



Agrotest fyto, s.r.o.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.
Mendelova univerzita v Brně



**METODIKA PREBREEDINGU
JEČMENE JARNÍHO S
DIFERENCOVANÝM OBSAHEM
PŘIROZENÝCH ŠKODLIVÝCH
LÁTEK V ZRNĚ PRO ŠLECHTĚNÍ
ODRŮD NESLADOVNICKÉHO
TYPU**



Kroměříž – 2011

Agrotest fyto, s.r.o.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.
Mendelova univerzita v Brně

**METODIKA PREBREEDINGU JEČMENE JARNÍHO S
DIFERENCOVANÝM OBSAHEM PŘIROZENÝCH
ŠKODLIVÝCH LÁTEK V ZRNĚ PRO ŠLECHTĚNÍ ODRŮD
NESLADOVNICKÉHO TYPU**

Certifikovaná metodika

Kroměříž – 2011

DEDIKACE

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR při řešení projektu NAZV, č. QH 91053 „Zlepšení kvality zrna ječmene využitím donorů diferencovaného obsahu přirozených látek s ambivalentním nutričním účinkem“.

AUTOŘI

Ing. Kateřina Vaculová, CSc.
Ing. Marta Balounová
Ing. Irena Sedláčková
Prof. Ing. František Kvasnička, CSc.
RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.
Ing. Sylvie Běláková
Ing. Karolína Benešová, Ph.D.
Mgr. Milan Pouch
Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc.

OPONENTI

Ing. Petr Svačina
PLANT SELECT, s.r.o., Hrubčice 111, 798 21 Bedihošť
E-mail: petr.svacina@limagrain.com

Ing. František Kůst
Odbor rostlinných komodit, Ministerstvo zemědělství ČR, Těšnov 65/17,
117 05 Praha 1
E-mail: frantisek.kust@mze.cz

CERTIFIKACE

Metodika byla certifikována Odborem rostlinných komodit Ministerstva zemědělství ČR vydáním osvědčení č.4/232180/2011-MZE-17221 ze dne 21.12.2011

© Agrotest fyto, s.r.o., 2011

ISBN e-verze: 978-80-87555-00-2

OBSAH

I. CÍL UPLATNĚNÉ METODIKY	4
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
II.1. Úvod.....	4
II.2. Vlastní metodika	9
II.2.1. Chemické a molekulární metody	10
II.2.1.1. Hodnocení a výběr genotypů ječmene se sníženým obsahem fytátového fosforu	10
II.2.1.2. Studium, hodnocení a výběr genotypů ječmene s diferencovaným obsahem neškrobových polysacharidů	19
II.2.1.3. Studium a hodnocení genotypů ječmene s diferencovaným obsahem polyfenolických látek.....	21
II.2.2. Doporučení pro uživatele.....	23
II.2.2.1. Další chemické analýzy	23
II.2.2.2. Výběr na základě morfologických znaků obilky.....	25
II.2.2.3. Využití screeningových a nedestruktivních metod ke stanovení vybraných živin zrna.....	26
II.2.2.4. Využití nově vytvořených genetických donorů v dalším šlechtitelském procesu	27
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	27
IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	28
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	28
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	29
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	36
VIII. PŘÍLOHY	38

I. CÍL UPLATNĚNÉ METODIKY

Cílem metodiky je na základě víceletých výzkumných poznatků a zkušeností ze studia světových genetických zdrojů, vlastních nově vytvořených materiálů ječmene a výsledků výzkumu z let 2008-2011 shrnout a popsat postup výběru a tvorby nových výchozích zdrojů ječmene (prebreeding) ke šlechtění na nesladovnickou kvalitu zrna. Pozornost je věnována především přirozeným škodlivým látkám, jejichž nutriční účinek je dvojaký z pohledu očekávaného užitkového směru šlechtění (krmné vs. potravinářské užití zrna).

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY**II.1. Úvod**

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) patří ke světově nejdůležitějším obilninám, které se podílejí na zabezpečení výživy lidí a hospodářských, zejména monogastrických zvířat. Šlechtění na jakost zrna ječmene je složité, protože se jedná o komplexní vlastnost, která je vyjádřena řadou ukazatelů. Sledování a hodnocení úrovně jakostních ukazatelů je součástí selekčních postupů a souvisí s užitkovými směry šlechtění. Tradice domácího ječmenářství je historicky zaměřena na šlechtění sladovnických odrůd s vysokou sladařskou a pivovarskou hodnotou (Graman 1998). Šlechtění na sladovnickou jakost je nejrozšířenějším a nejpropracovanějším směrem šlechtění. Zde se parametry dílčích jakostních znaků postupně formulovaly podle požadavků jednotlivých sladoven a pivovarů (Svačina 2008). Šlechtitelské cíle orientované na další užitné směry jako krmná jakost nebo přímé potravinářské či průmyslové využití, jejichž rozvoj je mladšího data, nemají do dnešního dne striktně propracovaná kvalitativní kritéria. Šlechtitelské cíle zaměřené na tvorbu krmných odrůd byly sice formulovány již v minulém století (Kolektiv 1976), avšak doposud se nepodařilo tyto záměry realizovat. Mimo jiné i proto, že dodnes nejsou stanoveny obecně akceptovatelné požadavky na krmnou hodnotu zrna ječmene, platné pro různé druhy a kategorie hospodářských zvířat. Na druhé straně ale existuje poměrně jednoznačný názor na přítomnost látek, které mají minimální výživnou hodnotu, snižují krmnou kvalitu zrna nebo dokonce působí toxicky (Kalač a Míka 1997).

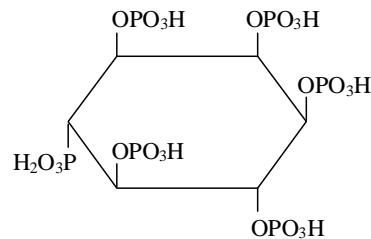
Ječmen, obdobně jako další obiloviny, obsahuje celou řadu nežádoucích, přirozených škodlivých látek, které se v zrně vyskytují jako produkty

sekundárního metabolismu nebo meziprodukty základních metabolických reakcí, případně jako stavební látky buněk. K těmto látkám se řadí kyseliny fytové, neškrobové polysacharidy a celá skupina fenolických látek. Na druhou stranu ale neškrobové polysacharidy, hlavně jejich rozpustná forma, a různé skupiny polyfenolických látek působí prokazatelně příznivě v prevenci mnohých civilizačních chorob, takže pro výživu lidí jsou v rostlinných produktech naopak látkami žádoucími (Prugar *et al.* 2008). Role těchto látek je tedy dvojaká (ambivalentní) a mění se podle toho, zda je zrno zkrmováno nebo je využito k přímé lidské výživě, tedy podle konečného spotřebitele.

Využití vhodných genetických zdrojů jako donorů výše uvedených látek je často limitováno jejich nevhodnými hospodářskými vlastnostmi. Pro šlechtění nových odrůd s vysokou nutriční hodnotou a přijatelnou úrovní pěstitelsky požadovaných znaků a vlastností jsou proto užitečné rozpracované výchozí materiály, u nichž jsou již zlepšeny některé hospodářky významné ukazatele.

Kyselina fytová

Fosfor patří k biogením makroprvkům, důležitým pro správný růst a vývoj všech organismů. Kyselina fytová (dále jen PA) je esterem *myo*-inositolu a kyseliny fosforečné (Obr. 1) a je hlavní zásobní formou fosforu zrně obilovin. Představuje 65-80% celkového fosforu zrna a více než 95% všech forem inositol polyfosfátů, extrahovatelných v kyselém prostředí (Raboy 1997).



Obr. 1 Kyselina fytová: *myo* – inositol - 1, 2, 3, 4, 5, 6 – hexakis dihydrogen fosforečná kyselina (Zdroj: Marounek 2004)

Perikarp s přilehlou aleuronovou vrstvou a klíček obsahují 10-20x více kyseliny fytové než endosperm. Fytáty se hromadí během zrání zrna, lokalizují se do aleuronových tělísek v aleuronové vrstvě obilnin,

případně do bílkovinných granulí v endospermu. Globoidy (inkluze), které se vyskytují v aleuronových partikulích nebo bílkovinných granulích, obsahují kyselinu fytovou v komplexu s kovovými prvky, zejména K a Mg, méně s Ca, Fe, Mn.

Fytát se vyskytuje jako komplexní sůl zvaná fytin, která je především zásobní energetickou látkou, iniciátorem dormance a zásobním místem minerálních látek (Marounek 2004). Chemicky nebo působením enzymu fytázy je fytin štěpen na molekuly kyseliny trihydrogen fosforečné a inositolu. Inositol se řadí do skupiny vitamínu B a je pro vyšší živočichy nepostradatelnou látkou. U biologicky aktivního myoinositol-6 fosfátu byly dokonce pozorovány příznivé antikancerogenní účinky (Graf a Eaton 1993).

Z druhého pohledu jsou fytáty přirozeně se vyskytující toxikanty (Oberleas 1989), které vytvářejí nerozpustné, biologicky neúčinné komplexy s řadou důležitých minerálních látek, blokují některé trávicí enzymy u zvířat a člověka a negativně ovlivňují využitelnost živin a nutričně významných látek. V rozvojových zemích a ve skupinách konzumentů s převahou rostlinné stravy přispívá přítomnost fytátu k deficienci železa a zinku (Lind *et al.* 2003; Manary *et al.*, 2000; Mendoza *et al.* 1998). Monogastriční hospodářská zvířata a ani lidé nemají vhodné enzymatické systémy, které by mohly kyselinu fytovou a její deriváty účinně štěpit. Využití fytátového fosforu je tak silně omezeno zejména u citlivých monogastrů (drůbež a mláďata vůbec).

Jiným negativním dopadem přítomnosti PA v krmných a potravinářských plodinách je skutečnost, že nestrávený fosfor přechází do vnějšího prostředí, hromadí se v půdě a dostává se do spodních vod, kde představuje nezanedbatelný zdroj znečištění životního prostředí (Miettinen *et al.* 1997).

Hrubá vláknina

Součástí sacharidového komplexu zrna ječmene je kromě škrobu, volných cukrů a malého množství oligosacharidů také hrubá vláknina a neškrobové polysacharidy, jejichž obsah, chemické složení a fyziologické působení ovlivňuje kvalitu a vlastnosti zrna pro různé konečné užití.

Ve smyslu chemického stanovení se vyčleňuje tzv. hrubá vláknina, která je tvořena hlavně celulózou, hemicelulózou, ligninem a pektinem. Uvádí se, že zvýšení obsahu vlákniny o 1% snižuje stravitelnost sušiny zrna přibližně o 3,5% (Just 1982). Využití vlákniny kolísá v závislosti na druhu hospodářských zvířat, zdroji vlákniny, stupni lignifikace, úrovni zpracování, typu analýzy apod. Obsah vlákniny v krmivu lze významně

snížit zařazením odrůd s bezpluchým typem zrna do krmných dávek. Pluchy tvoří 10-13% sušiny (Bhatty *et al.* 1974). Jsou tvořeny hlavně celulórou, hemicelulórou, ligninem, pektinem a malým množstvím bílkovin. Podle některých autorů může odstranění pluch u ječmene snížit obsah hrubé vlákniny na úroveň jako u kukuřice nebo pšenice (Bhatty 1986), protože mezi stravitelností energie, obsahem pluch a podílem hrubé vlákniny v zrně ječmene je silná negativní korelace (Bell *et al.* 1983).

