння (біодоступність) фосфору із зерна ячменю людиною і тваринами та знизити шкідливе навантаження навколишнього середовища фосфатами.

Ключові слова: ячмінь, фітати, фосфор, *lra*-мутації, біофортificaція.

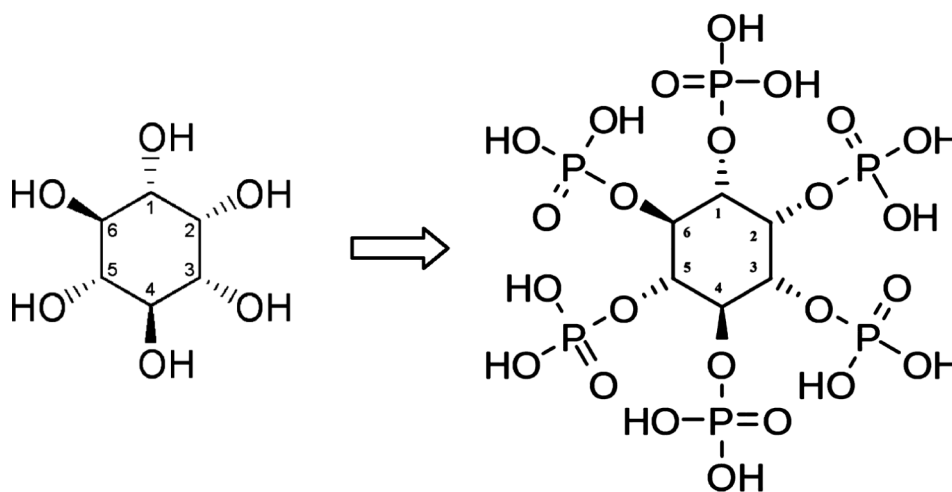


Рис. 1. Молекулярна структура міоїнозитулу і фітинової кислоти (<https://en.wikipedia.org/wiki/Phytase>)

Мінерали можуть потрапити в організм людини виключно з їжею. У цьому полягає стратегічне значення мінерального складу щоденного харчового і кормового раціону. Серед п'яти найважливіших для нашого організму мінералів (кальцій, фосфор, калій, натрій, магній) фосфор є другим за функціональним значенням. Він становить до 1 % загальної маси тіла і міститься у кожній клітині з максимальним його вмістом у кістках та зубах. Цей мінерал відіграє стратегічну роль у клітинному метаболізмі. Фосфор у структурі фосфоліпідів входить до складу клітинних мембран. П'ятивалентний фосфор є складовою частиною молекули аденозинтрифосфату (АТФ) — універсального джерела енергії для більшості біохімічних процесів у клітинах. У формуванні фосфодіестерного зв'язку між нуклеотидами нуклеїнових кислот також задіяний п'ятивалентний фосфор, без якого неможливе формування і відтворення структури та функціонування носіїв спадковості [1].

Щодобова потреба дорослої людини у фосфорі 1,2–1,6 г. Зерно ячменю містить фосфору в середньому 470 мг/100 г сухої речовини і переважає за вмістом цього мінералу зерно інших злаків, таких як пшениця (410), жито (380), овес (340), рис (285), кукурудза (310) [1]. Однак близько двох третин (~65–85 %) загального вмісту фосфору в зернових і бобових культур зв'язано в органічній формі фітинової кислоти (міоїнозитол-1,2,3,4,5,6-гексакісфосфат), яка є основною формою депонування фосфору в зерні. Вміст фітинової кислоти у зерні ячменю становить 0,98–1,16 %. Близько 80 % загальної кількості фітинової кислоти (Ins P6) міститься у триплоїдному алейроновому шарі, а решта локалізована в зародку зерна.

Фітинова кислота несе великий негативний заряд, який підтримується в широкому діапазоні рН. Шість фосфатних груп у молекулі фітинової кислоти утворюють солі (фітати, або фітин) із різними катіонами металів, такими як K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} . Фітати злаків представлені здебільшого K, Mg -солями, і зв'язують в органічну форму понад 50 % загального вмісту в зерні K і Mg . Ці катіони разом із

фосфором фітатів та міоїнозитолом утворюють пул метаболітів і мінералів для проростка на ранніх стадіях його розвитку.

Молекула фітинової кислоти в рослинах утворюється в результаті поетапного фосфорилування молекули шестиатомного спирту міоїнозиту (Ins). Біосинтез Ins каталізує фермент *D*-міоїнозитол-3-фосфатсинтаза (MIPS, myoinositol-3-phosphate synthase). Цей фермент конвертує молекулу глюкозо-6-фосфату до Ins-монофосфату $\text{Ins}(3)\text{P}_1$ з одним залишком фосфату в позиції *D*-3, а останній поетапно фосфорилується до фітинової кислоти.

Біологічна роль фітатів в організмі людини далеко не однозначна. З одного боку, фітати потенційно корисні, оскільки виявляють антиоксидантні й антиканцерогенні властивості [2], з іншого — молекулярна структура фітатів поліаніонна (рис. 1), вони здатні хелатувати двовалентні катіони і тим самим знижувати біодоступність таких металів, як залізо, кальцій, манган, магній, цинк, мідь. Фітати також неселективно комплексуються з білками, й отже, здатні пригнічувати активність таких травних ферментів, як α -амілаза, трипсин, знижувати засвоюваність білків організмом людини і тварин, утворювати фітатпротеїнмінеральні комплекси. Ці комплекси нерозчинні й резистентні до ензиматичного гідролізу, а зв'язаний білок — недоступний для засвоєння. Фосфор фітатів не засвоюється організмом людини, тваринами з однокамерним шлунком (свині) і птицею, головним компонентом раціону якої є зерно [4].

Для нежуйних тварин і птиці фітати однозначно є антипоживним субстратом і виводяться з організму з фекаліями. За підрахунками американських фахівців, у США з екскрементами птиці від індустриального птахівництва в навколишнє середовище щорічно викидається понад 250 тис. т фосфору з тенденцією до зростання [4]. Фітати, що потрапили у ґрунт, мінералізуються ґрунтовими фітатдеградувальними бактеріями видів *Pseudomonas rhodesiae* і *Flavobacterium johnsoniae* до елементарного фосфору, який є компонентом мінерального живлення рослин і не завдає екологічної шкоди [3]. Однак багаті на фосфати поверхневі стоки навантажених фітатами еродованих ґрунтів, що стікають у річки й озера, стимулюють активний ріст і накопичення біомаси водоростей, фітопланктону, спричинюють екологічну шкоду (евтрофікацію), значно погіршують якість води. За підрахунками фахівців, кількість фосфору фітинової кислоти, що його щорічно продукують рослини, еквівалентна 65 % кількості фосфору щорічного світового виробництва фосфорних мінеральних добрив [4].

Отже, високий вміст фітатів у зерні й зернових кормах (харчах) створює дві масштабні проблеми: кормову (харчову) та екологічну. Звідси очевидно, що збільшення біодоступності фітатів дає змогу вирішити їх, а саме, поліпшити засвоюваність мінерального фосфору фітатів і запобігти забрудненню навколишнього середовища.

