

# Prebreeding nových genetických zdrojů ječmene jarního se zlepšenou potravinářskou a krmnou kvalitou

*(Prebreeding of new spring barley genetic resources with improved food and feed quality)*

Balounová, M., Vaculová, K., Sedláčková, I.  
Agrotest fyto, s.r.o.

## Souhrn

Tvorba nových odrůd ječmene, vhodných pro přímé potravinářské zpracování nebo se zlepšenými parametry pro efektivnější výživu zvířat je podmíněna využitím výchozích donorů s geneticky determinovaným odlišným chemickým složením zrna. Jednou z možností zefektivnění následného šlechtitelského procesu je aplikace postupů a metod, využívaných při prebreedingu. Základní podstatou je jejich začlenění do hybridizačních programů pro vytvoření nových genetických zdrojů s požadovanou kvalitou a v porovnání s původními zdroji i přijatelnou úrovní dílčích hospodářských znaků a vlastností.

V příspěvku je popsáno využití metod molekulární genetiky a jednoduchého kolorimetrického testu pro výběr hybridních materiálů ječmene jarního se změněným poměrem amylozy a amylopektinu a se sníženým obsahem kyseliny fytové v zrně. Jsou diskutovány výsledky studia nových linií ječmene jarního s geneticky determinovanou ověřenou kvalitou zrna a současně zlepšenými hospodářskými charakteristikami.

**Klíčová slova:** Ječmen jarní, prebreeding, MAS, kolorimetrický test, waxy endosperm, kyselina fytová

## Abstract

Development of the new barley cultivars, appropriate for direct food processing or with the improved parameters for more efficient use in animal nutrition is conditioned by use of the initial genetic resources with genetically determined different chemical composition of grain. One of the possibilities to make the follow-up breeding process more efficient is application of the procedures and methods of prebreeding. The basic substance is their integration into hybridization programs for development of new barley genetic resources with required quality and an acceptable level of individual agronomic characters and properties in comparison with initial resources.

The contribution describes the molecular genetic methods and simple colorimetric test that have been used for the selection of spring barley hybrid materials with changed amylose and amylopectin ratio and reduced content of phytic acid in grain. Results of the study of new spring barley lines with genetically determined and certified grain quality together with improved agronomic characteristics are discussed.

**Key words:** Spring barley, prebreeding, MAS, colorimetric test, waxy endosperm, phytic acid

## Úvod

Ječmen jako zdroj stravitelné vlákniny pro uplatnění v lidské výživě získává stále větší pozornost nejen ze strany odborníků, ale i veřejnosti a výrobců potravin. Výrobky z ječmene, zejména díky vysokému obsahu  $\beta$ -glukanů, vykazují řadu pozitivních efektů na lidské zdraví, spojených s fyziologickým působením při trávení, se snižováním hladiny cholesterolu v krevní plazmě, s pozitivním vlivem na stabilizaci obsahu glukózy v krvi, s prevencí rakoviny, apod. Tzv. „waxy“ genotypy ječmene se změněným poměrem základních složek škrobu – amylozy a amylopektinu – jsou charakterizovány nejen odlišnými vlastnostmi škrobu, ale současně mají tendenci ke zvýšení obsahu  $\beta$ -glukanů v zrně. To je předurčuje jako vhodnou surovinu k výrobě funkčních potravin se zlepšenou nutriční kvalitou. Za změny v obsahu amylozy v endospermu je zodpovědný lokus wax, který byl lokalizován na krátkém rameni chromozomu 1 (7H). Dominantní alela Wax kóduje standardní podíl amylozy a amylopektinu v zrně (tj. cca 25-27% amylozy a 75-73% amylopektinu). Škrob ječmene, který ve své genetické výbavě nese recesivní alelu wax, obsahuje uvedené polysacharidy v poměru 2-10% amylozy a 90-98% amylopektinu (Ishikawa et al., 1995). Metody molekulární genetiky umožňují výběr požadovaných recesivních materiálů již v raných generacích po křížení. Kolektiv autorů Domon et al. (2002) navrhl vhodné markery k detekci přítomnosti tří odlišných „waxy“ alel (wax, Wax a novel Wax) ovlivňujících složení škrobu v endospermu zrna ječmene, které lze využít k jednoduchému výběru v procesu molekulárně asistované selekce (MAS) genotypů se sníženým podílem polysacharidu amylozy.