Neškrobové polysacharidy

Zatímco vláknina je hodnocena jako chemický ukazatel výživné hodnoty krmiv, neškrobové polysacharidy (NSP), které v zrně obilovin plní funkci stavebních polysacharidů, jsou z pohledu nutriční kvality řazeny spíše do skupiny aktivních antinutričních faktorů. Jedná se o nestravitelnou nebo omezeně stravitelnou část vlákniny. Některé jsou rozpustné ve vodě, většina nikoli. Ve střevním traktu bobtnají a zvyšují viskozitu tráveniny. Tím zhoršují pohyblivost živin i trávicích enzymů v trávicím ústrojí a omezují absorpci živin, zejména tuků. V případě využití ječmene jako suroviny pro výrobu potravin je ale role NSP diametrálně odlišná. Nežádoucí zvýšení viskozity v trávicím traktu je při posuzování vhodnosti zrna ječmene k výživě lidí naopak pozitivním jevem. K příznivým účinkům vyššího podílu vlákniny ve stravě patří snížení hladiny cholesterolu, snížení rizika výskytu rakoviny tlustého střeva, prevence obezity a cukrovky (Baik a Ullrich 2008). Problematice NSP z pohledu perspektivy využití ve zdravé a preventivní lidské výživě jako významného zdroje vlákniny potravy byla věnována řada odborných a vědeckých prací jak ve světě (Bhatty 1992; 1995; Newman *et al.* 1989; Newman a Newman 1991, aj.), tak i v tuzemsku (Ehrenbergerová *et al.* 1997; 2005; 2006a; Havlová 2001; Vaculová 1992; Vaculová *et al.* 2000 aj.). Z hlediska výživy zvířat i využití k přímé výrobě potravin jsou u ječmene z NSP nejvýznamnější β -glukany (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -D-glukany - dále BG) a arabinoxylany (pentozany). Obsah BG (obvykle 2 až 10 %) závisí na genotypu ječmene. Pro potravinářské účely jsou vhodné odrůdy bezpluchého ječmene s vyšším obsahem BG (>5 %) a stravitelné vlákniny (Taketa *et al.* 2004; Bhatty 1992); ječmen sladovnický naopak by měl obsahovat méně BG (max. 1,5 – 2 %). Uvádí se, že existují rozdíly v obsahu BG mezi 2-řadými a víceřadými odrůdami ječmene (Fastnaught *et al.* 1996, apod.). Vyšší obsah BG byl také naměřen u mnoha genotypů s bezpluchou obilkou (Baidoo *et al.* 1998; Boros *et al.* 1996).

Vývoj genotypů jarního ječmene s waxy typem endospermu

Chemické složení škrobu ovlivňuje vlastnosti a možnosti jeho technologického použití. V zájmu vytvoření variability a rozšíření možností uplatnění škrobu ve výživě lidí jsou ve světě šlechtěny odrůdy polních plodin obilovin s geneticky podmíněným rozdílným zastoupením dvou hlavních polysacharidů škrobu – amylozy a amylopektinu. Poměr amylozy a amylopektinu ve škrobu významně podmiňuje technologické vlastnosti zrna a mouky (texturu a mlecí charakteristiky zrna, bobtnavost a gelovací schopnost škrobu, jeho teplotní retrogradaci, rozpustnost, absorpci vody, bod mazovatění, bod varu, hustotu, bod tuhnutí, vařivost, atd. - Munck 1985; Swanston *et al.* 1995). Zrno se sníženým obsahem amylozy je lépe technologicky zpracovatelné a využitelné k výrobě některých druhů pokrmů (Box *et al.* 2005). Genotypy ječmene s nízkým nebo naopak vysokým obsahem amylozy mají tendenci ke zvýšenému obsahu BG (Ullrich *et al.* 1986; Swanston *et al.* 1997) nebo jejich vyšší výtěžnosti (Izydorczyk *et al.* 2000). V běžných odrůdách ječmene je podíl amylopektinu ve škrobu cca 74-79% a 25-30 % tvoří amyloza. Materiály obilnin, u kterých je snížen obsah amylozy (až do 0-10 %) mají moučnatější a měkčí endosperm a jsou proto označovány jako „waxy“.

Polyfenolické látky

Polyfenolické látky se jako sekundární metabolity nacházejí v každé vyšší rostlině. Rostliny si je vytvářejí na obranu proti škůdcům a chorobám, mnohé z nich mají fungicidní, baktericidní i virocidní účinnost a jsou významnými obsahovými látkami spojovanými s reakcí rostlin na změny vnějších podmínek (reakce na abiotické typy stresu - Chalker-Scott a Kraemer 1989; Mayer 2006).

Zrno ječmene má vyšší obsah polyfenolů, zejména flavanolů, než další obiloviny, jako například pšenice, oves, tritikale, rýže, apod. (McMurrough *et al.* 1983). V zrně ječmene je vysoký obsah polyfenolických látek obsažen zejména v aleuronové vrstvě a obalech, tedy pluše a plušce. V obalových vrstvách víceřadého ječmene byl stanoven vyšší obsah polyfenolů (taninů) než u 2-řadého ječmene, rozdíly existují i v závislosti na provenienci ječmene (Goldammer 1999). Obsah fenolických látek v zrně je variabilní a závisí jak na konkrétních povětrnostních podmínkách lokality a zdravotním stavu porostu, tak i na vlastním genotypu příslušné odrůdy ječmene.

Polyfenolické látky a kvalita potravin

Obdobně jako v případě již výše fyťatů a neškrobových polysacharidů, mohou být i tyto fytonutrienty posuzovány z rozdílných úhlů pohledu.

Flavonoidy (převážně anthokyany, flavonoly, flavony, katecholy a flavanony), isoflavonoidy a ostatní polyfenoly jsou silnými antioxidanty (Alvarez *et al.* 2006; Richard-Forget *et al.* 1995; Sekanina a Táborská 2004). Fenolické látky ovlivňují rozhodující senzorycké vlastnosti piva, jako je chuť, vůně, barva a pěnivost, ale také mají vliv na koloidní stabilitu a tedy na celkovou trvanlivost piva (Irwin *et al.* 1981; Kellner *et al.* 2005; McMurrugh *et al.* 1996). Fenolické látky se nacházejí především v obalových částech obilky, kde jsou vázány spolu s polysacharidy a proteiny. Fenolické látky a jejich oxidační produkty jsou často součástí biochemických pochodů spojených s produkcí barevných sloučenin. Oxidace polyfenolů a flavonoidů způsobuje tzv. „hnědnutí“ a v řadě případů tak negativně ovlivňuje senzoryckou kvalitu potravinářských produktů.

Polyfenolické látky a krmná kvalita zrna ječmene

Vysoký obsah polyfenolických látek v zrně krmného ječmene a v krmivářsky využívaných vedlejších produktech po sladování (např. sladovém květu) je negativním faktorem, který ovlivňuje hodnotu této suroviny pro krmení. Některé volné fenolové kyseliny se podílejí na tvorbě o-chinonů, které jsou schopny vázat esenciální aminokyseliny - lyzín a methionin. Do skupiny polyfenolických látek se řadí také třísloviny, které jsou v poměrně vysokém množství obsaženy v aleuronové vrstvě a obalech zrna ječmene. Krmiva s vysokým obsahem tříslovin působí škodlivě na sliznici trávicího traktu, denaturují digestivní enzymy, čímž snižují odbourávání a resorpci živin z krmiva (Kudrna 2004). Vůči tříslovinám je nejvíce citlivá drůbež. V souvislosti s vyšší hladinou tříslovin v krmivu byly pozorovány i senzorycké změny produktů živočišné výroby (změněná chuť a vůně masa, olivově zelené žloutky vajec).

II.2. Vlastní metodika

Prebreeding nových výchozích zdrojů ječmene jarního pro nesladovnické využití s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek v zrně umožňuje vytvořit nové zdroje pro následnou tvorbu odrůd s diametrálně odlišným využitím. Vzhledem k tomu, že dostupné genetické zdroje nedosahují často požadované úrovně hospodářsky vhodných znaků a ukazatelů, je předselekce (prebreeding) materiálů s požadovaným chemickým složením zrna způsobem jak urychlit další postup při vývoji nových genotypů. Realizace hlavního cíle metodiky, tedy shrnutí a popisu postupu při výběru a tvorbě nových výchozích zdrojů ječmene vhodných

ke šlechtění ječmene na nesladovnickou kvalitu zrna je soustředěna především na metody, které umožňují prověřenými nebo nově rozpracovanými a validovanými postupy provádět výběr genotypů s požadovaným nízkým nebo vysokým obsahem sledovaných, zejména přirozených škodlivých látek. Součástí vyhodnocení experimentálních dat je diskuse k výsledkům získaným při hodnocení souboru vybraných výchozích odrůd, donorů sledovaných látek a nových linií ječmene jarního, vytvořených ve společnosti Agrotest fyto, s.r.o.

II.2.1. Chemické a molekulární metody

II.2.1.1. Hodnocení a výběr genotypů ječmene se sníženým obsahem fytátového fosforu

Jedním ze způsobů jak zlepšit využitelnost fosforu je vývoj nových odrůd ječmene se sníženým obsahem kyseliny fytové (dále PA) a zvýšenou hladinou fosfátu (dále Pi). V procesu klasického šlechtění jsou k tomuto účelu využívány materiály s geneticky podmíněnou redukcí obsahu PA (low phytic acid – lpa), vytvořené chemickou mutagenézí (Raboy a Cook 1999, Rasmussen a Hatzack 1998, a.j.). V rámci řešení dané problematiky byly využity mutanty ječmene jarního, získané z USA (prof. V. Raboy, University Idaho), vytvořené působením azidu sodného na zrno sladovnické odrůdy Harrington (Raboy a Cook, 1999). Tyto materiály se lišily jak redukcí obsahu PA, tak i genetickou determinací znaku pro snížený obsah PA (Larson *et al.* 1998; Roslinsky *et al.* 2007): M422 (gen *lpa1-1*, lokalizovaný na chromosomu 2HL; cca 50% redukce obsahu fytátu), M1070 (gen *lpa2-1*, lokalizovaný na chromosomu 7HL), M635 (gen *lpa3-1*, lokalizovaný na chromosomu 1HL – cca 75% redukce obsahu PA) a M955 (bez genetické lokalizace znaku s 85-90% snížením obsahu PA).

POUŽITÉ METODY

a) Analýza obsahu kyseliny fytové a fosfátu v zrně

Podstata metody

Ve vzorcích zrna ječmene byl obsah kyseliny fytové (PA v mg.g⁻¹) a fosfátu (Pi v mg.g⁻¹ - vyjádřeno jako kyselina fosforečná) stanovený metodou kapilární isotachoforesy podle Blatný *et al.* (1995).

Pracovní postup

Úprava vzorku

Zrna byla nejprve rozemleta pomocí odstředivého mlýnu Retsch ZM 200 (velikost oka síta 0,75 mm). Asi 10 g takto rozemletého vzorku bylo poté

rozemleto na vibračním mlýnku Retsch MM301. Fosfát a fytát byl převeden do roztoku extrakcí s 0,25 M HCl. Filtrát zředěný demineralizovanou vodou (10x) byl použit pro isotachoforetickou analýzu.