Одним зі шляхів вивільнення мінерального фосфору із фітатів є використання специфічного фітатдеградувального ферменту фітази [5, 6]. Фермент фітаза належить до класу фосфатаз. Загалом ці сполуки мають досить широку субстратну специфічність і здійснюють гідроліз (дефосфорилування) цілої низки фосфорильованих органічних сполук, подібних за структурою до фітатів: АДФ, АТФ, феніл-

фосфат, глюкозо-6-фосфат, гліцерофосфат, 3-фосфогліцерат, та ін. І лише деякі бактеріальні та грибні фітази, наприклад із *Bacillus* sp. та *Aspergillus* sp., мають вузьку субстратну специфічність саме до фітатів зерна. Фітази здійснюють гідроліз фітатів поетапно, так, що продукт гідролізу першого етапу є субстратом для наступного. Фітаза (КФ 3.2.3.8) каталізує гідроліз фітатів до інозитолполіфосфатів і ортофосфорної кислоти [7]. Першу генерацію специфічних до фітатів комерційних препаратів фітази було створено у 1991 р. саме з метою запобігання засміченню навколишнього середовища фосфатами й підвищення біодоступності фосфору кормових зернових продуктів. З тих пір мікробіологи розробили цілу серію нових високоефективних препаратів фітази. На сьогодні вони є найбільш уживаними в світі кормовими препаратами, що використовуються в ~90 % кормових раціонів у птахівництві та в ~70 % раціонів у свинарстві [4].

Однак використання комерційних ферментних препаратів фітаз у кормовиробництві є досить дорогим способом мінералізації фітатів. Тому упродовж кількох десятиліть, з початку усвідомлення означених вище проблем, бажано було отримати генотипи зернових культур із генетично контрольованим низьким вмістом у зерні фітатів (low phytic acid — *lpa*). І згодом такі генотипи основних зернових культур були створені за використання хімічного мутагенезу чи радіаційного опромінення рослин включно з такими культурами, як ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) [8–10], рис (*Oryza* spp.) [11–16], пшениця (*Triticum* spp.) [17], кукурудза (*Zea mays* L.) [18–22], соя (*Glycine max.* L.) [23–25] і боби (*Vicia* spp.) [26].

З появою *lpa*-мутантів були ініційовані дослідження мутантних генів і генетичного контролю біосинтезу фітатів. Кілька генів, що кодують біосинтез ключових ферментів, пов'язаних із низьким вмістом фітатів, ідентифіковані в різних видів злаків включно з MIPS у сої [23], ZmIPK (inositol phosphate kinase) у кукурудзи [20], AtIPK1 та AtIPK2β в арабідопсису [27], MİK (myo-inositol kinase) у кукурудзи [21] і рису [28], OsLPA1 у рису [11], MRP ABC (multidrug resistance-associated protein ATP-binding cassette) транспортер у кукурудзи [22] та рису [29] і сої [30], LOC Os04g55800 (sulphate transporter) у рису [31]. У результаті цих досліджень встановлено що гени, які детермінують біосинтез фітатів, мають подібні механізми генетичного контролю низького вмісту фітинової кислоти у зерні різних видів культур.

На культурі ячменю наразі відомо понад 20 мутантів із низьким вмістом у зерні фітатів, які репрезентують щонайменше шість різних *lpa*-локусів [10]. Кожен із мутантних локусів по-різному впливає на вміст у зерні ячменю органічного та мінерального фосфору (табл. 1). Крім *lpa*-локусів ген, що контролює ключовий фермент біосинтезу Ins (MIPS), був картований на хромосомі 4Н, а мутантний локус M678 тісно зчеплений із цим геном.

Шість неалельних *lpa*-локусів, що контролюють низький вміст фітинової кислоти, було ідентифіковано в результаті генетичного аналізу. Так, локуси *lpa1-1* (M422) та *lpa2-1* (M1070) були картовані на хромосомах відповідно 2Н і 7Н [9]. Локуси *lpa3-1* (M635, M955) також неалельні, але локалізовані в одній групі зчеплення на хромосомі 1Н [32], тоді як M678 і M640 неалельні до *lpa2-1* і картовані на

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТАТОВ КАК СРЕДСТВО БИОФОРТИФИКАЦИИ

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив мутантних *lpa*-локусів на вміст у зерні ячменю органічного і мінерального фосфору [33, 35]

Локус	Позиція на хромосомі	Вплив на вміст фосфору
<i>lpa1-1</i> M422	2Н	Знижує на ~50 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору. На ~ 15 % знижує вміст загального фосфору
<i>lpa2-1</i> M1070	7Н	Знижує на ~50 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору
<i>lpa3-1</i> M635	1Н	Знижує на ~75 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору
M640	7Н	Знижує на ~50 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору. На ~15 % знижує вміст загального фосфору
M593	4Н	Знижує на ~50 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору
M955	1Н	Знижує на >95 % вміст фітину, еквівалентно підвищує вміст фосфору

хромосомах відповідно 4Н і 7Н [10]. Водночас не ідентифіковано жодного функціонального гена, що відповідав би за ознаку «низький вміст фітатів».

Підбивши підсумки результатів доступних нам публікацій, можна констатувати, що на культурі ячменю ідентифіковано 24 індукованих мутагеном азидом натрію *lpa*-мутацій. Хоча й не можна стверджувати, що ця кількість *lpa*-мутантів на сьогодні є остаточною. Ідентифіковані мутантні *lpa*-локуси ілюструє схематична генетична карта в чотирьох групах зчеплення ячменю (рис. 2).

Першу мутацію *lpa1-1* отримано внаслідок обробки насіння ячменю сорту Harrington мутагеном азидом натрію. Вона знижує вміст фітинової кислоти на 50 % порівняно зі стандартом, і відповідно у молярному еквіваленті підвищується вміст неорганічного фосфору. Мутантний ген *lpa1-1* був картований у довгому плечі хромосоми 2Н



Рис. 2. Позиції 17 *lpa*-мутацій і гена MIPS (myoinositol-3-P1 synthase) ячменю (позначено на карті справа) та зчеплених із ними маркерних локусів (позначено на карті зліва) [34]

Мутантні *lpa*-локуси і ген MIPS розміщені на карті справа, ДНК-маркери для детекції цих локусів — зліва

у тісному зчепленні з STS-PCR-маркером, aMSU21-маркером, RELP-маркером ABC 157 близько до локусу що контролює 2/6-рядність колоса [9]. Аби знайти маркер для *lpa1-1*, надійний для використання у маркеропосередкованій (MAS) селекції, було досліджено кілька інших маркерів, фланкуючих aMSU21. Кандидатами виявилися SCAR-маркер на основі ПЛР, ABC153 та SSR-маркер EVmac415, обидва надійно асоційовані з низьким вмістом фітатів у різних популяціях. Фактично *lpa1-1* картований між ABC153 й aMSU21 на відстані 16,8 сМ або між EVmac415 та aMSU21 на відстані 25,5 сМ. Результати подібних генетичних досліджень із картування та розробки системи молекулярно-генетичного маркерування інших *lpa*-локусів наведені в публікаціях [10, 32, 34].

