

КАТРИЙ В. Б.^{1✉}, ВЕЛИКОЖОН Л. Г.^{1,2}, СЛИВКА Л. В.¹, МОРГУН Б. В.^{1,2}¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0003-4034-3270, 0000-0002-5935-9363, 0000-0001-6133-4395, 0000-0001-7041-6894

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

✉ katriy.vlad@gmail.com

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МУТАЦІЙ, ПОВ'ЯЗАНИХ З НАКОПИЧЕННЯМ ФІТАТІВ У ЗЕРНІВКАХ ЯЧМЕНЮ

Мета. Провести тестування ДНК-маркерів на вибірці зразків ячменю української селекції для виявлення різних *lra*-мутацій, що впливають на якісний склад фосфору у зернівках ячменю. **Методи.** Виділення ДНК (ЦТАБ-метод), постановка полімеразних ланцюгових реакцій (ПЛР) та електрофоретичне визначення продуктів ампліфікації ДНК у агарозному гелі для ідентифікації *lra*-мутацій у зернівках ячменю. **Результати.** Проведені молекулярно-генетичні дослідження 20 селекційних ліній ячменю голозерного дали можливість ідентифікувати зразки, що є носіями *lra-1* та *lra-2* мутацій. Саме наявність таких мутантних генів детермінує низький вміст органічного (зв'язаного) фосфору та підвищений вміст мінерального (доступного) фосфору, що може засвоюватись організмом людини. **Висновки.** Застосовані методики ідентифікації мутацій *lra-1* та *lra-2*, що впливають на вміст фітатів у зернівці голозерного ячменю дозволяють ефективно аналізувати селекційні лінії та відбирати мутантні зразки, які можуть використовуватися у майбутніх схемах схрещувань.

Ключові слова: ячмінь, фосфор, фітати, *lra*-мутації, маркер супровідна селекція.

За останні роки ячмінь, як продукт функціонального харчування, набирає популярності як цінна культура у харчовій промисловості. Однак в Україні він залишається головною кормовою культурою з невеликою часткою використання у харчовій промисловості. Сьогодні на ринку харчових продуктів можна знайти широкий набір продуктів, вироблених як з чистого зерна (борошна) ячменю, так і сумішей ячменю з пшеницею.

Стратегічне значення мінерального складу щоденного раціону людини безсумнівно є важливим, оскільки мінерали можуть потрапити в організм людини виключно з їжею [1]. Серед

п'яти найважливіших для організму людини мінералів (кальцій, фосфор, калій, натрій, магній) фосфор є другим за функціональним значенням. Він становить близько 1% загальної маси тіла і міститься у кожній клітині. П'ятивалентний фосфор є складовою частиною молекули аденозинтрифосфату (АТФ) – універсального джерела енергії для більшості біохімічних процесів у клітинах. Цей мінерал задіяний у формуванні фосфодіестерного зв'язку між нуклеотидами нуклеїнових кислот, що забезпечує відтворення структури та функціонування носіїв спадковості, входить до складу клітинних мембран у структурі фосфоліпідів та має значний вплив на процеси клітинного метаболізму [1].

Фосфор міститься у зерні злаків, однак більшість (~ 65–85%) його загального вмісту знаходиться у формі фітинової кислоти або фітатів (міоїнозитол-1,2,3,4,5,6-гексакісфосфат), яка недоступна для засвоєння людиною. Споживання певних продуктів харчування, що мають високий вміст органічного фосфору також може мати негативний ефект на здоров'я організму людини. Фітинова кислота є негативно зарядженою, що підтримується в широкому діапазоні рН. У молекулі фітинової кислоти шість фосфатних груп утворюють солі (фітин або фітати) з різними катіонами металів, наприклад з K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} [2].

Біологічна роль фітатів в організмі людини далеко неоднозначна. З одного боку, фітати потенційно корисні, оскільки виявляють антиоксидантні й антиканцерогенні властивості, з іншого – 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 і можуть пригнічувати активність таких травних ферментів, як α -амілаза, трипсин, знижувати засвоюваність

© КАТРИЙ В. Б., ВЕЛИКОЖОН Л. Г., СЛИВКА Л. В., МОРГУН Б. В.