Použitá instrumentace

Analýza byla provedena na dvoukapilárovém elektroforetickém analyzátoru IONOSEP 2004 (Recman-laboratorní technika, ČR) s vodivostním bezkontaktním detektorem (předseparační FEP kapilára 120x0,6 mm, separační FEP kapilára 120x0,25 mm). Kalibrace byla provedena metodou vnějšího standardu. Ze zásobního roztoku 5 mM fytové kyseliny a 5 mM fosfátu byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci 0,01 až 0,1 mM (0,01, 0,02, 0,04, 0,08 a 0,1 mM). Byla získána kalibrační rovnice (závislosti délky vlny fytátu/fosfátu na jeho koncentraci), která byla používána pro vyhodnocení analýz vzorků ječmene.

Vyhodnocení experimentálních dat

Výsledky hodnocení souboru vybraných odrůd, lpa donorů a linií ječmene s pluchatým i bezpluchým zrnem ukázaly, že obsah celkového fosforu, PA i Pi je velmi variabilní. Jak plyne z Tab. 1, na vysoké míře proměnlivosti se podepsal hlavně ročník 2001, kdy byly naměřeny významně odlišné hodnoty obsahu PA (v průměru až 3,2 krát vyšší) i Pi (v průměru až 2,1 krát nižší) než v letech 2002-2003.

Analýza variance prokázala, že v celém souboru byly vysoce významným zdrojem proměnlivosti nejen ročníky, ale v případě obsahu využitelného fosforu i genotypy. Je zřejmé, že k dosažení změny průkaznosti odrůdy jako faktoru proměnlivosti pro Pi vedlo především zařazení lpa mutantů. Na druhé straně jejich přítomnost ovlivnila i průměrný obsah PA a Pi v souboru pluchatých odrůd, takže se jako významný zdroj proměnlivosti jevil rovněž typ zrna. Mezi materiály ječmene s pluchatým a odrůdami (CDC Candle, HB803, Merlin) a novými liniemi s bezpluchým typem zrna byla zjištěna statisticky významná diference v obsahu PA (5,11 vs. 7,77 mg.g⁻¹), pravděpodobně i v důsledku vysokého obsahu PA u linie KM2037, která se tak statisticky významně lišila nejen od lpa mutantů, ale i od všech standardních odrůd. Průměrný obsah PA (u materiálů zkoušených v letech 2001-2003) kolísal od 1,12±0,21 mg.g⁻¹ (M955) po 9,84±4,84 mg.g⁻¹ (bezpluchá linie KM2037) a Pi v rozmezí 1,76±1,03 mg.g⁻¹ (Thuringia) až 8,67±2,39 mg.g⁻¹ (M955) - Tab. 2 (viz. VIII. Přílohy).

Tab. 1

Efekt vlivu zdrojů proměnlivosti na obsah kyseliny fytové a fosfátu u ječmene

Zdroj proměnlivosti / MS	df	celý soubor		df	bez lpa donorů	
		kys. fytová (PA)	fosfát (Pi)		kys. fytová (PA)	fosfát (Pi)
odrůda	18	13.67	13.23***	14	3.89	0.56
rok	2	286.11***	21.56*	2	293.17***	26.82***
typ zrna ¹⁾	1	93.52*	28.83*	1	22.61	0.06
typ škrobu ²⁾	1	6.66	3.53	1	0.04	0.42

¹⁾ - pluchaté vs. bezpluché; ²⁾ - se standardním vs. waxy typem škrobu; ³⁾ - soubor standardních materiálů ječmene, bez lpa donorů; * - P_{0,05}; ** - P_{0,01}; *** - P_{0,001}

Zdroj: Vaculová *et al.* (2012)

Přednosti a úskalí metody, možnosti rozšíření

Použitá metodika stanovení PA a Pi v zrně obilovin poskytuje velmi přesné výsledky, avšak vzhledem k finanční a pracovní náročnosti ji lze doporučit k využití až u homogenních materiálů ječmene ve vyšších generacích po křížení. Na základě přepočtu molární hmotnosti lze stanovit podíl PA a Pi (%) vůči celkovému poolu fosforu (P) ve vzorku a vybrat genotypy s požadovaným sníženým obsahem PA a současně vyšším podílem Pi. Vzhledem k vysoké proměnlivosti vlivem pěstebních podmínek a počasí je vhodné vycházet z výsledků konkrétního roku a souboru. Pro další šlechtění se zaměřením na nízký podíl nežádoucí PA je nezbytné vzít v potaz i celkový obsah P v zrně. Výsledky uvedené v Tab. 3 (viz. VIII. Přílohy) prokazují, že je reálné vytvořit genotypy, které jsou obsahem PA a Pi diametrálně odlišné.

Možným úskalím je příprava experimentálního materiálu, konkrétně požadavek na vysokou homogenitu analyzovaných vzorků. Skutečnost, že obsah PA je významně vyšší v periferních částech obilky v porovnání s endospermem (O'Dell *et al.* 1972) může vést při nedokonalém rozmělnění pluch ke zkreslení dosažených výsledků.

b) Kolorimetrický test obsahu volného fosforu

Výběr kříženců s redukováným obsahem PA a zvýšeným obsahem Pi v zrně vyžaduje porovnání velkého množství linií, což je při využití standardních chemických metod finančně i pracovní náročné. Z tohoto důvodu byly rozpracovány screeningové metody, které jsou vodítkem pro šlechtitele i praktické využití při odhadu obsahu volného fosforu různých vzorků obilovin.

Podstata metody

Screeningové kolorimetrické stanovení (kolorimetrický test – KT) volného anorganického fosforu v zrně bylo provedeno podle rozpracované a upravené metodiky (Raboy *et al.* 2000) s využitím tzv. Chenova činidla (Chen *et al.* 1956) na bázi molybdenátu amonného, H_2SO_4 a kyseliny askorbové. Tato vizuální screeningová metoda hodnotí obsah volného fosforu v zrně za pomoci kolorimetrické reakce umožňuje rychlou detekci kříženců s recesivním projevem lpa alel.

Potřebné technické vybavení

Přístroje a zařízení: laboratorní mlýnek pro malá množství zrna, analytické váhy Mettler AE 160, chladnička s kalibrovanou teplotou Liebherr profi line UKS 3600, automatické jednonábové a vícekanábové pipety Finnipette (Thermo Scientific), vortexová třepačka Vortex-Genie 2 (Scientific Industrie, Inc.), mikrozkušavky Eppendorf 1,5 ml, mikrotitrační destičky Dynex Immulon® 1B (Dynex Technologies, Inc.)
Chemikálie (čistoty p.a.) a jejich příprava: hydrogenfosforečnan draselný; kyselina askorbová; kyselina chlorovodíková; kyselina sírová; molybdenan amonný; redestilovaná voda.
Chenovo činidlo: 1 objem 6N H_2SO_4 ; 1 objem 2,5% $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 1 objem 10% $C_6H_8O_2$; 2 objemy dd H_2O .

Pracovní postup

Jednotlivá zrna vzorků se pomelou, naváží do mikrozkušavek (50 mg) a přidá se 500 μ l 0,4M HCl. Zkušavky se třepou 30 minut na vortexové třepačce. Vzorky se pak nechají extrahovat při 4°C přes noc. Do jamek v mikrotitračních destičkách se napipetuje 10 μ l extraktu vzorků, 90 μ l dd H_2O a 100 μ l Chenova činidla. Na každou mikrotitrační destičku se také napipetuje sada standardů. K příslušným množstvím 1ml K_2HPO_4 se přidá 10 μ l 0,4M HCl, příslušná množství dd H_2O a 100 μ l Chenova činidla. Vzorky a standardy se nechají vyvíjet dvě hodiny při laboratorní teplotě. Po dvou hodinách se vyhodnotí srovnáním intenzity zbarvení jednotlivých vzorků s intenzitou zbarvení standardů. Po mineralizaci materiálu mokrou cestou se přítomný fosfor ve formě kyseliny fosforečné převede na fosfomolybdenovou kyselinu, která se zredukuje na molybdenovou modř. Vzniklé zbarvení vzorků se vizuálně porovná se zbarvením standardů (stupnice v bodech 1-5 – viz. Tab. 4).

Tab. 4

Příprava standardů na kolorimetrický test

Bodové hodnocení	μ l 1ml		μ l 0,4M	
	K_2HPO_4	HCl	μ l dd H_2O	ng P
1	0	10	90	0
2	5	10	85	155
3	15	10	75	465
4	30	10	60	960
5	45	10	45	1395

Vyhodnocení experimentálních dat

Výsledky hodnocení odrůd se standardním obsahem PA a Pi a použitých lpa mutantů metodou kolorimetrického testu prokázaly vhodnost tohoto postupu pro selekci hybridů s požadovaným zvýšeným obsahem Pi v zrně.

Tab. 5

Screeningové hodnocení obsahu volného fosforu metodou kolorimetrického testu a podíl kyseliny fytové a fosfátu ve vzorcích zrna vybraných materiálů ječmene

Odrůda, linie, mutant	bodová hodnota KT ^{S)}				podíl, % ¹⁾		celkový obsah P v % ²⁾
	A	B	C	D	PA	Pi	
Harrington	1	1.5	1.5	1.5	73.9b ³⁾	26.1a	95.9ab
M422	3	3	3	3	38.6a	61.4b	95.4ab
M1070	2.5	2.5	2.5	2.5	28.9a	71.1b	88.2ab
M635	4	4	4	3.5	22.2a	77.8b	116.1ab
M955	3.5	4	4	4	10.6a	89.4b	108.1ab
KM 1057	1.5	1.5	1.5	2	75.9b	24.1a	100.9ab
KM 2037	1.5	1.5	1.5	2	76.2b	23.8a	124.3c
Jersey	1.5	1.5	1	1.5	77.6b	22.4a	76.1a
Tolar	1.5	1.5	1.5	2	72.4b	27.6a	93.6ab

^{S)} - hodnota kolorimetrického testu v opakování; ^{1), 2)} - viz. Tab. 3; ³⁾ - homogenní skupiny označené ve sloupci různými písmeny, se průkazně liší při $P_{0.05}$. Zdroj: Vaculová *et al.* (2012)

Dosažené body screeningového hodnocení vybraných materiálů ječmene pomocí KT (první experimentální soubor) metodou kolorimetrického testu (KT) byly v souladu se zjištěnými průměrnými hodnotami obsahu

PA i Pi (Tab. 5). Spermanovy korelace mezi daty z měření KT a obsahem PA i Pi byly silné a průkazné a měly opačné znaménko ($r = -0,64^{***}$ a $r = 0,85^{***}$ pro PA, resp. Pi; $P \leq 0,01$), což je v souladu s použitou metodou. Aplikace KT v raných generacích hybridních linií po křížení s lpa donory v průběhu let 2002-2010 rezultovala ve vytvoření celé řady nových materiálů ječmene s rozdílným obsahem PA, Pi i celkovým poelem obou forem P. Výsledky prezentované ve výše zmíněné Tab. 3 (viz. VIII. Přílohy) prokázaly úspěšnost tohoto selekčního postupu.

Přednosti a úskalí metody, možnosti rozšíření

Upravená a rozpracovaná metoda KT je vhodná pro hodnocení kříženců s lpa donory v raných generacích po křížení z důvodu malého požadavku na množství vzorku a rychlosti analýzy. Vizualní hodnocení (Obr. 2 – viz. VIII Přílohy) lze rovněž kvantifikovat měřením na spektrofotometru pro mikrotitrační destičky při 820 nm. U vzorků, které by byly mimo rozsah kalibrační křivky se upraví množství pipetovaného extraktu.