Світовим лідером у створенні *lpa*-мутантних ліній та їх всебічному вивченні була дослідницька група науково-дослідного відділу Національної колекції дрібнозерних злаків Департаменту сільського господарства США (USDA, Aberdeen). Після створення серії *lpa*-мутантних ліній група вчених USDA США та Канади (Crop Development Centre, University Saskatchewan) ініціювала селекційні програми створення сортів *lpa*-ячменю з низьким вмістом у зерні фітатів. З'явилась низка селекційних ліній LP1, LP2, LP3, LP4, що несли мутації відповідно *lpa1-1*, *lpa2-1*, *lpa3-1*, *Pmut995* [36]. Згодом було зареєстровано перші *lpa*-сорти ячменю — плівчасті Herald (*lpa1-1*) [37], Clearwater (*Pmut640*) [38] та голозерні CDC Lophy (*lpa3-1*), Sawtooth (*lpa1-1*) [39, 43]. Назва сорту ячменю Clearwater не випадкова і символічна: у перекладі з англійської означає «чиста вода». У створених сортах ячменю зниження вмісту в зерні фітатів порівняно зі стандартом сортом Harrington відповідало власне ефектам самих мутантних генів: 50 % для *lpa1-1*, 65 % для *lpa3-1* і 95 % для *Pmut995* [8]. Вміст загального (органічного і мінерального) фосфору в зерні сортів носіїв *lpa3-1* і *Pmut995* не змінювався, а для *lpa1-1* зафіксовано його зниження до ~10 %.

Селекція *lpa*-сортів ячменю потребує неодмінного використання спеціальних лабораторних методів контролю *lpa*-мутацій та оцінювання їх ефектів у селекційних популяціях. Із цією метою застосовують систему молекулярних маркерів *lpa*-мутацій (MAS-селекцію). Однак, оскільки метод молекулярних маркерів досить дорогий, його замінили на простіший лабораторний тест детекції *lpa*-мутацій, який дає змогу виконувати скринінг гомозиготних *lpa*-генотипів на обмеженій кількості зернівок (3—5) або навіть на окремих зернівках.

Для аналізу беруть 5 зернівок з кожної рослини (колоса). Зерна зважують, подрібнюють, добавляють 10 мкл 0,4 М HCl на кожен міліграм маси подрібнених зернівок і залишають суміш на ніч для екстрагування. З кожної проби відбирають по 10 мкл екстракту, для визначення в ньому вмісту неорганічного фосфору використовують модифікацію оригінальної лабораторної процедури, яку запропонували Чін та співавт. [40]. У разі виконання аналізу з індивідуальними зернівками екстракти кожної зернівки вміщують у 96-коміркову мікропланшету, в кожену комірку додають по 90 мкл демінералізова-

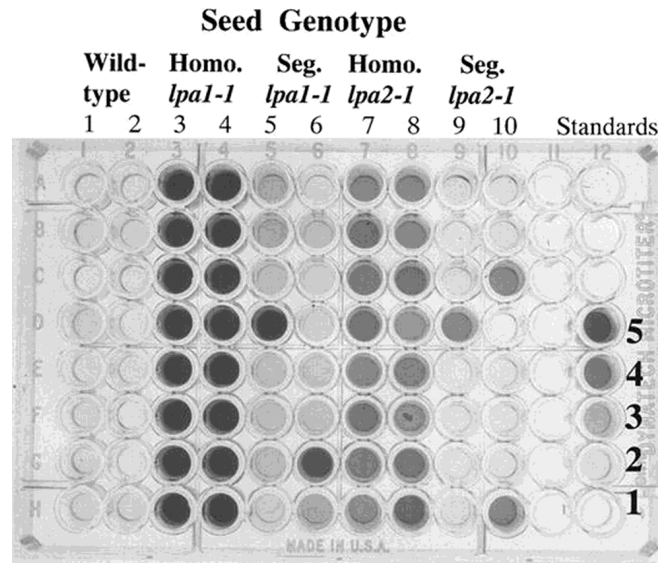


Рис. 3. Простий кольоровий тест визначення *lpa*-генотипів: 1, 2 — Wild type — дикий тип (вихідний сорт); 3, 4 — Homo. *lpa1-1* — гомозигота; 5, 6 — Seg. *lpa1-1* — розщеплення; 7, 8 — Homo. *lpa2-1* — гомозигота; 9, 10 — Seg. *lpa2-1* — розщеплення; Standards: 1–5 — стандарти [33]

ної води і 100 мкл реагенту Чіна (1 об'єм 3 М сірчаної кислоти, 1 об'єм 20 мМ молібдату амонію, 1 об'єм 0,57 М аскорбінової кислоти і 2 об'єми демінералізованої води). Тривалість інкубації суміші — 2–4 год. Після закінчення інкубації визначають вміст неорганічного фосфору порівнянням екстинкції проб зі стандартами (0; 155, 465, 930, 1395, 2325 нг фосфору у формі K_2HPO_4) за довжини хвилі 810 нм. Зернівки із вмістом мінерального фосфору 930 нг і більше вважають потенційними *lpa*-гомозиготами (рис. 3).

Тест, наведений на рис. 4, вказує на залежність вмісту мінерального фосфору від генотипу ендосперму, а не генотипу рослини. Колориметричні стандарти 1–6 містили відповідно 0,0; 0,15; 0,46; 0,93;

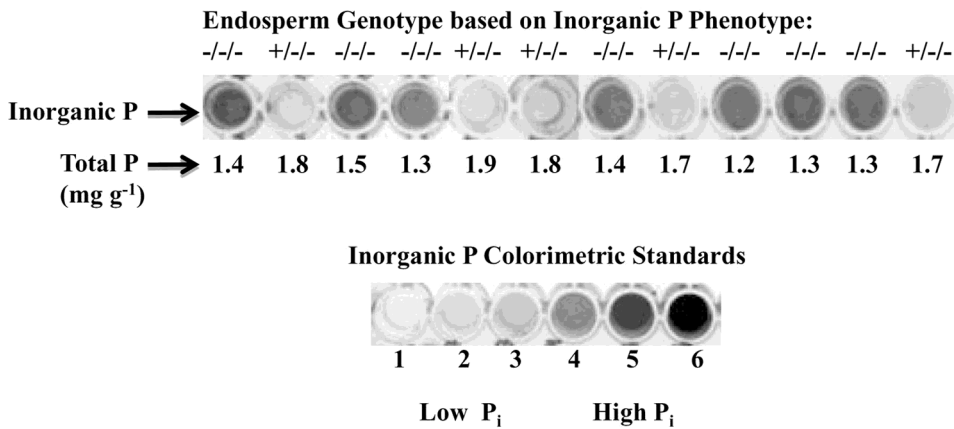


Рис. 4. Кольоровий тест на вміст мінерального фосфору в сестринських зернах одного колоса, отриманого від тест-кросу +/*lpa1-1*-гетерозигота × *lpa1-1/lpa1-1*-гомозигота

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст мінерального фосфору в половинах зернівок зародкової частини зерна та вміст загального фосфору в половинах зернівок ендоспермальної частини зерна у сестринських гомозиготних і гетерозиготних зернівок від реципрокних тест-кросів (мг/г) [41]

Тест-крос	Батьківські рослини		♀ гено-тип	Генотип потомства ендосперм	Фенотип потомства зародок	Число зернин, шт.	Вміст мінерального Р в ½ зернівки зародкової частини	Вміст загального Р в ½ зернівки ендоспермальної частини
	♀	♂						
1	+/ <i>lpa1-1</i>	<i>lpa1-1</i>	+/-	+/+/-	WT**	5	0,26	2,04
			+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	5	0,60	1,63
2	+/ <i>lpa1-1</i>	<i>lpa1-1</i>	+/-	+/+/-	WT	4	0,29	2,20
			+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	6	0,66	1,63
3	<i>lpa1-1</i>	+/ <i>lpa1-1</i>	-/-	+/-/-	WT	5	0,38	1,58
			-/-	-/-/-	<i>lpa</i>	5	0,53	1,38
4	<i>lpa1-1</i>	+/ <i>lpa1-1</i>	-/-	+/-/-	WT	3	0,36	1,91
			-/-	-/-/-	<i>lpa</i>	7	0,57	1,47

Примітка. WT (wild type) — дикий тип.