білків організмом людини і тварин, утворювати фітатпротеїнові мінеральні комплекси. Ці комплекси нерозчинні й резистентні до ензиматичного гідролізу, а зв'язаний білок – недоступний для засвоєння [3].

З появою *lpa*-мутантів (*low phytic acid* – *lpa*) з низьким вмістом фітинової кислоти, були ініційовані дослідження мутантних генів і генетичного контролю біосинтезу фітатів. Показано, що селекція *lpa*-сортів різних культур потребує використання спеціальних лабораторних методів ідентифікації, контролю *lpa*-мутацій та оцінювання їх ефектів у селекційних популяціях. У зв'язку з цим застосовують систему молекулярних маркерів *lpa*-мутацій [4]. Метою нашої роботи було проведення тестування ДНК-маркерів на вибірці зразків ячменю української селекційної популяції, яка розщеплюється, для виявлення різних *lpa*-мутацій, що впливають на якісний склад фосфору у зернівках ячменю.

Матеріали і методи

Загальноприйнятим методом виділення ДНК із рослин озимої пшениці є ЦТАБ-метод. Він базується на тому, що при високих концентраціях солей (0,7–1,4 М NaCl) нуклеїнова кислота утворює з катіонним детергентом ЦТАБ (цетилтриетиламоній бромід) стабільний, але разом з тим розчинний компонент, тоді як білки і полісахариди знаходяться в осаді. ЦТАБ – хороший детергент, який сприяє лізису клітинних стінок і виходу ДНК в розчин [5].

Із зернівок рослин ячменю експрес ЦТАБ-методом виділяли загальну ДНК, після чого проводили полімеразну ланцюгову реакцію відповідно до [15] з певними модифікаціями. Реакційні суміші для проведення ПЛР включали: по 0,5 мкл 10 мкМ специфічних праймерів для відповідної реакції, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x Reaction Buffer B (Solis BioDyne), по 2 мкл 1 mM Cresol 60 % Sucrose (Solis BioDyne), по 1,6 мкл 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne), по 2 мкл 2 mM кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne), 30 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Праймери синтезовані фірмою Metabioп (Німеччина). Робочі розчини праймерів зберігаються у вигляді розчинів концентрацією 10 мМ у стерильному TE буфері (pH 8,0) при температурі – 20°C.

Використані програми ампліфікації були наступні:

1. ПЛР на локус *lpa-1*: денатурація 94°C – 4 хв, 34 цикли: денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 56°C – 30 с, елонгація 72°C 30 с; завершення елонгації 72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції 0,5 мкМ.

2. ПЛР на локус *lpa-2*: денатурація 94°C – 4 хв, 34 цикли: денатурація 94°C – 30 с, ренатурація 56°C – 30 с, елонгація 72°C 30 с; завершення елонгації 72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції 0,5 мкМ [2].

Візуалізацію продуктів ампліфікації ДНК проводили за допомогою електрофоретичного розділення у 1,2 % агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням етидид броміду як фарбувального реагенту. Присутність мутації *lpa-1* у локусі ідентифікували за наявністю амплікона довжиною 650 п. н., а прояв амплікону розміром 270 п. н. вказував на мутацію *lpa-2*. Для визначення розміру продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярної маси: ДНК Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) для реакцій з розміром ампліконів 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п. н. Для отримання зображення гелів використовували джерело УФ-світла та фотоапарат Canon. Отримане зображення обробляли за допомогою графічного редактору GIMP.

Результати та обговорення

Зерно ячменю містить фосфору у 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) [6, 7]. Здебільшого фітати злакових рослин представлені К, Mg-солями, які можуть зв'язувати в органічну форму понад 50 % К і Mg від загального вмісту в зерні. Разом із фосфором фітатів ці катіони та із міоїнозитолом утворюють пул мінералів та метаболітів, які потрібні проростку на ранніх стадіях його розвитку [3]. Кілька генів, що кодуєть біосинтез ключових ферментів, пов'язаних із низьким вмістом фітатів, ідентифіковані в різних видів злаків, включно з MIPS у сої [8], ZmIPK (inositolphosphatase) у кукурудзи [9], AtIPK1 та AtIPK2 в арабідопсису, MİK (myoinositolkinase) у кукурудзи [10], OsLPA1 у рису [11], MRP ABC (multidrug resistance-associated protein ATP-binding cassette) транспортер у кукурудзи [12] та рису [13]. У результаті цих досліджень встановлено що гени, які детермінують біосинтез фітатів, мають подібні механізми генетичного контролю низь-

кого вмісту фітинової кислоти у зерні різних видів культур.