Možným úskalím této jednoduché, a jak prokázaly prezentované výsledky i poměrně účinné metody, je možnost získání "pozitivně falešných" výsledků v případech, kdy je v zrně enormně vysoký obsah fosforu. Aby se zabránilo této chybě je vhodné si na začátku testace provést KT u rodičovských forem a porovnávat opět výsledky vzorků obilovin, vypěstovaných v jednom ročníku na stejné lokalitě a za použití shodné pěstební technologie.

c) Molekulární analýzy lpa mutantů a jejich potomstev

Na základě dostupných literárních údajů byly postupně ověřovány molekulární markery, jejichž využití se jeví jako vhodné pro detekci polymorfismu v populacích kříženců s donory sníženého obsahu PA. V analogii s výsledky získanými u kukuřice a sóji (Raboy *et al.* 2000; Hegeman *et al.* 2001) byly první markery navrženy pro očekávanou vazbu s genem kódujícím enzym D-myo-inositol-3-monofosfát syntázu (MIPS), případně kinázu a další enzymy v biosyntetické dráze myoinozitolu a fytátu.

Další vývoj byl zaměřen na molekulární markery, u kterých byla ověřována specifickánost pro jednotlivé mutanty s odlišnou determinací lpa charakteru .

Podstata metody

SSR (Simple Sequence Repeats) neboli mikrosatelitní markery

Jsou to jednoduché repetitivní sekvence s častým výskytem v genomu, obvykle v nekódujících oblastech. Mikrosatelity jsou kodominantní, vysoce polymorfní, jejich analýza je rychlá a jednoduchá. Pro detekci polymorfismu mezi lpa donory a rodičovskými odrůdami bylo použito 22 mikrosatelitních markerů, získaných ze SCRI databáze a vyvinutých ve VÚRV, v.v.i. Praha-Ruzyně, které specifikovaly lokusy SSR (Vaculová *et al.* 2003).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker

Tyto markery jsou odvozené z RAPD markerů naklonováním a osekvenováním nespecifických fragmentů. Pro detekci polymorfismu byl použit kodominantní SCAR marker ABC153, který je ve vzdálenosti ~15 cM od lokusu *lpa1-1* (Roslinsky *et al.*, 2007).

Odběr a úprava vzorků

Odběr vzorků ječmene k provedení molekulárních analýz lze provádět různými postupy, osvědčily se následující způsoby:

a) Obilky vybraných odrůd a linií ječmene se vysejí na klíčiďla. Po 10 dnech od počátku klíčení jsou odebírány vzorky listových segmentů na izolaci DNA. Je vhodné z každé odrůdy odebrat nejméně 3 vzorky, přičemž dva vzorky jsou vždy odebrány z jednotlivých rostlin a třetí vzorek je připraven smícháním listových segmentů z více rostlin z každé odrůdy, aby mohla být ověřena homogenita dané odrůdy.

b) Odběr listových segmentů lze provádět rovněž na intaktních rostlinách v polních (skleníkových) podmínkách se zamrazením odebraných vzorků v tekutém dusíku a s jejich umístěním v hlubokomrazícím boxu (-85 °C) až do izolace DNA. Pro další využití (sklizeň) testovaných rostlin je nezbytné rostliny již v průběhu odběru vzorků dobře označit (jmenovky s popisem, který vydrží extrémní změny počasí).

Pro oba dva výše popsané postupy aplikace molekulárních markerů byla DNA ze vzorků extrahována pomocí DNeasy plant mini kitu (Qiagen). Koncentrace a kvalita DNA byla analyzována na 1% agarózovém gelu porovnáním s hmotnostním markérem λ /HindIII.

Pracovní postup

Analýza mikrosatelitů:

Protokol PCR (Polymerase Chain Reaction) reakce byl upraven. Každá reakce obsahovala 100ng DNA, 1U Promega Taq polymerase a 1x corresponding buffer, 100 μ M dNTP (Gibco BRL), 1-3 mM Mg⁺⁺ (Promega), 6,25pmol obou primerů (Applied Biosystems), přičemž

forward primery byly fluorescenčně značeny. PCR produkty byly separovány a detekovány pomocí metody kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). TAMRA-500 (Applied Biosystems) byl použit jako vnitřní velikostní standard.

Aplikace SCAR markeru ABC153:

Pro detekci polymorfismu byly na základě výsledků publikovaných kolektivem autorů Roslinsky *et al.* (2007) navrženy primery (5´-3´):

ABC153F – TTCATCATCATCGTCATCGTG

ABC153R – CCTCTGCCGCTGGA ACTA

PCR amplifikace markeru ABC153 byla prováděna v objemu 20 µl na vzorek s finálními koncentracemi: 50 ng DNA, 1x Taq pufr, 400 µM dNTPs, 0,2 µM forward primer, 0,2 µM reverse primer, 2 mM Mg²⁺, 1 U Taq polymerázy (Fermentas) s doplněním H₂O do objemu 20 µl.

Chemikálie (v µl): Taq pufr (10x) – 2, dNTPs (10 mM) – 0,8, primer F (10 µM) – 0,4, primer R (10 µM) – 0,4, Mg²⁺ pufr (25 mM) – 1,6, Taq polymeráza (1 U/µl) – 1, H₂O – 11,8, DNA – 2.

PCR cyklus byl následující: 94°C ... 5 min; 94°C ... 30 s; 55°C ... 45 s (37x); 72°C ... 45 s; 72°C ... 5 min.

PCR produkty byly naneseny na 1,5% agarózový gel (1,05 g agarózy, 70 ml 1x TAE pufru, 2 µl GelRed) a separovány 1 h při napětí 90 V.

Vyhodnocení experimentálních dat

Vyhodnocení délkového polymorfismu s využitím vybraných SSR markerů (Tab. 6) ukázalo, že řada vybraných mikrosatelitních markerů generuje PCR produkty s podobnou délkou, ale že lze mezi nimi vybrat takové, kdy jsou zřejmé rozdíly mezi lpa mutanty a dalšími hodnocenými odrůdami. Jako nejvhodnější se jevil marker Bmac0316 (Obr. 3 – viz. VIII Přílohy), který je možné použít pro výběr vhodných kříženců v raných štěpících generacích.

Aplikace SCAR markeru ABC153 ve zvoleném souboru genotypů ječmene jarního (Obr. 4 – viz. VIII Přílohy) potvrdila existenci polymorfismu mezi výchozími lpa donory a odrůdami Margit a Ohara. Ve štěpící F2 populaci se amplifikovaly PCR produkty 310 a 340 bp u materiálů s očekávaným lpa genotypem, zatímco u linií se standardním obsahem fytátu a heterozygotů byl detekován pouze produkt 340 bp (Obr. 5 – viz. VIII Přílohy). Rovněž hodnocení výsledků štěpení pomocí kritéria χ^2 ($\chi^2=1,86$; $P=0,19$) nevyvrátilo nulovou hypotézu, takže výsledky štěpného poměru (3 A₋: 1 aa = lpa) lze považovat za potvrzené.

Tab. 6

Délkový polymorfismu alel mikrosatelitních úseků u lpa mutantů a vybraných pluchatých odrůd jarního ječmene.

Microsatelit	Chromozom	M422	M635	M1070	M955	Ohara	Selecta	Margit
		bp ¹⁾						
Waxy04	7H	170	170	170	170	174	174	174
HVBKASI	2H	198	198	198	198	176	197	176
HVM04	7H	200	200	200	200	-	-	204
Bmac0316	6H	144	164	164	164	157	135	160
Bmag0225	3H	143	143	143	143	152	135	160

¹⁾ - délka PCR produktu mikrosatelitního markeru v párech bazí.

Zdroj: Vaculová *et al.* (2003)

Přednosti a úskalí metody, možnosti rozšíření

Výhodou použití mikrosatelitních markerů je jejich kodominance, která umožňuje sledovat výskyt rodičovských alel v potomstvu a cíleně selektovat perspektivní materiály. V případě rodičovských forem s délkově odlišnými PCR produkty tak lze vybrat hybridy, které generují stejné produkty jako lpa donor. Obdobné výsledky lze získat i při selekci s využitím SCAR markeru ABC153. V obou případech se ale nejedná o markery v těsné vazbě s lpa lokusem, takže výběr nezaručuje, že selektované materiály budou mít, shodně jako lpa rodičovský donor, i snížený obsah PA v zrně. Ani v případě markeru ABC153, který byl detekován ve vzdálenosti ~15 cM od lokusu *lpa1-1* (Roslinsky *et al.*, 2007), neprokázalo další porovnání s výsledky získanými pomocí KT dobrou shodu s obsahem volného fosforu v zrně (pouze ve cca 30% případech - Vaculová *et al.* 2012). Dosažené výsledky tedy indikují potřebu následného ověření vybraných hybridních genotypů chemickými metodami a to snižuje efektivnost použití molekulárních markerů.

Současná úroveň poznání principů tvorby a kumulace kyseliny fytové a meziproductů jejího metabolismu prozatím neumožňuje přesně lokalizovat změny, které u vytvořených mutantů vedou ke snížení obsahu PA a zvýšení tvorby využitelného fosfátu. Pokud tedy nebudou k dispozici molekulární markery, které by byly ve vazbě nebo alespoň dostatečně blízko detekovaným lpa lokusům, nelze selekci kříženců se sníženým obsahem PA (resp. zvýšeným obsahem Pi) za využití molekulárních markerů považovat za dostatečně účinnou.

II.2.1.2. Studium, hodnocení a výběr genotypů ječmene s diferencovaným obsahem neškrobových polysacharidů

Vysoký obsah neškrobových polysacharidů (NSP) v porovnání s pšenicí i dalšími obilninami je zřejmě jedním z primárních důvodů pro renesanci přímého využití zrna ječmene ve výživě lidí. Třebaže se tato problematika dotýká všech užitných směrů šlechtění ječmene, byl požadavek na vyšší hladiny obsahu NSP (konkrétně BG) v zrně bezpluchého ječmene pro potravinářské využití formulován v normativní podobě teprve v roce 2010 (Mezuliáník *et al.* 2010).

Podstata metody

Analýza obsahu BG a arabinoxylanů v zrně ječmene byla provedena aplikací standardních metod, používaných pro hodnocení sladovnických surovin (ČSN 56 0187-1, 2011).

Pro stanovení vysokomolekulárních BG byla použita metoda založená na vzniku komplexu β -glukanů s fluorescenčním barvivem Fluorochrom Calcofluor White M2R New, jenž se projevím zvýšením fluorescenční intenzity tohoto barviva.

Pro stanovení obsahu arabinoxylanů byla vyvinuta spektrofotometrická metoda podle Douglase (1981). Metoda je založena na hydrolyze arabinoxylanů na jejich odpovídající pentosové sacharidy, které potom reagují s fluoriglucinem.

Pracovní postup

Analýza obsahu beta-glukanů v zrně

β -glukany se ze vzorku extrahují kyselou hydrolyzou pomocí kyseliny sírové. K měření fluorescence a kvantifikaci je použita technika průtokové injekční analýzy (Jørgensen a Aastrup 1988; Jørgensen 1988; Navarro *et al.*, 1995; - Flow-injection analysis, FIA). Vzorek je vstříkovan do tekoucího nosného proudu pufru a činidla. Při průtoku kapilárou je rozptýlen v nosném proudu činidel a vytváří koncentrační gradient. Reakční produkt je potom kvantitativně měřen fluorescenčním detektorem.