1,39 і 2,32 мкг Р (стандарти 1—3 — низький вміст Р, 4—6 — високий) [41].

У філігранно виконаній роботі [41] кольоровий тест на вміст неорганічного фосфору з використанням для аналізу половини зернівок F₂ від самозапилення гібрида ячменю F₁ типу +/*lpa1-1* та потомства від тест-кросу +/*lpa1-1* × *lpa1-1/lpa1-1* дав змогу ідентифікувати гомо- й гетерозиготні генотипи за алелями дикого типу (+), мутантними алелями (*lpa1-1*), визначити в половинах зернівок зародкової та ендоспермальної частин вміст загального і мінерального фосфору (табл. 2, 3). В роботі також продемонстровано, що гомозиготність за мутантним алелем *lpa1-1* чинить сильніший ефект щодо зниження вмісту органічного (й підвищення вмісту мінерального) фосфору в ендоспермальній половині зернівки, ніж у зародковій.

Ця робота є прикладом справді унікального генетичного дослідження з ідентифікації на половинах зернівок гомо-гетерозиготних генотипів у популяції F₂ та топ-кросах за алелями дикого типу (+) і мутантним алелем *lpa1-1*, що є детермінантом низького вмісту в зерні фітатів. Цитоване дослідження чітко демонструє можливість використання мінімальної кількості дослідного матеріалу (зерна) для визначення як органічного, так і мінерального фосфору та ідентифікації генотипів із триплоїдним ендоспермом у популяції F₂ й топ-кросах. Такий підхід очевидно можна застосовувати й у селекційних програмах створення сортів ячменю з низьким вмістом фітатів у зерні.

У роботі також чітко показано, що вміст органічного й мінерального фосфору в зернівках дослідженого матеріалу залежить від генотипу триплоїдного ендосперму, а не від генотипу материнської

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТАТОВ КАК СРЕДСТВО БИОФОРТИФИКАЦИИ

ТАБЛИЦЯ 3. Вміст мінерального і загального фосфору в половинах сестринських зернівок (з одного колоса) ендоспермальної частини зерна F_2 і тест-кросу від схрещування генотипів дикого типу (WT) та *lpa1-1* [41]

Генотип ♀ рослини	Генотип потомства за ендоспермом	Фенотип потомства за ендоспермом	Номер колоса	Кількість зернівок, шт.	Вміст фосфору в ендоспермі ½ зернівки, мг/г	
					неорганічного	загального
F ₂ самозапилення рослини F ₁ з генотипом +/ <i>lpa1-1</i>						
+/-	+/-/-	WT	1	11	0,23	1,98
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	1	4	1,02	1,49
+/-	+/-/-	WT	2	13	0,20	2,12
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	2	2	1,48	1,41
+/-	+/-/-	WT	3	12	0,27	2,25
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	3	3	1,39	1,76
+/-	+/-/-	WT	4	13	0,19	1,98
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	4	2	0,82	1,36
+/-	+/-/-	WT	5	12	0,21	2,03
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	5	3	0,92	1,61
Тест-крос: ♀ +/ <i>lpa1-1</i> × ♂ <i>lpa1-1</i>						
+/-	+/+/-	WT	1	8	0,19	1,97
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	1	7	1,03	1,69
+/-	+/+/-	WT	2	6	0,19	1,60
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	2	9	0,82	1,34
+/-	+/+/-	WT	3	9	0,16	1,71
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	3	5	0,74	1,39
+/-	+/+/-	WT	4	5	0,14	1,78
+/-	-/-/-	<i>lpa</i>	4	7	0,88	1,37

рослини, хоча статистично ефект материнської рослини також спостерігався. Крім того, мутація *lpa1-1* проявлялася у зниженні вмісту загального фосфору (див. табл. 1, 3).

Мутація *lpa1-1* найбільш досліджена у функціональному сенсі. В результаті встановлено, що мутантний алель *lpa1-1* належить до родини мультикопійних генів, які кодують біосинтез сульфаттранспортерів, стосуються функції Р-транспорту (неофункціоналізація), ендоспермспецифічної ролі саме відносно Ins P₆ біосинтезу. Секвенуванням ділянки ДНК, що відповідає алелю *lpa1-1*, виявлено наявність в одному з екзонів нонсенс-мутації в результаті С > Т транспозиції [42].

З інтенсифікацією селекції низькофітатного ячменю й появою *lpa*-сортів постало щонайменше два важливих питання: як впливають *lpa*-мутації на біодоступність фосфору зерна в зернових кормах і харчах; які особливості асоціації *lpa*-мутацій з агрономічними характеристиками, особливо із зерною продуктивністю, селекційного матеріалу та сортів-носіїв *lpa*-мутацій.

Одне з найтипівіших досліджень біодоступності фосфору в низькофосфорних зернових кормах для годівлі птиці виконали співробітники відділу тваринництва Університету Міссурі (Колумбія, США) [44]. Дослідження проводили на партії 360 півників, починаючи з віку 1 доба. Кормовий раціон півників складався із зерна близькоізогенних ліній ячменю з мутантним алелем *lpa1-1* і лінії з алелем дикого типу (+). Зерно лінії з алелем *lpa1-1* містило 0,21 % неорганічного фосфору і 0,35 % загального, тоді як лінія з алелем дикого типу — відповідно 0,11 і 0,35 %. Добавкою до кормової дієти слугував $\text{KН}_2\text{PО}_4$, коефіцієнт біодоступності фосфору в якому вважають таким, що дорівнює 100 %. Критерієм ефективності використання фосфору ячмінного зернового корму був відсоток золи у середніх пальцях ніг дослідної птиці. На ефективність вживання зернової дієти птицею не впливав ані вміст фосфору в кормі, ані його джерело. Приріст маси тіла дослідних півників не залежав від вмісту в кормі фосфору. Ефективність біологічної конверсії корму визначалась і вмістом у кормі фосфору, і його джерелом. Порівняно зі 100 % біодоступності фосфору $\text{KН}_2\text{PО}_4$ біодоступність фосфору зерна мутантної лінії ячменю з алелем *lpa1-1* становила $49,3 \pm 17$ %, а лінії з алелем дикого типу (+) усього 28 ± 15 %. Автори дослідження пояснили отримані результати тим, що в зерні ячменю з алелем *lpa1-1* містилось в 1,9 раза більше мінерального фосфору (0,21 проти 0,11 %). За використання у кормовому раціоні птиці зерна низькофосфорного ячменю знижувались також кількість мінеральної добавки $\text{KН}_2\text{PО}_4$ і вміст фосфору у фекаліях дослідної птиці. Подібні результати отримували й за використання у зернових кормах птиці низькофосфорної і звичайної кукурудзи. Автори дослідження наголосили, що створення зернових злаків із низьким вмістом у зерні фітатів відкриває виробникам курятини принципово інші можливості виробництва високоякісного м'яса разом зі зниженням забруднення навколишнього середовища фосфатами [44].