V zrně ječmene, obdobně jako u mnoha dalších plodin je rozhodující podíl fosforu, vázaný v podobě kyseliny fytové (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen fosforečná kyselina). Kyselina fytová patří v oblasti krmivářství k přirozeným škodlivým, tedy nežádoucím látkám, protože vytváří komplexy s kationty, čímž zhoršuje využitelnost minerálních látek, proteinů a snižuje aktivitu trávicích enzymů. Fosfor v podobě kyseliny fytové představuje problém zejména při krmení monogastričních zvířat (drůbež, ryby, prasata), která jej v této podobě nemohou využít. Nevyužitý fosfor ze statkových hnojiv se pak dostává do půdy, kde dochází k uvolnění působením enzymů půdních mikroorganismů, což vede k jeho vyplavení a následně k ekologickým problémům souvisejícím se znečištěním povrchových vod fosfáty.

Jedním ze způsobů řešení je tvorba plodin se sníženým obsahem kyseliny fytové. Ve světě již existují mutantní linie i první odrůdy ječmene, které mají jak snížený obsah vázaného fosforu v zrně, tak i naopak zvýšený podíl volného fosforu (tzv. lpa – low phytic acid). Redukce obsahu kyseliny fytové a zvýšení volného fosforu je podmíněno lokusy detekovanými na různých chromozomech (1H, 2H, 4H a 7H). V závislosti na tom, na kterém lokusu k mutaci došlo, může být obsah kyseliny fytové snížen v rozmezí od 50% do více než 90% jejího původního obsahu. Linie označené M 422 (lpa 1-1) a M635 (lpa 3-1) byly vytvořeny v USA zpětným křížením mutantních genotypů s jejich rodičovskou odrůdou Harrington. Bregitzer & Raboy (2006) uvádějí, že redukce obsahu kyseliny fytové v zrně těchto materiálů je v rozsahu 40-50%, resp. 60-75%.

Využití výchozích genetických donorů ječmene s recesivní alelou wax nebo změnami v podílu kyseliny fytové ve šlechtitelských programech je omezeno jejich nepříznivými hospodářskými vlastnostmi, zejména nízkou odolností vůči listovým chorobám a nedostatečnou produktivitou v našich půdně-klimatických podmínkách. Tvorba šlechtitelských "polotovarů" křížením s produktivními registrovanými odrůdami ječmene je obdobou klasického prebreedingu a umožňuje rychlejší a efektivnější využití donorů nových nebo zlepšených nutričních vlastností pro potravinářství i krmné užití ve šlechtění. Prebreeding tvoří důležitý mezistupeň mezi konzervací a využíváním genetických zdrojů rostlin uložených v genových bankách. Podle FAO představuje prebreeding veškeré činnosti, které umožňují identifikaci požadovaných vlastností nebo genů u neadaptovaných materiálů, které nemohou být přímo využity ve šlechtění, a převod těchto vlastností do přechodného souboru materiálů, které již šlechtitelé mohou dále využít při tvorbě nových odrůd. V širším slova smyslu je prebreeding chápán jako soubor kroků, které vedou k rozšíření genetické diversity využitelné v dalším praktickém šlechtění.

V příspěvku jsou uvedeny dílčí postupy a poznatky získané v procesu prebreedingu vlastních nových genetických zdrojů a materiálů ječmene jarního s vyšší potravinářskou nebo krmnou kvalitou zrna a zlepšenými hospodářskými vlastnostmi oproti původním donorům. Jedná se o materiály s geneticky determinovanou přítomností recesivní alely genu waxy nebo sníženým obsahem kyseliny fytové v zrna, u kterých byly požadované vlastnosti potvrzeny aplikací molekulárních markerů nebo jednoduchými screeningovými chemickými metodami.

#### Chemické analýzy

Obsah beta-glukanů byl stanoven kitem fy Megazyme (Mixed-Linkage Beta-Glucan Assay procedure: McCleary Method), obdobně jako poměr amylozy a amylopektinu enzymatickou kolorimetrickou metodou (Amylose /Amylopectin Assay Kit).