Analýza obsahu pentozanů (arabinoxylanů) v zrně

Vodný roztok ječné mouky se vaří 25 minut ve vodní lázni s kyselým reakčním činidlem. Reakční činidlo sestává z koncentrované kyseliny chlorovodíkové, ledové kyseliny octové, roztoku fluoroglucinu a roztoku glukózy. Vzniká červenooranžové zbarvení, jehož absorbance se po ochlazení roztoku změní spektrofotometricky při dvou vlnových

délkách, $\lambda = 552$ a $\lambda = 510$ nm. Výhodou metody je její jednoduchost, dobrá reprodukovatelnost a nenáročnost na instrumentaci.

Vyhodnocení experimentálních dat

Hodnocení nových linií ječmene jarního s odlišným typem zrna (pluchaté vs. bezpluché) a škrobu (standardní vs. waxy, t.j. se sníženým podílem polysacharidu amyulózy) prokázalo, že v závislosti na typu zrna se studované materiály ječmene vysoce významně lišily obsahem sledovaných NSP, přičemž bezpluché měly více BG a pluchaté více pentozanů. Materiály s waxy typem škrobu, bez ohledu na typ pluchatosti, měly průkazně vyšší obsah BG a nižší obsah pentozanů (Tab. 7).

Tab. 7

Průměr a variabilita obsahu neškrobových polysacharidů v zrně nových materiálů ječmene s různým typem obilky a škrobu

Skupina / ukazatel	N	β -glukany (g.kg ⁻¹)					arabinoxylany (g.kg ⁻¹)				
		min.	max.	průměr	s_x	V, %	min.	max.	průměr	s_x	V, %
typ obilky											
bezpluchá	197	26	117	61	1.2	26.5	35.3	97.4	53.3	0.9	22.9
pluchatá	55	37	85.2	54.1	1.8	24.3	42.5	82.3	60.3	1.1	13.6
typ škrobu											
standardní	146	26	76.4	50	0.9	21.8	37.5	97.4	56.8	1.1	22.4
waxy ¹⁾	106	49	117	72.5	1.3	16.1	35.3	86.9	52.2	1	19

¹⁾ - waxy typ škrobu se změněným poměrem polysacharidů amylóza/amylopektin

Přednosti a úskalí metody, možnosti rozšíření

Hodnocení obsahu NSP výše popsány metodami je ověřené dostatečným počtem analýz, které byly provedeny v zrně a dalších produktech ze zrna ječmene a proto lze uvedené metody hodnocení ječmene doporučit.

V souvislosti s řadou údajů referujících o souběžném výskytu zvýšeného obsahu BG a změněného typu škrobu (waxy škrob se sníženým nebo prakticky nulovým obsahem polysacharidu amyulózy a naopak vysoce amyložní škrob s podílem amylózy přes 40%) lze výběr výchozích zdrojů ke šlechtění potravinářského ječmene spojit s výběrem materiálů s waxy typem škrobu. Tento postup je metodicky zpracován (Vaculová a Pouch 2008) a umožňuje díky recesivnímu charakteru tohoto znaku úspěšně provádět výběr požadovaných genotypů ve štěpící F2 generaci po křížení.

II.2.1.3. Studium a hodnocení genotypů ječmene s diferencovaným obsahem polyfenolických látek

Polyfenoly v zrna ječmene a dalších pivovarských produktech lze rozdělit do dvou velkých skupin (Čepička a Karabín 2002). Do první skupiny patří flavonoidy, které se dále dělí na flavany, anthokyany a flavonoly. Druhou skupinu tvoří fenolické kyseliny zahrnující deriváty benzoové kyseliny (salicylová kyselina, gentisová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, protocatechová kyselina, gallová kyselina, vanilová kyselina a syringová kyselina) a deriváty skořicové kyseliny (p-kumarová kyselina, kávová kyselina, ferulová kyselina a sinapová kyselina).

Ferulová kyselina a p-kumarová kyselina patří mezi hlavní vázané nízkomolekulární kyseliny v zrna ječmene. Mezi další kyseliny nalezené v ječmeni patří kyselina vanillová, sinapová a p-hydroxybenzoová, tyto však jsou zastoupeny v zrna ječmene ve velmi malých množstvích a jejich hodnoty se nacházely po mezí kvantifikace.

Podstata metody

Pro stanovení vybraných fenolických kyselin v ječmeni byla vyvinuta, optimalizována a validována nová, účinná a rychlá metoda s využitím ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) s PDA detekcí.

Pracovní postup

Nově vyvinutý a rozpracovaný pracovní postup stanovení volné a vázané kyseliny ferulové je podrobně popsán v práci autorů Běláková *et al.* (2010).

Příprava standardu a úprava vzorku

Byl připraven zásobní roztok standardu o koncentraci 100 mg.l⁻¹ ferulové kyseliny a 50 mg.l⁻¹ p-kumarové, vanilové a sinapové kyseliny v methanolu. Roztok byl uchovávan v temnu při 5 °C a je stabilní po dobu 1 týdne. Byla připravena kalibrační křivka v rozmezí 0,5-10 mg.l⁻¹ pro kyselinu ferulovou a 0,25 – 5 mg.l⁻¹ pro ostatní fenolické kyseliny.

Celkové fenolické kyseliny (kys. ferulová, kys. p-kumarová, kys. vanillová a kys. sinapová) byly ze vzorků ječmene po homogenizaci extrahovány alkalickou hydrolyzou. Volná kyselina ferulová se extrahuje pouze H₂O. Extrakt byl po úpravě pH přečištěn pomocí SPE. K 1 g pomletého vzorku bylo přidáno 30 ml destilované vody. Po homogenizaci byl vzorek hydrolyzován 30 ml 2 mol.l⁻¹ hydroxidu sodného a třepán 1 hodinu na třepačce. K extraktu bylo přidáno 5,2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a pH bylo upraveno pomocí 6 mol.l⁻¹ HCl na výslednou hodnotu pH 3. Extrakt byl doplněn destilovanou vodou na

objem 100 ml. Poté byl převeden do centrifugační zkumavky a odstředován při 4000 min⁻¹ po dobu 15 minut. 1 ml supernatantu byl přečištěn pomocí SPE extrakce. Kolonka RP-102 Resin byla před použitím kondicionována 5 ml methanolu a poté 5 ml deionizované vody. Na kolonku byl nanesen 1ml vzorku. Kolonka byla promyta 5 ml vody. Následná eluce byla provedena 1,7 ml methanolu. Přečištěný extrakt byl přefiltrován pomocí teflonového membránového filtru (0,2 µm) a převeden do vialky.

Použitá instrumentace

Byl použit kapalinový chromatograf UPLC WATERS ACQUITY WATERS 2996 s PDA detektorem.

Pro stanovení vázané vybraných fenolických kyselin v ječmeni byla separace provedena na chromatografické koloně ACQUITY UPLC BEH C18. (2,1 mm × 100 mm s velikostí částic 1,7 µm) pomocí gradientové eluce. Mobilní fáze A byla 10 mmol.l⁻¹ fosfátový pufr upravený kyselinou fosforečnou na pH 3, mobilní fáze B byl acetonitril. Separace byla provedena při 40 °C při průtoku 0,5 ml.min⁻¹. Podmínky gradientové eluce byly následující: lineární od 5 do 60% B od 0 do 0.8 min, 60% B od 2 do 2.2 min, lineární od 60 do 5% B od 2.2 do 3 min. Délka analýzy byla 5 minut.

UV detekce byla provedena při vlnové délce $\lambda = 260$ nm (kyselina vanillová) a $\lambda = 300$ nm (kyselina ferulová, kyselina p-kumarová a kyselina sinapová).

Vyhodnocení experimentálních dat

Výsledky jednotlivých validačních parametrů prokázaly odpovídající opakovatelnost i výtěžnost stanovení celkové a volné kyseliny ferulové i dalších fenolových kyselin v zrně ječmene (Tab. 8).

Naměřené hodnoty obsahu všech sledovaných fenolových kyselin v experimentálním souboru odrůd a nových linií (Tab. 9 – viz. VIII. Přílohy) poměrně silně kolísaly. Nejvyšší proměnlivost (vyjádřená variačním koeficientem V, %) byla zjištěna pro volnou kyselinu ferulovou, za ní následovala kyselina p-kumarová a nejnižší proměnlivost měly hodnoty obsahu celkové kyseliny ferulové.

Tab. 8
Hodnoty jednotlivých validačních parametrů

Fenolová kyselina	LOD (mg.kg ⁻¹)	LOQ (mg.kg ⁻¹)	Opakovatelnost (% RSD)	Výtěžnost SPE (%)
kyselina ferulová (volná)	0.3	1	<5.0	80 - 90
kyselina vanillová	4.2	15	<8.0	80 - 90
kyselina p-kumarová	3.1	11.2	<8.0	80 - 90
kyselina sinapová	7	24	<8.0	80 - 90

Průměrný obsah celkové kyseliny ferulové kolísal od 346,3 mg.kg⁻¹ po 1285,7 mg.kg⁻¹, volné kyseliny ferulové od 1,0 mg.kg⁻¹ po 19,1 mg.kg⁻¹ a kyseliny p-kumarové od 16,3 mg.kg⁻¹ po 247,5 mg.kg⁻¹. Pluchatý ječmen vykazoval vyšší hodnoty obsahu všech fenolových kyselin v porovnání s bezpluchými genotypy. Také odrůdy se standardním typem škrobu měly neprůkazně více obou forem kyseliny ferulové a statisticky významně vyšší obsah kyseliny p-kumarové oproti ječmeni s waxy typem škrobu.

Přednosti a úskalí metody, možnosti rozšíření

Rozpracovaná a validovaná metoda analýzy vybraných fenolových kyselin pomocí UPLC s PDA detekcí umožňuje stanovit pouze dílčí spektrum polyfenolických látek v zrně ječmene. Pokud se předpokládá další uplatnění nově vytvořených homogenních a vyrovnaných linií v procesu šlechtění odrůd nesladovnického typu, je vhodné tyto výsledky doplnit o podrobnější analýzu celkové antioxidační kapacity.

II.2.2. Doporučení pro uživatele

Výše uvedené hodnocení nutričně významných ukazatelů lze rozšířit o další specifické a také standardní chemické analýzy, které doplní komplexní obraz o chemickém složení zrna. Některé ze sledovaných i standardních parametrů kvality zrna je možné hodnotit fyzikálně-chemickými screeningovými metodami s využitím měření FT-IR a FT-NIR spekter.

Selekci lze doplnit o hodnocení morfologických znaků a charakteristik obilky, které mohou být jedním z prvních výběrových kvalitativních kritérií i v procesu prebreedingu ječmene pro nesladovnické využití.

II.2.2.1. Další chemické analýzy

Stanovení obsahu isomerů vitamínu E (tokolů)

V rámci látek, které se nacházejí v zrně obilovin a mají pozitivní antioxidační účinek na organismus zvířete i člověka, je důležitý obsah dalších nutrientů, z nichž je zapotřebí uvést především vitamín E a jeho jednotlivé izomery (alfa, beta, gama, delta-tokoferoly a alfa, beta, gama, delta-tokotrienoly). Zrna obilovin (a zejména ječmene) jsou významným zdrojem vitamínu E i přesto, že nemají vysoký obsah lipidů (Zielinski *et al.* 2001; Falk *et al.* 2004). Na základě mnoha studií se ukázalo, že tokoferoly jsou obsaženy především v klíčku, zatímco tokotrienoly jsou v ostatních částech zrna. Různé zastoupení jednotlivých izomerů vitamínu E v zrně závisí také na druhu rostliny, genotypu, pěstební lokalitě a klimatu (Piironen *et al.* 1986; Peterson a Qureshi 1993; Vaculová *et al.* 2001; Cavallero *et al.* 2004; Ehrenbergerová *et al.* 2006b).