Як уже зазначалось, фітинова кислота як негативно заряджена субстанція, потрапивши з їжею (кормом) в організм людини чи тварин, виявляє високу хелатуючу активність і блокує біодоступність мультивалентних катіонів, таких як цинк, кальцій, мідь, залізо, марганець, алюміній [45]. Особливо чутливий до комплексування з фітатами є такий важливий мінерал, як цинк [46], тому питання його біодоступності активно досліджувалось у контексті хелатуючої активності фітатів у шлунково-кишковому тракті. Один із дослідів провели з групою 240 молодих бройлерів-півників співробітники того ж Університету Міссурі. У кормовому раціоні птиці єдиним джерелом фітатів було зерно ячменю сорту Harrington з високим вмістом фітатів і мутантна лінія цього сорту M955 з низьким вмістом фітатів, базовим вмістом цинку в раціоні 26 мг/кг із додаванням до основного раціону цинку в кількості 0, 10 і 20 мг/кг у різних варіантах досліду. Ячмінь становив 60 % загальної дієти. Вміст цинку в дослідних бройлерів визначали у золі гомілкової кістки та середнього пальця ноги. Бройлери, які споживали раціон із низькофосфорним ячменем, мали більшу масу тіла (942 г проти 694) та з'їдали більше корму (877 г проти 648), ніж півники на раціоні з високофосфорним ячменем.

У разі заміщення в кормовому раціоні півників ячменю з високим вмістом фітатів на низькофітатний вміст цинку в золі гомілкової кістки та середнього пальця підвищувався відповідно на 25 і 46 %. Збільшення вмісту цинку за годівлі птиці кормом із низькофітатним ячменем було еквівалентним додаванню до раціону цинку в кількості 20 мг/кг. Бройлери, у раціон яких входив низькофітатний ячмінь, утилізували більше цинку і фосфору кормової дієти порівняно з тими, які споживали корм із високим вмістом фітатів, причому поліпшення утилізації бройлерами мінералів не було пов'язане з активністю ендогенної фітази, яка в нормі міститься у зерні ячменю [47]. Автори дослідження наголосили, що отримані ними дані цілком збігалися з результатами інших досліджень, виконуваних на індичках [48], свинях [49], рибі [50] і щурах [53].

В іншому 35-добовому досліді поросят зі стартовою масою тіла 13,5 кг годували кормом у кількох варіантах досліду, до складу якого входило зерно звичайного ячменю сорту Harrington та його похідної мутантної лінії з алелем *lpa1-1*. Ячмінь у досліді був єдиним джерелом фітатів. У зерні низькофітатного ячменю містилося 0,35 % загального фосфору і 0,14 % фосфору фітатів, тоді як у зерні звичайного ячменю вміст загального фосфору становив 0,35 %, а фосфору у формі фітатів — 0,24 %. Дослід проведено з п'ятьма варіантами раціону з різним вмістом доступного фосфору і без додавання мінерального фосфору. Лише у двох варіантах досліду за низкою характеристик виявлено відмінність між дослідними поросятами, яких годували раціонами з високим і низьким вмістом фітатів. Між іншими варіантами досліду з додаванням до раціону низькофітатного чи звичайного ячменю істотних відмінностей за такими характеристиками, як приріст живої маси поросят, свіжої кісткової маси, міцності кісток, маси сухих знежирених кісток, золи кісток та утилізації азоту корму не було. Водночас зафіксовано зниження на 55 % вмісту фосфору у фекаліях поросят, яких годували раціоном із низьким вмістом фітатів. Біодоступність фосфору для поросят, яких тримали на низькофітатному раціоні, за оцінкою авторів досліду, становила 52 %, на раціоні з високим вмістом фітатів — лише 32 % [51].

Отже, проаналізувавши всі доступні нам публікації, в яких викладені результати досліджень із годівлі тварин різних видів раціонами кормів з низькофітатним і звичайним ячменем, ми дійшли висновку, що ефективність утилізації фосфору низькофітатного ячменю порівняно зі звичайним значно вища. Крім того, згодовування тваринам низькофітатного ячменю сприяє зниженню викидів у навколишнє середовище неутілізованих фосфатів із фекаліями, поліпшує утилізацію мультивалентних катіонів у кормах.

На жаль, ячмінь не такий популярний харчовий продукт, як наприклад, рис, кукурудза чи соя, тому ми не знайшли наукових публікацій із результатами досліджень ефективності засвоєння фосфору харчових продуктів із низькофітатного і звичайного ячменю. Водночас такі дослідження проведені за участю в експериментах волонтерів, які споживали, наприклад, тортилу, виготовлену з борошна звичайної і низькофітатної кукурудзи [54]. Метою цього досліді

ТАБЛИЦЯ 4. Урожай зерна *lra*-близькоізогенних ліній і трьох сортів-стандартів ячменю (ц/га), вирощених на п'яти дослідних станціях штату Айдахо (2011) [34]

Пара ізоляцій	Генотип	Дослідна станція штату Айдахо					Усереднено
		Aberdeen	Ashton	Idaho Falls	Rupert	Soda Springs	
1	WT	65,1	57,9	61,0	52,2	30,0	53,3
1	<i>lra1-1</i>	73,5	66,9	55,7	55,7	32,5	56,8
2	WT	68,0	61,5	49,3	49,8	35,5	53,7
2	<i>lra3-1</i>	69,8	53,2	49,6	50,1	27,8	50,1
3	WT	64,0	63,4	55,7	48,4	35,9	53,5
3	<i>lra-M955</i>	50,7	48,3	48,6	46,1	24,7	43,7
4	WT	70,3	63,2	55,2	51,0	34,2	54,8
4	<i>lra2-1</i>	75,1	45,7	62,7	50,3	27,8	52,3
5	WT	78,0	63,7	59,6	52,5	34,4	57,6
5	<i>lra4-1</i>	69,5	58,4	52,7	58,8	29,9	55,1
6	WT	72,9	60,1	54,0	54,8	32,0	54,8
6	<i>lra-M640</i>	69,8	50,3	59,3	49,5	24,7	52,1
Сорт-стандарт							
Harrington		69,6	62,7	56,9	53,0	31,7	54,4
Baroness		86,1	71,3	68,6	60,8	40,5	65,5
Conrad		80,0	67,1	66,4	67,4	30,3	62,2
НІР за $p = 0,05$		10,5	9,3	8,3	10,2	5,9	7,9

було вивчення ефективності засвоєння організмом людини кальцію при споживанні кукурудзяної тортилі. Зерно злаків і кукурудза містять мізерну кількість кальцію, тому при виготовленні кукурудзяної тортилі у країнах Центральної Америки, де цей продукт особливо популярний, зерно кукурудзи традиційно попередньо збагачують кальцієм за технологією нікстамалізації (nixtamalization), яка включає етапи замочування зерна і термообробку в лужній (вапняній) воді або в золі деревини. У процесі нікстамалізації зерно кукурудзи насичується кальцієм, набуває смаку та аромату, знезаражується на 97–100 % від афлатоксинів. Завданням цього дослідження було встановлення, як знижений вміст фітатів у кукурудзяній тортилі впливає на засвоєння кальцію у фортифікованій цим мінералом тортилі. Волонтери споживали тортилу, виготовлену зі звичайної кукурудзи і кукурудзи зі зниженим на ~60 % вмістом фітатів. У ході дослідження визначено, що при споживанні однієї порції тортилі зі звичайної кукурудзи волонтер отримував ~40 мг кальцію, при споживанні порції тортилі із низькофітатної кукурудзи — додатково засвоював ~6 мг кальцію [54].