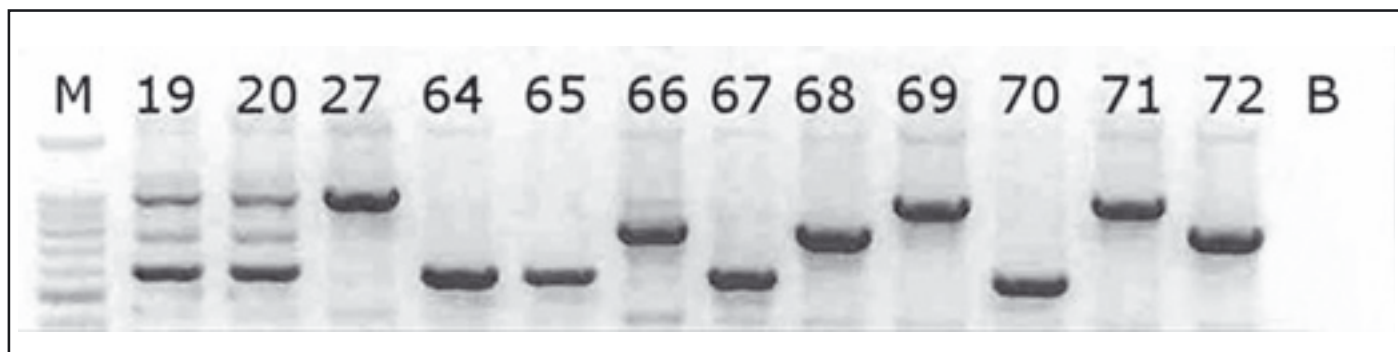
Obsah kyseliny fytové (PA v mg.g<sup>-1</sup>) a fosfátu (Pi v mg.g<sup>-1</sup>) - vyjádřeno jako kyselina fosforečná) ve vzorcích zrna byl dodavatelsky stanovený metodou kapilární isotachoforesy podle Blatného et al. (1995).

#### Detekce recesivní alely genu wax pomocí molekulárního markeru

Recesivní alela genu wax byla detekována podle modifikovaného postupu autorů Domon et al. (2002). Genomová DNA byla izolována z 14 dní starých rostlin pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen). Inzerčně- deleční polymorfismus byl zjišťován za pomoci specifických primerů (p-197, p+606), ohraničující část 5' sekvence wax genu na krátkém rameni chromosomu 1(7H). Produkty PCR byly separovány na horizontální agarózové elektroforóze v prostředí 1x TAE pufru. Oddělené DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí UV transiluminátoru a zdokumentovány digitálním fotoaparátem.

#### Screeningový test obsahu volného fosforu

Volný anorganický fosfor v zrně ječmene byl stanoven podle rozpracované a upravené metodiky (Raboy et al., 2000) s využitím tzv. Chenova činidla (Chen et al., 1956) na bázi molybdenanu amonného, kyseliny sírové a kyseliny askorbové. Kolorimetrický test (KT) je jednoduchou vizuální metodou, která



Obr. 1: PCR analýza rostlin F3 generace z různých kombinací křížení ječmene jarního

Pozn.: M ... 100 bp marker, B ... negativní kontrola; vzorky č. 19 a 20 jsou heterozygotní s wax/novel Wax typem škrobu; č. 64, 65 a 67 – hledané hybridní materiály s wax typem škrobu (600 bp); č. 70 – 600 bp (wax) – rodičovská odrůda CDC Candle; č. 71 – 1000 bp (novel Wax) – rodičovská linie Nord9460D7; č. 72 – 800 bp (Wax) – rodičovská odrůda Nordus (foto: M. Pouch)

#### Materiál a metody

##### Experimentální materiál

Vlastní hybridní materiály byly získány křížením odrůd ječmene jarního, donorů recesivní alely genu waxy s bezpluchým typem zrna (HB803, Merlin, CDC Candle) a standardních pluchatých sladovnických odrůd/linií.

Genotypy ječmene jarního se sníženým obsahem kyseliny fytové, vytvořené křížením vybraných odrůd ječmene jarního, vlastních hybridních materiálů s pluchatým i bezpluchým typem zrna s mutantními genotypy, získanými z USA (Prof. Raboy, University Idaho), se sníženým obsahem kyseliny fytové v zrna (M422 a M635).

Vytvořené vlastní linie a rodičovské odrůdy byly pěstovány v letech 2008-2010 v polních podmínkách lokality Kroměříž na parcelách o výměře 10 m<sup>2</sup> (3 opak.) standardními pěstebními postupy po předplodině ozimé řepce. Sklizeň byla provedena maloparcelním kombajnem, výnos zrna byl přepočten na t.ha<sup>-1</sup> a procenticky srovnán s průměrem kontrol, ve vzorcích zrna byla stanovena HTZ (v g).

hodnotí obsah volného anorganického fosforu v zrně pomocí intenzity kolorimetrické reakce a umožňuje rychlou detekci kříženců s recesivním projevem lpa alely.