Podstata metody

Princip metody stanovení tokoferolů (T) a tokotrienolů (T3) je založen na alkalickém zmýdelnění a extrakci nezmýdelněného podílu vzorku diethyletherem, s následným stanovením metodou HPLC s fluorescenční detekcí (Prýma *et al.* 2007). Aktivita vitamínu E se vyjadřuje v mg α -tokoferol-ekvivalentu (součet jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů se zohledněním jejich biologické aktivity - McLaughlin a Weihrauch, 1979).

Vyhodnocení experimentálních dat

Vybrané odrůdy a nové linie vytvořené v průběhu řešení dané problematiky byly v letech 2009-2010 hodnoceny z hlediska aktivity vitamínu E, celkových tokolů, sumy T a T3. Průměrná aktivita vitamínu E kolísala od 6,495 mg.kg⁻¹ po 14,699 mg.kg⁻¹ a obdobné rozdíly byly detekovány i pro celkový obsah a jednotlivé skupiny jeho izomerů (Tab. 10 - viz. VIII Přílohy). Dosažené výsledky svědčí o tom, že i z hlediska obsahu těchto látek s významnou antioxidační aktivitou jsou jak mezi hodnocenými odrůdami, tak zejména mezi novými genetickými zdroji statisticky významné rozdíly, které lze využít při dalším výzkumu nebo ve šlechtění odrůd, především pro potravinářské uplatnění.

Stanovení obsahu škrobu v zrně

Škrob (v %) byl stanoven polarimetrickou metodou podle Ewerse – ČSN EN ISO 10520 (1999) po hydrolyze škrobu kyselinou chlorovodíkovou. Tato norma je českou verzí evropské normy EN ISO 105520:1998.

Stanovení dusíkatých látek

Obsah dusíkatých látek (v %) byl získán přepočtem ($= \% N \times 6,25$). Obsah N byl stanoven Dumasovou metodou – akreditovaný postup podle metody ICC No. 167 a SOP-OKZ-402.

Stanovení obsahu tuku v zrně

Obsah tuku (v %) byl stanoven standardní extrakční metodou a vyjádřen v % v sušině. Pro sjednocení obsahu živin v zrně byl proveden (jako v případě dalších živin) přepočet na g.kg^{-1} . Stanovení je v souladu s ČSN 46 7092 Metody zkoušení krmiv (a dále Standard Methods of the Oils and Fats Division of the IUPAC, resp. Vyhláškou č. 222/1996 Sb. Ministerstva zemědělství)

Uvedené metodické postupy zaměřené na přirozené škodlivé látky s rozdílným nutričním účinkem lze doplnit výběrem vhodných genotypů na základě odlišných morfologických znaků a charakteristik zrna, které mohou podpořit zaměření selekce na jednotlivé kvalitativně diferencované užitné směry. Kromě výše uvedených klasických chemických metod lze pro hodnocení obsahu standardních živin i dalších látek zrna ječmene využít rovněž i nové fyzikálně-chemické nedestruktivní postupy.

II.2.2.2. Výběr na základě morfologických znaků obilky

Typ pluchatosti obilky

Podle toho, zda jsou vnější obalové vrstvy obilky přirostlé nebo se v průběhu sklizně uvolňují rozlišujeme ječmen s pluchatým nebo bezpluchým typem zrna (Obr. 6). Pluchaté zrna má většina standardních odrůd ječmene. Ječmen s bezpluchým typem obilky je rozšířen hlavně v zemích s tradičně vyšším podílem zrna využívaného k přímé lidské výživě. Bezpluchost (nebo také "nahost") obilky je znak geneticky podmíněný jednoduchým recesivním genem a proto je výběr bezpluchých kříženců možný ve štěpících populacích F_2 generace (štěpení pluchatých a bezpluchých genotypů v poměru 3 : 1) a lze jej provádět již v období dozrávání v polních (resp. jiných pěstebních) podmínkách.

V posledních zhruba dvou desetiletích se významně zvýšil zájem o odrůdy ječmene s bezpluchým zrnem (Newman a Newman 2008), které nacházejí uplatnění hlavně v potravinářství. Využití bezpluchého ječmene ve výrobě krmiv pro hospodářská zvířata je omezené bez ohledu na to, že takové genotypy mají významně vyšší energetickou a nutriční hodnotu pro hospodářská zvířata a obecně mláďata, citlivá na vysoký obsah hrubé vlákniny v krmné dávce.

Využití dalších morfologických (vnějších) znaků obilky – významných ukazatelů sladovnické jakosti zrna

Mnohé z vnějších znaků obilky doporučených jako jakostní ukazatele ve šlechtění sladovnických odrůd ječmene jsou využitelné i jako selekční kritéria při šlechtění na vyšší krmnou kvalitu zrna, především při selekci pluchatého ječmene. Jedná se o následující znaky:

- **tvar zrna**, který je odrůdovým znakem a ovlivňuje jednotnost vzorku. Obdobně jako v případě šlechtění sladovnického ječmene je žádoucí, aby bylo zrna buclatého tvaru a plné. Na rozdíl od sladovnických požadavků může být i větší než středně velké, avšak vhodné je i kratší a kulovité zrna.

- **barva pluchy** u pluchatých materiálů ječmene může hrát roli hlavně při zpracování pro výživu lidí, kde barevné změny mohou indikovat nepříznivý vliv povětrnostních a půdních podmínek nebo vyšší citlivost k napadení původci biotického charakteru. Ječmen s odlišným zabarvením obalových vrstev nebo aleuronu má často odlišný obsah některých polyfenolických látek (např. anthokyanogenů).

- **pluchatost a jemnost pluchy**. Obdobně jako v případě sladovnických odrůd je u pluchatých typů pro nesladovnické účely žádoucí nízký podíl pluch (8,5-9,5%), které mají být jemné a tenké. Na rozdíl od sladovnických požadavků nemusí být hustě příčně zvrásněné a pevně spojené s obilkou. Vhodné jsou i odrůdy s příliš tenkými pluchami, které nejsou akceptovatelné sladaři, protože se poškozuji při sklizni, třepí se a jsou příčinou slupování a výskytu nahých zrn (Obr. 7).

- **velikost a velikostní vyrovnanost zrna**. Větší zrna, vyjádřené vyšší HTZ je žádoucí; ke krmení se ale zpravidla zužitkuje pluchatý ječmen s různým podílem přepadu na síť. Vyšší podíl drobných zrn znamená horší poměr mezi jádrem a pluchami a je pokaždé spojený se zvýšeným obsahem vlákniny, což zhoršuje nejen kvalitu ječmene jako suroviny pro krmení, ale zejména pro perspektivní potravinářské zpracování. I když je hmotnost obilek do značné míry odrůdovým znakem s menší variabilitou, je ovlivněna ročníkovými i pěstebními podmínkami.

II.2.2.3. Využití screeningových a nedestruktivních metod ke stanovení vybraných živin zrna

Postup při prebreedingu genotypů ječmene s diferencovaným obsahem NSP (BG a arabinoxylanů) lze výrazně urychlit aplikací dvou spektroskopických metod (FT-IR a FT-NIR) ve spojení s kvantitativním a kvalitativním vyhodnocením pomocí vhodných biometrických a statistických metod (HCA, PCA a PLS). Podrobný popis postupu měření

FT-IR a FT-NIR vibračních spekter vzorků zrna na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (ThermoScientific, USA) popisuje certifikovaná metodika s názvem "Metodika třídění a výběru ječmene s odlišným obsahem neškrobových polysacharidů využitím FT-IR a FT-NIR" (Synytsya *et al.* 2010). Vibrační spektra jsou velmi citlivá na rozdíly v chemickém složení způsobené genetickou odlišností ječmene. Obě metody (FT-IR a FT-NIR) se navzájem doplňují a jejich kombinací lze lépe roztrždit soubory vzorků zrna dle složení.

II.2.2.4. Využití nově vytvořených genetických donorů v dalším šlechtitelském procesu

Popsané metody stanovení a následného výběru materiálů ječmene s různou hladinou přirozených škodlivých látek s nutričně ambivalentní povahou, resp. i zvýšeným obsahem dalších látek vhodných pro výživu lidí a hospodářských zvířat (zejména vitaminů s antioxidačním působením) lze použít při hodnocení potomstev získaných nejen na základě klasických šlechtitelských metod a jejich modifikací, ale i vytvořených použitím nejrůznějších mutačních způsobů šlechtění nebo moderních genetických metod (MMAS, t.j. šlechtění za využití molekulárních markerů nebo i postupů na bázi genového inženýrství). Výše shrnuté metody a postupy umožní současně směřovat výběr jak na materiály s nízkým, tak i vysokým obsahem přirozených škodlivých látek, případně kombinací více sledovaných látek a morfologických charakteristik zrna a tím zefektivnit celý proces tvorby nových odrůd ječmene. Kromě křížení s původními donory diferencovaného obsahu přirozených škodlivých látek lze doporučit využití rozpracovaných nových genetických zdrojů, které byly jako výstup jednotlivých etap řešení této problematiky předány do světové kolekce genetických zdrojů ječmene jarního při Genové bance (VÚRV, v.v.i., Praha-Ruzyně), vedené v Zemědělském výzkumném ústavu Kroměříž, s.r.o., a jsou pro potenciální uživatele volně k dispozici.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika je první publikací, ve které jsou shrnuty postupy zaměřené na prebreeding nových genetických zdrojů se záměrem využít snížený, resp. zvýšený obsah přirozených škodlivých látek, jež díky své ambivalentní nutriční roli mohou měnit předpokládané uplatnění těchto donorů ve šlechtění ječmene pro nesladovnické účely. Jedná se rovněž o metodiku, která je založena na využití klasických šlechtitelských a standardních

chemických, případně i jednoduchých screeningových metod. Toto z ní vytváří návod na další výzkum, studium a následné šlechtění běžných odrůd ječmene, jejichž využitelnost je směřována nejen do konvenčního, ale i ekologického zemědělství.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla dílčím způsobem uplatněna již v průběhu tvorby nových odrůd ječmene jarního pro nesladovnické (zejména potravinářské, ale i krmné užití), registrovaných k pěstování v ČR, resp. testovaných v registračních pokusech ÚKZÚZ (AF Lucius, KM 2084). Dále byly nové genetické zdroje s bezpluchým zrnem a waxy typem škrobu (se zvýšeným obsahem beta-glukanů) předány jako výchozí donory do kolekce ječmene jarního, vedené při Genové bance (VÚRV, v.v.i., Praha-Ruzyně). Uplatnění bylo realizováno v ČR zejména v Zemědělském výzkumném ústavu Kroměříž, s.r.o.

Dílčí materiály ječmene jarního se sníženým obsahem hrubé vlákniny byly na žádost mnohých zahraničních pracovníků předány k realizaci výzkumných projektů, doktorských disertačních prací i pro prakticky orientovaný výzkum, resp. šlechtění, směřované ke zvýšení podílu ječmene v potravinářství (ŠS Hordeum, Sládkovičovo; SAATBAU LINZ; BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna a další).

Jednotlivé rozpracované metody, uvedené v předložené metodice, byly a jsou součástí přípravy materiálů ječmene pro řešení řady výzkumných projektů poskytovatelů MZe ČR a MŠMT ČR.