В інших роботах було встановлено, що деструкція фітатів у пшеничному борошні також поліпшує засвоєння кальцію в організмі людини [55]. Функцію фітатів у організмі людини як інгібітора засвоєння кальцію їжі підтверджено в ґрунтовних клінічних дослідженнях [56, 57]. Засвоєння організмом людини кальцію низькофітатної сої

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТАТОВ КАК СРЕДСТВО БИОФОРТИФИКАЦИИ

ТАБЛИЦЯ 5. Вміст загального, фітатного та мінерального фосфору в зерні *lra*-близькоізогенних ліній і трьох сортів-стандартів ячменю (мг/г), вирощених на двох дослідних станціях штату Айдахо (2011) [34]

Пара ізоліній	Генотип	Дослідна станція штату Айдахо					
		Aberdeen			Soda Springs		
		Загальний	Фітатний	Мінеральний	Загальний	Фітатний	Мінеральний
1	WT	2,96	2,86	0,29	3,10	2,62	0,26
1	<i>lra1-1</i>	2,52	1,51	1,05	2,44	1,35	0,83
2	WT	2,86	2,47	0,24	3,09	2,75	0,25
2	<i>lra3-1</i>	2,76	1,10	1,45	2,88	1,15	1,66
3	WT	2,78	2,32	0,22	3,12	2,52	0,24
3	<i>lra-M955</i>	2,91	0,53	2,12	3,33	0,51	2,21
4	WT	2,75	2,38	0,23	2,93	2,54	0,25
4	<i>lra2-1</i>	2,93	1,83	0,67	3,18	1,99	0,90
5	WT	3,10	2,49	0,39	2,98	2,59	0,27
5	<i>lra4-1</i>	2,91	1,53	1,18	3,31	1,76	1,34
6	WT	2,86	2,44	0,26	3,15	2,69	0,26
6	<i>lra-M640</i>	2,98	1,61	0,80	3,36	1,51	1,32
Сорт-стандарт							
	Harrington	2,73	2,37	0,26	3,07	2,59	0,30
	Baroness	2,89	2,41	0,26	3,12	2,65	0,28
	Conrad	3,01	2,52	0,19	3,49	3,10	0,31
	НІР за $p = 0,05$	0,34	0,41	0,20	0,43	0,39	0,15

також було значно вищим, аніж із сої з високим вмістом фітатів [58]. Отже, як для тварин, так і людини низький вміст у зернових продуктах фітатів відіграє важливу роль у засвоєнні мінералів [59].

Ми проаналізували ефективність використання мутантів низькофітатного ячменю для годівлі тварин, та перед нами постало не менш важливе питання, як саме впливають *lra*-мутації на зернову продуктивність генотипів-носіїв цих мутацій. У цьому аспекті слід звернути увагу на вже зареєстровані в різних країнах сорти низькофітатного півчастого і голозерного ячменю [38, 43, 52]. Їх існування щонайменше означає, що якщо навіть *lra*-мутації негативно впливають на зернову продуктивність ячменю, то цей ефект незначний.

Фундаментальне дослідження асоціації *lra*-мутацій із зерною продуктивністю ячменю виконав колектив учених науково-дослідного відділу Національної колекції дрібнозерних злаків Департаменту сільського господарства США (USDA, Aberdeen), Університету Айдахо (США) у співпраці з колегами з Університету Хіросіма (Японія) [34]. Досліджено урожай зерна всіх шести *lra*-мутацій ячменю, які істотно різнились за вмістом фітатів. Обрано гомозиготні лінії ячменю з алелями дикого типу (WT) для всіх шести мутацій і сестринські лінії з *lra*-мутаціями, отриманими бекросуванням. Випробування проводили протягом двох років (2010–2011) у п'яти місцях штату

Айдахо, різних за кліматичними характеристиками та середніми урожаями ячменю. Результати випробувань (усереднені з 4 повторень у кожному місці) урожаю 2011 р. наведені в табл. 4.

З наведених даних випробувань близькоізогенних *lpa*-мутантних ліній ячменю порівняно з WT-лініями і сортами-стандартами впливає, що істотних відмінностей за урожаєм зерна *lpa*-мутантних ліній і ліній з алелем дикого типу практично немає, хоча іноді виявлялась тенденція до зниження врожаю зерна. Особливо різниця була помітною за низького загального рівня врожайності. Крім урожаю зерна у цих дослідках близькоізогенні *lpa*-лінії та WT-лінії ячменю порівнювали за вмістом у зерні загального, фітатного і мінерального фосфору в різних місцях проведення дослідів штату Айдахо. Отримані результати наведено в табл. 5.

Дані, наведені в таблиці, чітко вказують на залежність вмісту мінерального фосфору від алельного стану *lpa* чи WT. Усі без винятку *lpa*-мутантні лінії вірогідно в обох точках випробування переважали WT-лінії за вмістом мінерального фосфору й поступалися WT-лініям за вмістом фосфору фітатів. За алельного стану *lpa1-1* вміст у зерні загального фосфору був дещо нижчим.

Отримані дані підтвердили, що *lpa*-мутантні лінії навіть без попереднього селекційного добору істотно не поступаються лініям з алелями дикого типу. Однак на інших видах зернових і бобових культур деякий негативний ефект *lpa*-мутацій на зернову продуктивність виявлено. Незначний вплив або відсутність впливу *lpa*-мутацій на зернову продуктивність ячменю можна вважати швидше унікальною особливістю цієї культури [34].

Оскільки створення *lpa*-сортів ячменю стратегічно важлива тематика з огляду на необхідність поліпшення біодоступності фосфору зерна ячменю і зниження засмічення навколишнього середовища фосфатами, ми ініціювали новий для України напрям селекції сортів ярого й озимого *lpa*-ячменю харчового і кормового напрямів використання виключно на голозерній основі. З цією метою як джерела-донори *lpa*-мутацій ми використовуємо у схрещуваннях із сортом ярого голозерного ячменю Ахіллес п'ять *lpa*-генотипів: сорт ярого голозерного ячменю CDC Lophy (*lpa3-1*) та лінії ярого ячменю LP1-2581 (*lpa1-1*), LP1-2163H (*lpa1-1*), LP3-1159 (*lpa3-1*) та LP640-1304 (*lpa2-1*).

Насіння сорту CDC Lophy надав нам його автор, відомий канадський селекціонер професор Б. Роснагел (Prof. Brian Rossnagel, Crop Development Centre, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada). Решту матеріалу ми отримали від проф. Ф. Бреггіцера, з науково-дослідного факультету Національної колекції генетичної плазми дрібнозерних злаків Департаменту сільського господарства США (Prof. Bregitzer, National Small Grains Germplasm Research Faculty, USDA-ARS, Aberdeen, Idaho, USA).

Сорт ярого голозерного ячменю CDC Lophy ми отримали кілька років тому й наразі ми маємо похідний матеріал F₂–F₄ від схрещувань із голозерним ячменем сорту Ахіллес. Цей матеріал готовий для тестування на наявність у ньому мутації *lpa3-1*, яке ми плануємо здійснювати як за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), так і кольорового тесту на вміст мінерального фосфору. Від

решти комбінацій схрещування ми маємо матеріал ярого ячменю F₁ покоління. В найближчій перспективі ми плануємо перенести *lpa*-мутації на генетичну основу озимого (альтернативного) голозерного ячменю, придатного для вирощування на полях України.