#### Výsledky a diskuse

Pro detekci přítomnosti recesivní alely genu wax byly využity vzorky zrna materiálů sklizených z polních podmínek. Hodnocení inzerčně-delečního polymorfismu rodičovských forem a kříženců ukázalo, že daná metoda je jednoduchá a přesná. V důsledku kodominantního projevu je možné spolehlivě identifikovat nejen požadované recesivní genotypy, ale i heterozygoty, které lze

v následných výběrech dále šlechtitelsky využít (Obr. 1). Metodika detekce recesivní alely genu *wax* byla ověřena a rozpracována pro praktické šlechtitelské a další výzkumné použití (Vaculová a Pouch, 2008).

Selekce provedená pomocí metody MAS umožňuje výběr vhodných materiálů s očekávanou kvalitou zrna, t.j. sníženým obsahem amylozy a zvýšeným obsahem vlákniny potravy, reprezentované  $\beta$ -glukany (Tab. 1). Testace nově vytvořených genetických zdrojů v polních podmínkách a pomocí chemických analýz potvrdila, že byly vytvořeny linie s kombinací znaků a vlastností obou rodičů (výnos zrna, HTZ, apod.). Z průměrných dat získaných v experimentálních letech vyplývá (hodnoceno vždy 2–8 linií v jednotlivých kombinacích křížení), že využití rozdílných donorů waxy charakteru škrobu má vliv na průměrné hodnoty sledovaných znaků a vlastností. Zejména u kombinací křížení s rodičovskými odrůdami HB 803 a Merlin došlo ke zvýšení produktivity, přičemž nové linie vynikaly i vyšším obsahem beta-glukanů v zrně. Linie z kombinace křížení HB 803/NoD22 (označená KM2551.469.1.02) má prakticky totožný obsah  $\beta$ -glukanů a vyšší HTZ v porovnání s waxy donorem HB 803, avšak dosahuje statisticky významně vyššího průměrného výnosu zrna (o 15,7%).

V případech, kdy je sledovaný znak podmíněn multigenně, bývá využití molekulárních markerů v raných generacích po křížení málo spolehlivé. Osvědčují se zde rychlé a levné screeningové metody.

analýz obsahu kyseliny fytové a fytátu v zrně. Byla prokázána vysoká spolehlivost tohoto screeningového hodnocení (Tab. 2), které pro šlechtitele může představovat nejen časovou, ale i finanční úsporu při selekci požadovaných genotypů, zejména při nutnosti hodnocení velkého množství vzorků.

Ze sledovaného souboru genotypů je šlechtitelsky zajímavým výchozím zdrojem linie KM2881.622.2.07, vytvořená křížením vlastního nového genetického zdroje s waxy typem škrobu (Nordus/CDC Candle) s donorem *lpa* – M635. U tohoto materiálu se podařilo nakombinovat více požadovaných nutričně významných vlastností, a to bezpluchý typ zrna, waxy charakter škrobu a snížený obsah kyseliny fytové i zvýšený obsah volného fosforu v zrně.

#### Závěr

Prebreeding si neklade za cíl dosáhnout úplné morfologické vyrovnanosti nových genetických zdrojů, nicméně má smysl zejména v případech, kdy je třeba nakombinovat více požadovaných vlastností, znaků a parametrů do jednoho genotypu. Zařazení vhodných genotypů do procesu prebreedingu představuje pro budoucí využití ve šlechtění významnou časovou i finanční úsporu.

Vybrané nové genetické zdroje se zlepšenými nutričními parametry, vhodné pro využití ve šlechtění odrůd potravinářského typu, byly předány do Genové banky ČR a jsou k dispozici všem zájemcům o jejich využití. Vůči původním donorům představují

označení kombinace, <i>lpa</i> donora / ukazatel	pedigree	typ zrna <sup>2)</sup>	bodová hodnota KT <sup>3)</sup>	kys. fytová (PA)	fosfát (Pi)	podíl, % <sup>4)</sup>		celkový obsah P v % <sup>4)</sup>
				mg.g <sup>-1</sup>		PA	Pi	
M422 <sup>1)</sup>	M422	pl	4,5	4,00	1,71	67,6	32,4	78,2
M635 <sup>1)</sup>	M635	pl	5	3,58	3,67	46,5	53,5	101,9
KM2881.622.2.07	KM2645.412.6.1/M635	nw	>5	2,82	3,83	39,6	<b>60,4</b>	94,2
KM2715.645.4.07	Barke/M635	pl	>5	3,24	3,81	43,1	<b>56,9</b>	99,4
KM2666.644.05	KM2311/M635	pl	<b>2,5</b>	9,44	1,06	<b>88,8</b>	11,2	140,6
KM2666.542.4.08	KM2311/M635	pl	>5	2,93	3,56	42,3	57,7	91,5
KM2693.88.6.08	M422/KM2283	n	4	7,30	1,41	82,2	17,8	117,5
KM2911.623.2.07	M422/KM2640.411.2.1	nw	4	4,27	2,38	61,5	38,5	91,7
KM2693.19.2.08	M635/KM2283	n	<b>2,5</b>	9,25	0,65	<b>92,6</b>	7,4	132,0
KM2696.648.13.0	M635/KM2283	n	3,5	7,44	0,86	88,5	11,5	111,3
KM2696.614/2.07	M635/KM2283	n	3	8,51	1,74	81,3	18,7	138,4
KM2696.614.15.07	M635/KM2283	n	>5	5,49	4,18	53,9	<b>46,1</b>	134,6
KM2845.174.05	M635/Prestige	pl	4	6,60	1,17	83,4	16,6	104,7