Мутації у локусах *lpa-1* та *lpa-2* погіршують синтез фосфору, який не може засвоюватись організмом людини. Тому селекція сортів ячменю ведеться за показником зниження вмісту фітатів у зерні [4]. На культурі ячменю на сьогодні відомо понад 20 мутантів із низьким вмістом фітатів, які представляють щонайменше шість різних *lpa*-локусів, кожен з яких по-різному впливає на вміст у зерні органічного та мінерального фосфору.

Першу мутацію *lpa-1* було виявлено 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. Для отримання донорів *lpa*-мутацій виконувались схрещування між сортом ярого голозерного ячменю Ахіллес та *lpa*-генотипами: сорт ярого голозерного ячменю CDC Lophy (*lpa3-1*) та лінії ярого ячменю LP1-2581 (*lpa1-1*), LP1-2163H (*lpa1-1*) та LP640-1304 (*lpa2-1*) [3].

Використовуючи методи молекулярно-генетичного аналізу, було проаналізовано 24 селекційні лінії ячменю на виявлення у їх зернівках *lpa*-мутацій (20 досліджуваних зразків та 4 контролю). Для визначення *lpa-1* мутації проводили полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами MSU12 (F, R). Присутність мутації у локусі *lpa-1* ідентифікували за наявністю амплікона довжиною 650 п. н. Саме прояв такого фрагменту спостерігали для сорту ячменю

Lophy-1, який слугував позитивним контролем у цій реакції. Саме прояв такого фрагменту спостерігали для сортів ячменю сорту Ахіллес та Lophy-1, які слугували позитивним контролем, а ячмінь сорту Abyssinian за відсутністю такого амплікона виявився негативним контролем у цій реакції. Результати представлені на рис. 1 показали, що більшість досліджуваних зразків ячменю характеризувалися наявністю мутації у локусі *lpa-1*, що підтверджується присутністю на електрофореграмах фрагментів розміром 650 п. н. Лише для зразків за номерами 15, 16, 18 і 19 (Дор. № 15, 16, 18, 19) таких ампліконів не було виявлено, що свідчить про відсутність у них цієї мутації.

Присутність мутації *lpa-2* ідентифікується за проявом амплікона довжиною 270 п. н. [4]. Полімеразна ланцюгова реакція з праймерами Vmaq120 (F, R) та електрофоретичне визначення продуктів ампліфікації ДНК ячменю показали, що усі досліджувані зразки характеризувалися наявністю мутації *lpa-2*, про що свідчить ідентифікація фрагмента розміром 270 п. н. (рис. 2).

Результати проведених досліджень на визначення *lpa*-мутацій у зернівках ячменю підтвердили роль позитивного контролю сорту Lophy-1 для обох полімеразних реакцій. Ячмінь сорту Ахіллес характеризувався проявом мутації *lpa-1* та відсутністю *lpa-2* мутації, а ячмінь сорту Abyssinian був носієм лише мутації *lpa-2*. Результати отриманих досліджень можна узагальнити в таблиці.