REFERENCES

1. Berdanier, C., Dwyer, J. & Herber, D. (2013). Handbook of Nutrition and Food (3rd ed.). CRC Press, p. 199. ISBN 978-1-4665-0572-8. Retried 3 July 2016.
2. Harland, B. & Morris, E. (1995). Phytate: a good of bad food component? Nutr. Res., 19, pp. 947-961.
3. 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. Gen. Appl. Microbiol., 59, pp. 353-360.
4. 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, pp. 86-91.
5. Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H. & Partridge, G. (2013). Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors (Wiley on line library.com). doi: 10.1002/jsfa.6998
6. Awad, G., Danial, E., Kassem, S., Abdelkader, M., Hanafi, E., El-Hawary, Z., Hegazy, E. & Helal, M. (2013). A novel phytase enzyme for poultry feed. World Appl. Sci. Journal, 26, pp. 194-199.
7. Nagashima, T., Tange, T. & Anazawa, H. (1999). Dephosphorilation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with high affinity for phytate. Appl. Environmental Microbiol., 65, pp. 4682-4684.
8. Dorsch, J., Cook, A., Young, K., Anderson, J., Bauman, A., Volkmann, C., Murthy, P. & Raboy, V. (2003). Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. Phytochemistry, 62, pp. 691-706.
9. Larson, S., Young, K., Cook, A., Blake, T. & Raboy, V. (1998). Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. Theor. Appl. Genet., 97, pp. 141-146.
10. 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, pp. 87-93.
11. Kim, S., Andaya, C., Goyal, S. & Tai, T. (2008). The rice OsLpa1 gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism. Theor. Appl. Genet., 117, pp. 769-779. doi:10.1007/s00122-008-0818-z
12. 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, pp. 1397-1405.
13. 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. doi:10.1007/s00122-006-0478-9
14. 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, pp. 1400-1406. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.065
15. 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, pp. 206-211. doi:10.1016/j.fcr.2008.05.006
16. 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. doi:10.1007/s11032-008-9202-6
17. Guttieri, M., Bowen, D., Dorsch, J., Raboy, V. & Souza, E. (2003). Identification and characterization of a low phytic acid wheat. Crop Sci., 44, pp. 418-424.
18. Pilu, R., Panzeri, D., Gavazzi, G., Rasmussen, S., 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. doi:10.1007/s00122-003-1316-y

19. Raboy, V., Gerbasi, P., Young, K., Stoneberg, S., Pickett, S., Bauman, A., Murthy, P., Sheridan, W. & Ertl, D. (2000). Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.*, 124, pp. 355-368.
20. Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, J., Meeley, R. & Ertl, D. (2003). The maize low-phytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.*, 131, pp. 507-515. doi:10.1104/Pp.014258
21. Shi J., Wang, H., Hazebroek, J., Ertl, D. & Harp, 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, pp. 708-719. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02412.x
22. Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J., Meeley, R., Ertl, D., Ranch, J. & Glassman, K. (2007). Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.*, 25, pp. 930-937. doi:10.1038/Nbt1322
23. Hitz, W., Carlson, T., Kerr, P. & Sebastian, S. (2002). Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.*, 128, pp. 650-660. doi:10.1104/Pp.010585
24. Wilcox, J., Premachandra, G., Young, K. & Raboy, V. (2000). Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci.*, 40, pp. 1601-1605.
25. 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. doi:10.1007/s00122-007-0621-2
26. Campion, B., Sparvoli, F., Doria, E., Tagliabue, G., Galasso, I., Fileppi, M., Bollini, R. & Nielsen, E. (2009). Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 118, pp. 1211-1221. doi:10.1007/s00122-009-0975-8
27. Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R., Chiou, S., Frye, R. & York, J. (2005). Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, pp. 12612-12617. doi:10.1073/pnas.0504172102
28. Kim, S., Andaya, C., Newman, J., Goyal, S. & Tai, T. (2008). Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK. *Theor. Appl. Genet.*, 117, pp. 1291-1301. doi:10.1007/s00122-008-0863-7
29. Xu, X., Zhao, H., Liu, Q., Frank, T., Engel, K., An, G. & Shu, Q. (2009). Mutations of the multi-drug resistance-associated protein ABC transporter gene 5 result in reduction of phytic acid in rice seeds. *Theor. Appl. Genet.*, 119, pp. 75-83. doi:10.1007/s00122-009-1018-1
30. Gillman, J., Pantalone, V. & Bilyeu, K. (2009). The low phytic acid phenotype in soybean line CX1834 is due to mutations in two homologs of the maize low phytic acid gene. *Plant Genome*, 2, pp. 179-190.
31. Ye, H., Zhang, X.-Q., Broughton, S., Westcott, S., Wu, D., Lance, R. & Li, C. (2011). A nonsense mutation in a putative sulphate transporter gene results in low phytic acid barley. *Funct. Integr. Genomics*, 11, pp. 103-110. doi 10.1007/s10142-011-0209-4
32. Rolinsky, V., Eckstein, P., Raboy, V., Rossnagel, B. & Scoles, G. (2007). Molecular marker development and linkage analysis in three low phytic acid barley (*Hordeum vulgare*) mutant lines. *Mol. Breed.*, 20, pp. 323-330. doi:10.1007/s11032-007-9094-x
33. Raboy, V. (2002). Progress in breeding low phytate crops. *J. Nutr.*, 132, pp. 503-505.
34. Raboy, V., Peterson, K., Jackson, C., Marshall, J., 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, pp. 225-239. doi: 10.3390/plants4020225
35. Raboy, V., Young, K., Dorsch, J. & Cook, A. (2001). Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J. Plant Physiol.*, 158, pp. 489-497.
36. Harvey, B. & Rossnagel, B. (1984). Harrington barley. *Can. J. Plant Sci.*, 64, pp. 193-194.
37. Bregitzer, P. & Raboy, V. (2007). Registration of four low-phytate/wild type pairs of barley germplasms. *J. Plant Reg.*, 1, pp. 139-140.
38. Bregitzer, P., Raboy, V., Obert, D., Windes, J. & Whitmore, J. (2008). Registration of 'Clearwater' low-phytate hullless spring barley. *J. Plant Reg.*, 2, pp. 1-4.