Metodika je určena široké výzkumné a vědecké veřejnosti. Dílčí postupy a metody mohou využít jak šlechtitelé ječmene nebo i dalších obilnin, tak pracovníci zabývající se studiem a hodnocením nutričního složení zrna obilnin. Metodika se uplatní i při výuce na specializovaných středních školách a zemědělských univerzitách.

Metodika bude přístupná na webové stránce: www.vukrom.cz.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomická efektivnost využití dané metodiky je obsažena v souhrnu postupů které směřují uživatele k účinnému výběru nových výchozích materiálů ječmene (prebreeding), využitelných pro další tvorbu ječmene nesladovnického typu. Předpokládané ekonomické přínosy dané metodiky lze spatřovat v úspoře nákladů při výběru a hodnocení genotypů a

hybridních materiálů ječmene (a obecně i dalších obilovin) s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek, jejichž nutriční, sensorický nebo jinak technologicky důležitý účinek je významný pro rozdílné směry šlechtění a tvorby ječmene nesladovnického typu (krmné nebo perspektivní přímé potravinářské uplatnění produkce). Aplikace vybraných screeningových metod nevyžaduje vysoké vstupní náklady a umožní cíleně vést tvorbu nových materiálů ječmene od počátečních etap křížení přes výběr vhodných linií až k plánovaným cílům jejich konečného uplatnění. S využitím uvedených metodických postupů lze selektovat genotypy s krajními hodnotami obsahu přirozených škodlivých látek již v raných generacích po křížení a vyloučit tak nutričně nevhodné materiály bez nutnosti jejich opětovného přesévání a zkoušení.

Doporučený postup představuje úsporu v podobě cca 1/5 původních nákladů na šlechtění jedné odrůdy (dle kvalifikovaného odhadu může tvořit taková úspora nákladů až 150 tis. Kč ročně).

Úsporu přinese i využití jednotlivých metod, zejména screeningové kolorimetrické metody stanovení obsahu volného fosforu v zrně. Vstupní náklady činí cca 50 Kč/vzorek (včetně pracovních nákladů od 25 a více vzorků), zatímco cena chemické analýzy obsahu PA a Pi je cca 1000 Kč. Aplikací této metody lze získat ekvivalentní výsledky a provádět selekci materiálů se zvýšeným (popř. odlišným) obsahem fosforu až 20 krát levněji v porovnání s klasickým postupem.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Álvarez P., Alvarado C., Mathieu F., Jiménez L., la Fuente M., 2006: Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *Eur. J. Nutr.*, 45(8): 428–438.

Baidoo S.K., Liu-YG, 1998: Hull-less barley for swine: ileal and faecal digestibility of proximate nutrients, amino acids and non-starch polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 397–403.

Baik B.-K., Ullrich S.E., 2008: Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *J. Cereal Sci.*, 48: 233–242.

Bell J. M., Shires A., Keith M. O., 1983: Effect of hull and protein contents of barley on protein and energy digestibility and feeding value for pigs. *Can. J. Anim. Sci.*, 63: 201–211.

Bhatty R. S., 1992: β -Glucan content and viscosities of barleys and their roller-milled flour and bran products. *Cereal Chem.*, 69: 469–471.

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.

Bhatty R. S., Christison G. I., Sosulski F. W., Harvey B. L., Hughes G. R., and Berdahl J.D., 1974: Relationship of various physical and chemical characters to digestible energy in wheat and barley. *Can. J. Anim. Sci.* 54: 419–427.

Bhatty R.S., 1986: The potential of Hull-less Barley - A review. *Cereal Chem.*, 63(2): 97–103.

Bhatty R.S., 1995: Hull-less Barley Bran: A potential New Product From an Old Grain. *CFW*, 40(11): 819–824.

Boros D., Rek Cieply B., Cyran M., 1996: A note on the composition and nutritional value of hullless barley. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 5: 417–424.

Box A., Washington J., Eglinton J., 2005: An Economical and Healthy Food Ingredient – New Applications for Barley. 9 s. http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/47571/1/hdl_47571.pdf

Cavallero A., Gianinetti A., Finocchiaro F., Delogu G., Stanco A.M., 2004: Tocols in hull-less and hulled barley genotypes grown in contrasting environments. *Journal of Cereal Science*, 39: 175–200.

Čepička J., Karabín M., 2002: Polyphenolic compounds of beer – natural antioxidants. *Chem. Listy*, 96: 90–95.

ČSN 46 7092 Metody zkoušení krmiv, část 7, Stanovení hrubého tuku.

ČSN 56 0187-1 (560187) Metody zkoušení sladu a sladových výtažků - Část 1: Základní metody zkoušení sladu. ÚTNMSZ, Praha 2011.

ČSN EN ISO 10520 (566120) Přírodní škrob - Stanovení obsahu škrobu - Ewersova polarimetrická metoda.

Douglas S. G., 1981: A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. *Food Chemistry*, 7(2): 139 – 145.

Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Havlová P., Vaculová K., 2006a: Vlivy působící na obsah neškrobových polysacharidů v znu jarního ječmene. *Chem. Listy*, 100: 841.

Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Prýma J., Vaculová K., Newman C.W., 2006b: Effect of Cultivar, Year Grown, and Cropping System on

the Content of Tocopherols and Tocotrienols in Grains of Hulled and Hulless Barley. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(3): 145-150.

Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Havlová P., Roznovsky J., Vejrazka K., Vaculová K., 2005: Effect of weather conditions and genotype on the content of non-starch polysaccharides in spring barley breeding, pp. 25-31. In: Brandstter A., Ruckenbauer P., Raab F., Trischler A. (eds.): *Züchtung auf Anpassungsfähigkeit. Tagungband der 56. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, 22.-24. November 2005, Raumberg-Gumpenstein, 126 s.

Ehrenbergerová J., Vaculová K., Zimolka J., 1997: Jakost zrna bezpluchého jarního ječmene z odlišných způsobů pěstování, *Rostlinná Výroba*, 43(12): 585-592.

Falk J., Krahnstöver A., van der Kooij T.A.W., Schlenso M., Krupinska K., 2004: Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry*, 65: 2977-2985.

Fastnaught C.E., Berglund C.E., Holm E.T., Fox G.J., 1996: Genetic and environmental variation in beta-glucan content and quality parameters of barley for food. *Crop. Science*, 36: 941-946.

Goldammer T., 1999: *The Brewers' Handbook. The Complete Book to Brewing Beer*. Chapter 2 Barley malt. 456s.

Graf E, Eaton JW., 1993: Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer*, 19(1): 9-11.

Graman I. a kol., 1998: *Šlechtění zemědělských plodin (obiloviny a luskoviny)*. Učební texty. České Budějovice, 193 s.

Havlová P., 2001: Beta-glukany a jejich význam pro pivovarství. *Kvasný Průmysl*, 47: 174-175.

Hegeman C.E., Good L.L., Grabau E.A., 2001: Expression of D-myo-Inositol-3 Phosphate Synthase in Soybean. Implications for Phytic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 125: 1941-1948.

Chalker-Scott L., Kraemer R. L., 1989: Microscopic studies of tannin formation and distribution in plant tissues. In: Hemmingway R.W., Karchesy J.J., Brauham S.J. (eds.): *Chemistry and significance of condensed tannins*, N. Y., London, Plenum Press: 345-368.

Chen P.S., Toriba T.Y., Warner H., 1956: Microdetermination of phosphorous. *Analyt. Chemistry*, 28: 1756-1758.

Irwin A.J., Barker R.L., Pipast P., 1981: The role of copper, oxygen and polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49: 140-149.

Jørgensen K.G., 1988: Quantification of high molecular weight (1→3)(1→4)-β-D-glucan using Calcofluor complex formation and flow injection analysis. I. Analytical principle and its standardization. *Carlsberg Res. Commun.*, 53: 277-285.

Jørgensen K.G., Aastrup S., 1988: Quantification of high molecular weight (1→3)(1→4)-β-D-glucan using Calcofluor complex formation and flow injection analysis. II. Determination of total β-glucan content of barley and malt. *Carlsberg Res. Commun.* 53: 287-296.

Just A., 1982: The influence of crude fiber from cereals on the net energy value of diets for growth in pigs. *Livest. Prod. Sci.*, 9: 569-580.

Kalač P., Míka V., 1997: *Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech*. ÚZPI Praha, 1997, 316 s.

Kellner V., Mikyška A., Prokeš J., Hašková D., Čulík J., Čejka P., 2005: The influence of malt polyphenols and individual phenolic substances on beer quality, colloidal and sensory stability. *Proc. 30th Congr. Eur. Brew. Conv.*, Prague 2005, CD ROM 2005, Contr. L48.

Kolektiv 1976: *Ideotypy pšenice, ječmene a kukuřice do roku 2000*. ČZV Praha, 1976, 248 s.

Kudrna V., 2004: *Zušlechťení krmiv, podmínky jejich bezpečnosti a produkční účinnosti*. Vědecký výbor výživy zvířat.

<http://www.vuzv.cz/vyzi/va/studiel2.doc> (citováno dne 26.03.2007).

Larson S.R., Young K.A., 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: 141-146.

Lind T., Lonnerdal B., Persson L.A., Stenlund H., Tennefors C., Hernell O., 2003: Effects of weaning cereals with different phytate contents on hemoglobin, iron stores, and serum zinc: a randomized intervention in infants from 6 to 12 mo of age. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78(1): 168-175.

McLaughlin P. J., Weibrauch J. L., 1979: Vitamin E content of foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, 75: 647.

Manary M.J., Hotz C., Krebs N.F., Gibson R.S., Westcott J.E., Arnold T., Broadhead R.L., Hambidge K.M., 2000: Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *J. Nutr.*, 130(12): 2959-64.

- Marounek M., 2004: *Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat a lidí a důsledky její přítomnosti v krmivech a potravinách*. Vědecký výbor výživy zvířat, VÚŽV Praha – Uhřetěves, 31 s.
- Mayer A.M., 2006: Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21): 2318-2331.
- McMurrough I., Loughrey M.J., Hennigan G.P., 1983: Content of (+)catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 62-72.
- McMurrough I., Madigan D., Kelly R., 1996: The role of flavonoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54: 141-148.
- Mendoza C., Viteri F.E., Lonnerdal B., Young K.A., Raboy V., Brown K.H., 1998: Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68(5):1123-1127. Erratum in: *Am J Clin Nutr*, 1999 Apr, 69 (4):743.
- Miettinen T.I., Vartianinen T., Martikainen P.J., 1997: Phosphorus and Bacterial Growth in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8): 3242–3245.
- Munck L. 1985: The impact on industry of development of cereals through genetic biotechnology. Pages 287-301 in: Proc. '85 Asia Conference, Singapore.
- Navarro A., Manzanares P., Carbonell J.V., Sendra J. M., 1995: Determination of (1→3),(1→4)-β-D-glucanase activity by a calcofluor-flow injection analysis method. *J. Cereal Sci.*, 22: 275–284.
- Newman R.K., Newman C.W., 1991: Barley as a food grain. *CWF Review*, September, 36: 800-805.
- Newman R.K., Newman C.W., 2008: *Barley for Food and Health: Science, Technology, and Products*, John Wiley & Sons, Inc., 245 s.
- Newman R.K., Newman C.W., Graham H., 1989: The hypocholesterolemic function of barley beta-glucans. *Cereal Foods World*, 34 (10): 883-886.
- Oberleas D., 1989: Phytates. In: *Toxicants occurring naturally in foods*. Natl. Acad. Press, Washington, D.C.: 363-371.
- O'Dell B.L., de Boland A.R., Koirtyohann S.T., 1972: Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.*, 20: 718–721.
- Peterson D.M., Qureshi A.A., 1993: Genotype and environment effects on tocols of barley and oats. *Cereal Chemistry*, 70(2): 157-162.