<sup>1)</sup> - *lpa* rodičovské donory; <sup>2)</sup> - n = bezpluchý, pl - pluchatý typ obilky, w = waxy typ škrobu; <sup>3)</sup> - hodnoty kolorimetrického testu podle obsahu volného fosforu v zrně; <sup>4)</sup> - na základě molární hmotnosti byl proveden výpočet podílu kyseliny fytové (PA v %) a fosfátu (Pi v %) vůči celkovému poolu fosforu (P) ve vzorku a stanoven podíl P ve vzorku (%) vůči průměru daného experimentálního souboru.

Tab. 2: Nové linie ječmene jarního s rozdílným obsahem kyseliny fytové a fosfátu v zrně

Kolorimetrický test (KT) je jednoduchou vizuální metodou, která u cílových materiálů po přidání Chenova činidla hodnotí intenzitu kolorimetrické reakce srovnáním s kontrolami o předem známém obsahu volného fosforu (Obr. 2).

Výsledky kolorimetrického testu provedeného u hybridních materiálů ječmene jarního v raných generacích byly následně ověřeny ve vyšších generacích pomocí standardních chemických

tyto materiály významný posun v mnoha hospodářsky důležitých znacích a vlastnostech, zejména v odolnosti původcům chorob (padlí travní), odolnosti poléhání (zkrácením délky stébla) a zvýšení celkové produktivity porostu. Úspěšnost využití donorů waxy typu škrobu lze jednoduše kontrolovat již ve štěpících generacích ověřenými metodami MAS.

Materiály se sníženým obsahem kyseliny fytové mohou být významnými zdroji v programech šlechtění odrůd krmného typu, avšak je nezbytné, aby byly rovněž vyšší výnosu přijatelné pro budoucí pěstitele. S využitím ověřené screeningové metody kontroly obsahu volného fosforu je výběr požadovaných kříženců jednoduchý a finančně dostupný pro široký okruh šlechtitelů.

### Seznam nejdůležitější použité literatury

Blatný P., Kvasnička F., Kenndler E., 1995. Determination of Phytic Acid in Cereal Grains, Legumes and Feeds by Capillary Isotachopheresis. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 129–133.

Bregitzer P. & Raboy V., 2006. Effects of Four Independent low-Phytate Mutations in Barley (*Hordeum vulgare* L.) on Seed Phosphorus Characteristics and Malting Quality. *Cereal Chemistry*, 83(5): 460–464.

Domon, E., Fujita, M., Ishikawa N., 2002. The insertion/deletion polymorphism in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia. In *Theor. Appl. Genet.*, 104(1): 132–138.

Chen P.S., Toriba T.Y., Warner H., 1956. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28: 1756–1758.

Ishikawa N., Ishikawa J., Itoh M., 1995. Artificial induction and characterization of amylose-free mutants of barley. *Barley Genetics Newsletter*, 24: 49–53.

Raboy V., Gerbasi P.F., Young K.A., Stoneberg S.D., Pickett S.G., Bauman T., Murty 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 Physiology*, 124: 355–368.

Vaculová K., Pouch M., 2008. *Metodika výběru materiálů ječmene s geneticky diferencovaným poměrným zastoupením amylozy*

a amylopektinu v zrně. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., 10s. ISSN 90-102-82-25.

### Poděkování

Výsledky byly zpracovány za finanční podpory MZe projektů č. QH91053, QJ1210257, Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiverzity (NP GZR) a institucionální podpory č. RO0211.

*/recenzováno/*

Kontaktní adresa:

Ing. Marta Balounová, Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

e-mail: Balounova@vukrom.cz

Obr. 2: Kolorimetrický test