39. Rossnagel, B., Zatorski, T., Arganosa, G. & Beattie, A. (2008). Registration of 'CDC Lophy' barley. *J. Plant Reg.*, 2, pp. 169-173.
40. Chen, P., Toribara, T. & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, pp. 1756-1758.
41. Raboy, V., Cichy, K., Peterson, K., Reichman, S., Sompong, U., Srinives, P. & Saneoka, H. (2014). Barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid 1-1: an endosperm-specific, filial determinant of seed total phosphorus. *J. of Heredity*. doi:10.1093/jhered/esu044
42. Ye, H., Zhang, X., Broughton, S., Westcott, S., Wu, D., Lance, R. & Li, C. (2011). A nonsense mutation in a putative sulphate transporter gene results in low phytic acid in barley. *Funct. Integr. Genomics.*, 11, pp. 103-110.
43. Bregitzer, Ph., Hu, G., Marshall, J. & Raboy, V. (2017). Registration of «Sawtooth» low-phytate, hullless, spring barley. *J. Plant Regi.*, 11, pp. 81-84.
44. 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, pp. 86-91.
45. Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13, pp. 297-335.
46. Kornegay, E. (2001). Digestion of phosphorus and other nutrients: The role of phytases and factors influencing their activity. in *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, New York: NY., pp. 237-272.
47. Linares, L., Broomhead, J., Guaiume, E., Ledoux, D., Veum, T. & Raboy, V. (2007). Effect of low phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) on zinc utilization in young broiler chicks. *Poult. Sci.*, 86, pp. 299-308.
48. Li, Y., Ledoux, D., Veum, T., Raboy, V. & Zyla, K. (2001). Low phytic acid barley improves performance, bone mineralization, and phosphorus retention in turkey poults. *J. Appl. Poult. Res.*, 10, pp. 178-185.
49. Veum, T., Ledoux, D., Raboy, V. & Ertl, D. (2001). Low phytic acid corn improves nutrient utilization for growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 79, pp. 2873-2880.
50. Sugiura, S., Raboy, V., Young, A., Dong, F. & Hardy, R. (1999). Availability of phosphorus and trace minerals in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 170, pp. 285-296.
51. Veum, T. R., Ledoux, D., Bollinger, D., Raboy, V. & Cook, A. (2002). Low-phytic acid barley improves calcium and phosphorus utilization and growth performance in growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 80, pp. 2663-2670.
52. Bregitzer, P., Raboy, V. & Obert, D. (2010). Registration of LP1-2581, LP1-2163H, LP3-1159, and LP640-1304 low-phytate spring barley germplasm lines. *J. Plant Reg.*, 4 (3), pp. 228-231.
53. Poulsen, H., Johansen, K., Hatzack, F., Boisen, S. & Rasmussen, S. (2001). Nutritional value of low-phytate barley evaluated in rats. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sri.*, 51, pp. 53-58.
54. Hambidge, K., Krebs, N., Westcott, J., Sian, L., Miller, L., Peterson, K. & Raboy, V. (2005). Absorption of calcium from tortilla meals prepared from low-phytate maize. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 82, pp. 84-87.
55. McCance, R. & Widdowson, E. (1942). Mineral metabolism of dephytinized bread. *J. Physiol.*, 101, pp. 304-313.
56. Reinhold, G., Nasr, K., Lahimgarzadeh, A. & Hedayati, H. (1973). Effects of purified phytate and phytate-rich bread upon metabolism of zinc, calcium, phosphorus, and nitrogen in man. *Lancet.*, 1, pp. 283-288.
57. Knox, T., Kassarjian, Z. & Dawson-Hughes, B. (1991). Calcium absorption in elderly subjects on high — and low-fiber diets: effect of gastric acidity. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 53, pp. 1480-1486.
58. Heaney, R., Weaver, C. & Fitzsimmons, M. (1991). Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 53, pp. 745-747.
59. Bronner, F. (1998). Calcium absorption — a paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.*, 128, pp. 917-920.

Received 09.01.2019

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТАТОВ КАК СРЕДСТВО
БИОФОРТИФИКАЦИИ ЯЧМЕНЯ ПО МИНЕРАЛЬНОМУ СОСТАВУ ЗЕРНА

А.И. Рыбалка^{1,2}, *В.В. Швартау*², *С.С. Полищук*¹, *Б.В. Моргун*^{2,3}

¹Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

³Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Ключевой для организма животных и человека минерал фосфор в зерне злаков и бобовых культур на две трети (~65—85 %) общего содержания связан в форме фитиновой кислоты (фитатов) и недоступен для усвоения. Неусвоенный органический фосфор в форме фитатов, который выводится из организма с фекалиями, создает экологическую проблему, прежде всего ухудшает качество питьевой воды. В статье приведены литературные данные по созданию генотипов основных зерновых культур и, в частности, ячменя с генетически контролируемым низким содержанием в зерне данного вещества. На культуре ячменя пока известно более 20 мутантов с низким содержанием в зерне фитатов, представляющих не менее шести различных *lpa*-локусов, каждый из которых по-разному влияет на содержание в зерне органического и минерального фосфора. Показано, что селекция *lpa*-сортов этой культуры требует постоянного использования специальных лабораторных методов контроля *lpa*-мутаций и оценки их эффектов в селекционных популяциях. Полученные данные подтвердили, что *lpa*-мутантные линии даже без предварительного селекционного отбора существенно не уступают линиям с аллелями дикого типа. Продемонстрировано, что создание зерновых злаков с низким содержанием в зерне фитатов открывает принципиально другие возможности производства высококачественного мяса вместе со снижением загрязнения окружающей среды фосфатами. На основании анализа литературных источников, в которых изложены результаты исследований по кормлению животных разных видов кормами с низкофитатным и обычным ячменем, установлено, что эффективность утилизации фосфора низкофитатного ячменя по сравнению с обычным значительно выше. Кроме того, скармливание животным низкофитатного ячменя способствует снижению выбросов в окружающую среду не утилизируемых фосфатов с фекалиями, улучшает утилизацию мультивалентных катионов в кормах. Показано, что создание сортов низкофитатного ячменя на основе *lpa*-мутаций позволяет существенно улучшить эффективность усвоения (биодоступность) фосфора из зерна ячменя человеком и животными и снизить вредную нагрузку окружающей среды фосфатами.

Ключевые слова: ячмень, фитаты, фосфор, *lpa*-мутации, биофортификация.

REDUCTION OF PHYTATE CONTENT AS A MEANS OF BARLEY
BIOFORTIFICATION ON GRAIN MINERAL COMPOSITION

O.I. Rybalka^{1,2}, *V.V. Schwartau*², *S.S. Polishchuk*¹, *B.V. Morgun*^{2,3}

¹Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine
3, Ovidiopolska Road, 365036, Odesa, Ukraine

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

³Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148, Akad. Zabolotnoho St., 03143, Kyiv, Ukraine

e-mail: molgen@icbge.org.ua

The key to the organism of animals and humans the mineral phosphorus in cereals and legumes in two thirds (~65—85 %) of the total content is bound in the form of phytic acid

(phytate) and inaccessible to digestion. Undiluted organic phosphorus in the form of phytate, which is excreted from the body with feces, creates an ecological problem, first of all, the quality of drinking water deterioration. The article presents literary data on the genotypes of the main grain crops and, in particular, barley with genetically controlled low content of this substance in the grain. More than 20 low-content phytate mutants are known in the barley culture, which represent at least six different *lpa*-loci, each of which has a different effect on the content of organic and mineral phosphorus in the grain. It has been shown that the selection of *lpa*-varieties of this culture requires the necessity of using special laboratory methods for controlling *lpa*-mutations and assessing their effects in breeding populations. The obtained data confirmed that the *lpa*-mutant lines, even without pre-selection, are not essentially inferior to lines with wild-type alleles. It has been shown that the creation of grain cereals with low content in the grain of the phytates opens up fundamentally different possibilities of production of high quality meat, along with a decrease in the pollution of the environment with phosphates. Based on the analysis of literary sources, in which the results of studies on feeding animals of different ration types with low-phytate and common barley, the efficiency of phosphate utilization was found to be significantly higher than normal. In addition, the feeding of animals with low-phytate barley helps to reduce emissions of non-utilizable phosphates with feces, improves the utilization of multivalent cations in feeds. It has been shown that the creation of low-phytate barley varieties based on *lpa*-mutations can significantly improve the efficiency of the assimilation (bioavailability) of phosphorus from barley grain by humans and animals and reduce the harmful load of the environment by phosphates.

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