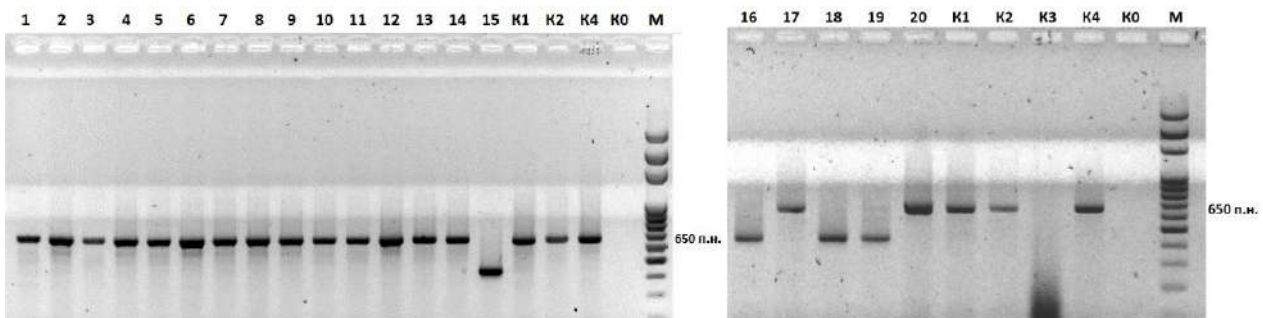


Рис. 1. Електрофореграма результатів ампліфікації ДНК ячменю з праймерами MSU121 (F, R). Номер доріжки відповідає номеру зразка ДНК ячменю; K₁ – позитивний контроль (Ахіллес); K₂ – позитивний контроль (Lophy-1); K₃ – контроль (Abyssinian); K₄ – контроль (ячмінь ярий Арна); K₀ – негативний контроль без додавання ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

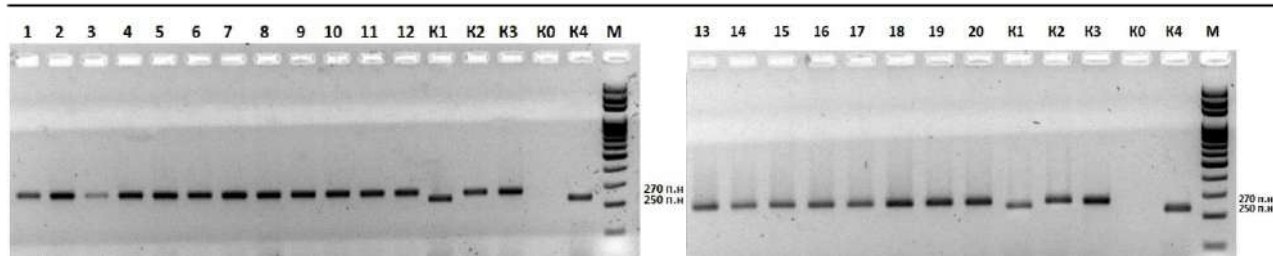


Рис. 2. Електрофореграма результатів ампліфікації ДНК ячменю з праймерами Bmaq120 (F, R). Номер доріжки відповідає номеру зразка ДНК ячменю; K₁ – контроль (Ахіллес); K₂ – позитивний контроль (Abyssinian); K₃ – позитивний контроль (Lophy-1); K₄ – контроль (ячмінь ярий Арна); K₀ – негативний контроль без додавання ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Таблиця. Аналіз зразків ячменю на присутність *lpa* мутацій у зернівках

Номер	Кількість матеріалу	Загальна ДНК	<i>lpa1-1</i> (MSU21)	<i>lpa2-1</i> (Bmaq120)
1	1 зернівка	+	+	+
2	1 зернівка	+	+	+
3	1 зернівка	+	+	+
4	1 зернівка	+	+	+
5	1 зернівка	+	+	+
6	1 зернівка	+	+	+
7	1 зернівка	+	+	+
8	1 зернівка	+	+	+
9	1 зернівка	+	+	+
10	1 зернівка	+	+	+
11	1 зернівка	+	+	+
12	1 зернівка	+	+	+
13	1 зернівка	+	+	+
14	1 зернівка	+	+	+
15	1 зернівка	+	-	+
16	1 зернівка	+	-	+
17	1 зернівка	+	+	+
18	1 зернівка	+	-	+
19	1 зернівка	+	-	+
20	1 зернівка	+	+	+
Ахіллес	10 зернівок	+	+	-
Abyssinian	10 зернівок	+	-	+
Lophy-1	10 зернівок	+	+	+
Власний +К ярий Арна	10 зернівок	+	+	-

Висновки

За результатами проведених молекулярно-генетичних аналізів 20-ти селекційних ліній ячменю встановлено, що 80 % із них були носіями *lpa-1* мутацій та 100 % *lpa-2* мутації. Показано, що застосовані методики ідентифікації мутацій, що впливають на вміст фітатів у зерні голозерного ячменю, дозволяють ефек-

тивно аналізувати селекційні зразки, які можуть бути використані у подальших схрещуваннях.

Висловлюємо щире подяку колегам з Селекційно-генетичного інституту НААН України та особисто член-кореспонденту НАН України Рибалці О. І. за отриманий дослідний матеріал. Робота виконана за фінансування НАН України. Номер Держреєстрації тематики 0122U001512.

References

1. Yildiz G., Bigicli N. Effects of whole buckwheat flour on physical, chemical and sensory properties of flat bread, Lavas. *Czech Journal of Food Science*. 2012. Vol. 30 (6). P. 534–540. doi: 10.17221/10/2012-CJFS.
2. Zhou G., Panozzo J., Zhang X-Q., Cakir M., Harasymow S., Li C. QTL mapping reveals genetic architectures of malting quality between Australian and Canadian malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Breeding*. 2016. Vol. 36 (6). P. 1–12. doi: 10.1007/s11032-016-0492-9.
3. Rybalka O. I., Schwartau V. V., Polishchuk S. S., Morgun B. V. Reduction of phytate content as a means of barley biofortification on grain mineral composition. *Plant Phys. Gen.* 2019. Vol. 51 (2). P. 95–113. doi: 10.15407/frg2019.02.095. [in Ukrainian]
4. Guttieri M., Bowen D., Dorsch J., Raboy V. et al. Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 2003. Vol. 44. P. 418–424. doi: 10.2135/cropsci2004.1505.
5. Stewart C. N., Via L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio Techniques*. 1993. Vol. 14 (5). P. 748–749.
6. Yuan F., Zhao H., Ren X., Zhu S., Fu X., Shu, Q. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Genet.* 2007. Vol. 115. P. 945–957. doi: 10.1007/s00122-007-0621-2.
7. Campion B., Sparvoli F., Doria E., Tagliabue G., Galasso I., Fileppi M., Bollini R. Nielsen E. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2009. Vol. 118. P. 1211–1221. doi: 10.1007/s00122-009-0975-8.
8. Hitz W., Carlson T., Kerr P. Sebastian S. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.* 2002. Vol. 28. P. 650–660. doi: 10.1104/pp.010585.
9. Shi J., Wang H., Wu Y., Hazebroek J., Meeley R. Ertl D. The maize lowphytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 131. P. 507–515. doi: 10.1104/pp.014258.
10. Shi J., Wang, H., Hazebroek, J., Ertl, D., Harp, T. The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant J.* 2005. Vol. 42. P. 708–719. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02412.x.
11. Kim S., Andaya C., Newman J., Goyal S., Tai T. Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK. *Theor. Appl. Genet.* 2008. Vol. 117. P. 1291–1301. doi: 10.1007/s00122-008-0863-7.
12. Shi J., Wang H., Schellin K., Li B., Faller M., Stoop J., Meeley R., Ertl D., Ranch J., Glassman K. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.* 2007. Vol. 25. P. 930–937. doi: 10.1038/nbt1322.
13. Xu X., Zhao H., Liu Q., Frank T., Engel K., An G., Shu Q. Mutations of the multi-drug resistance-associated protein ABC transporter gene 5 result in reduction of phytic acid in rice seeds. *Theor. Appl. Genet.* 2009. Vol. 119. P. 75–83. doi: 10.1007/s00122-009-1018-1.

KATRII V. B.¹, VELIKOZHON L. G.^{1,2}, SLIVKA L. V.¹, MORGUN B. V.^{1,2}

¹ *Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17*

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148*

IDENTIFICATION OF MUTATIONS RELATED TO PHYTATE ACCUMULATION IN BARLEY KERNELS

Aim. To conduct DNA marker testing on a sample of Ukrainian selection barley samples for identify various *lpa*-mutations that affect to the qualitative composition of phosphorus in barley grains. **Methods.** Isolation of DNA (CTAB method), polymerase chain reaction (PCR) and electrophoretic determination of DNA amplification products in agarose gel for the identification of *lpa* mutations in barley grains. **Results.** The conducted molecular genetic studies of 20 breeding lines of hulless barley made possible to identify samples that have *lpa-1* and *lpa-2* mutations. The presence of such mutant genes determines a low content of organic (unavailable inorganic) phosphorus and an increased content of mineral (available) phosphorus that can be absorbed by the human body. **Conclusions.** The applied methods of identification of *lpa-1* and *lpa-2* mutations that affecting to the phytate content in whole grain barley allow for effective analysis of selection lines and mutant samples that can be used in future crossing schemes.

Keywords: barley, phosphorus, phytates, *lpa*-mutations, marker-assisted selection.