- Piironen V., Syväoja E.L., Varo P., Salminen K., Koivistoinen P., 1986: Tocopherols and Tocotrienols in Finnish Foods: Vegetable, fruits, and berries. *J. Agric. Food. Chem.*, 34: 742-746.
- Prugar J. a kol., 2008: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. VÚPS, 326 s.
- Prýma J., Ehrenbergerová J., Belcrediová J., Vaculová K., 2007. Tocol content in barley. *Acta Chimica Slovenica*, 54, 1: 102-105.
- Raboy V., 1997: Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Lrkins BA, Vasil IK (eds.): *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Kluwer Publishers, The Netherlands: 441-447.
- Raboy V., Cook A., 1999: An Update on ARS Barley low phytic acid Research. *Barley Genetics Newsletter*, 29: 36-39.
- Raboy V., Gerbasi P.F., Young K.A., Stoneberg S.D., Pickett S.G., Bauman A.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.
- Rasmussen S.K., Hatzack F., 1998: Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis. *Hereditas*, 129: 107-112.
- Richard-Forget F., Gauollard F., Huges M., Jean-Marc T., Boivin P., Nicolas J., 1995: Inhibition of horse bean and germinated barley lipoxygenase by some phenolic compounds. *J. Food Sci.*, 60: 1325-1329.
- Roslinsky V., Eckstein P.E., Raboy V., Rossnagel B.G., Scoles G.J., 2007: Molecular marker development and linkage analysis in three low phytic acid barley (*Hordeum vulgare*) mutant lines. *Mol. Breeding*, 20: 323-330.
- Sekanina J., Táborská E., 2004: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* 98: 239–245.
- Svačina P., 2008: *Základy šlechtitelské práce při tvorbě odrůd jarního sladovnického ječmene*. http://www.druvod.cz/files/aktuality/slechtitelske_listy_podzim_20081.pdf
- Swanston J.S., Ellis R.P., Stark J.R.. 1995: Effects on grain and malting quality of genes altering barley starch composition. *J. Cereal Sci.*, 22: 265-273.

- Swanston J.S., Ellis R.P., Tiller S.A., 1997: Effects of the waxy and high amylose genes on total beta-glucan and extractable starch. *BGN*, 27: 72-75.
- Synytysya A., Budilová E., Čopíková J., 2010. *Metodika třídění a výběru ječmene s odlišným obsahem neškrobových polysacharidů využitím FT-IR a FT-NIR*, VŠCHT Praha, 30 s.
- Taketa S., Kikuchi S., Awayama T., Yamamoto S., Ichii M., Kawasaki S., 2004: Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). *Theor. Appl. Gen.*, 108: 1236–1242.
- Ullrich S.E., Clancy J.A., Eslick R.F., Lance R.C.M., 1986: B-glucan content and viscosity of extracts from waxy barley. *J. Cereal Sci.*, 4: 279-285.
- Vaculová K., 1992: Beta-glukany a kvalita zrna ječmene. *Úroda*, 5:209-210.
- Vaculová K., Ehrenbergerová J., Němejc R. V., Prýma J. 2001: The variability and correlations between the content of vitamin E and its isomers in hybrids of the F2 generation of spring barley. *Acta univ. agric. et silvicult. Mendel. Brun.* (Brno), 2001, XLIX, 1: 59-67.
- Vaculová K., Ehrenbergerová J., Psota V., Havlová P., Špunarová M., 2000: Variability of β -glucan in early generations of barley hybrids. *Mendel Centenary Congress*, 5. GPZ-Tagung, March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic, Poster Abstracts, Vorträge für Pflanzenzüchtung, 47, 2000: 149.
- Vaculová K., Poláková K., Polišínská I., 2003: Šlechtění obilovin na snížený obsah fytátů v zrně – alternativní cesta ke zlepšení využitelnosti fosforu (Breeding cereals for a reduced phytate content in grain – an alternative way toward improvement of phosphorus availability). *Nové poznatky z genetiky a šlachtenia pol'nohospodárskych rastlín*. Piešťany, 49-52.
- 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.
- Vyhláška č. 222/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkáze, ve znění pozdějších předpisů.

- Zielinski H., Ciska E., Kozłowska H., 2001: The Cereal Grains: Fokus on Vitamin E. *Czech Journal Food of Science*, 19: 182-188.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Běláková S., Benešová K., Mikulíková R., Svoboda R. 2010: Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí. *Kvasny Prum.*, 56(6): 266-269.
- Běláková S., Benešová K., Mikulíková R., Svoboda Z., 2010: Development of Methods for the Determination of the Selected Antioxidants in Cereals. *Abstract Book of 10th International Nutrition & Diagnostics Conference*. s. 94.
- Lhotáková E., Kvasnička F., Vaculová K., Čopíková J., Synytysya A., Voldřich M., 2010: Discrimination of barley varieties by spectroscopic and statistical methods. *Proceeding of the 6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, Prague, Czech Republic, 29.09.–1.10.2010: 135-138.
- Lhotáková E., Synytysya A., Ševčík R., Kvasnička F., Čopíková J., Voldřich M., 2010: Třídění ječmenů pomocí vibrační spektroskopie a multivariační analýzy. *Bezpečnost a kvalita surovin a potravin*, Nitra, 3.-4.2.2010. *Potravinářstvo*, 4(mim. č.): 52–56.
- Mezuliáník M., Vaculová K., Milotová J., 2010: *Obiloviny - Část 3: Ječmen. ČSN 46 1200-3 ZMĚNA ZI. Česká technická norma. ICS 67.060*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví Praha, červen 2010, 2s.
- Synytysya A., Budilová E., Čopíková J., 2010: *Metodika třídění a výběru ječmene s odlišným obsahem neškrobových polysacharidů využitím FT-IR a FT-NIR*, VŠCHT Praha, 2010, 30s.
- Synytysya A., Lhotáková E., Synytysya A., Čopíková J., Ševčík R., Kvasnička F., Voldřich M., 2010: Analýza a třídění ječmenů pomocí spektroskopických metod a stanovení barvy. *XL. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin*. Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 3. – 5. 5.2010.
- Vaculová K., Poláková K., Polišínská I., 2003: Šlechtění obilovin na snížený obsah fytátů v zrně – alternativní cesta ke zlepšení využitelnosti

fosforu, s. 49-52. In: *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin*. Piešťany, 26-27 Nov. 2003, 185s.

Vaculová K., Balounová M., Ehrenbergerová J., 2010: Effect of genotype on variability in the content of non-starch polysaccharides in barley grain. *Proceedings of the 6th International Conference on Polysaccharides - Glycoscience*, 29th September - 1st October 2010, Prague, s. 214-217.

Vaculová K., Balounová M., Milotová J., 2010: Prebreeding výchozích materiálů ječmene jarního s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek v zrně pro šlechtění odrůd nesladovnického typu. *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin: Zborník zo 17. vedeckej konferencie Piešťany 26.-27. október 2010*, s. 175-178.

Vaculová K., Balounová M., Milotová J., 2010: Výsledky pěstování bezpluchého ječmene v diferencovaných oblastech České republiky. *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo: Zborník abstraktov zo 6. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou 26.-27.mája 2010*, s. 101-105.

Vaculová K., Rysová J., Balounová M., Sedláčková I., Bradová J., 2010: New barley genotypes for production of milk substitutes. *Proceedings of the 5th International Congress Flour-Bead '09, 7th Croatian Congress of Cereals Technologists: Opatija*, October 21-23, 2009, s. 600-607.

Vaculová K., Balounová M., Kvasnička F., Sedláčková I., Ehrenbergerová J., Václavíková E., Pouch M., 2012: Variabilita obsahu kyseliny fytové v zrně ječmene. *Kvasný průmysl* (v tisku)

VIII. PŘÍLOHY

Tab. 2

Průměrné hodnoty a průkaznost obsahu kyseliny fytové a fosfátu v zrně vybraných materiálů ječmene (Kroměříž, 2001-2003)

Odrůdy, linie / ukazatel	Typ zrna	Specif. ¹⁾	kys. fytové (PA), mg.g ⁻¹			fosfát (Pi), mg.g ⁻¹		
			průměr	s _x	HS ²⁾	průměr	s _x	HS
CDC Candle	bezpluché	waxy	5.71	1.80	bcd	1.98	0.71	ab
HB803	bezpluché	waxy	8.46	2.73	efg	2.82	0.85	ab
Merlin ³⁾	bezpluché	waxy	8.18	5.48	defg	0.82	0.58	a
KM1057	bezpluché	stand.	8.14	3.09	defg	1.78	0.54	ab
KM1910	bezpluché	stand.	7.51	2.43	defg	2.34	0.64	ab
KM2037	bezpluché	stand.	9.84	2.80	f	2.35	1.05	ab
KM2283	bezpluché	stand.	7.40	3.72	defg	2.02	0.63	ab
No94609D7 ³⁾	pluchaté	stand.	3.70	0.20	abc	2.90	0.80	ab
Nordus	pluchaté	stand.	6.34	2.55	bcde	1.99	0.88	ab
Jersey	pluchaté	stand.	6.19	1.77	bcde	1.30	0.53	ab
Pax	pluchaté	stand.	5.70	2.61	bcd	2.10	1.04	ab
Prestige ³⁾	pluchaté	stand.	8.20	3.90	defg	1.44	1.26	ab
Sabel	pluchaté	stand.	6.26	2.70	bcde	2.96	1.40	b
Thuringia	pluchaté	stand.	6.30	3.06	bcde	1.76	0.60	ab
Tolar	pluchaté	stand.	7.11	2.15	deg	2.04	0.67	ab
Margit	pluchaté	stand.	6.41	2.43	bcde	2.14	0.90	ab
Ohara ³⁾	pluchaté	stand.	10.03	3.13	fg	2.18	1.22	ab
Selecta	pluchaté	stand.	6.45	3.07	cde	2.71	1.29	ab
Harrington	pluchaté	stand.	7.30	1.91	defg	2.08	0.52	ab
M422	pluchaté	lpa	3.75	1.47	ab	5.19	1.24	c
M1070	pluchaté	lpa	2.93	1.60	a	5.27	0.29	c
M635	pluchaté	lpa	2.76	1.22	a	7.93	0.35	d
M955	pluchaté	lpa	1.12	0.12	a	8.67	1.38	d

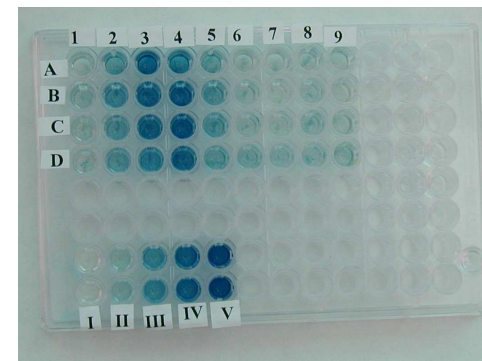
1) - standardní a lpa materiály; 2) - homogenní skupiny označené ve sloupci různými písmeny, se průkazně liší při P_{0,05}; 3) - výsledky pouze ze 2 let

Tab. 3

Východní donory a nové linie ječmene jarního s rozdílným obsahem kyseliny fytové a fosfátu v zrně

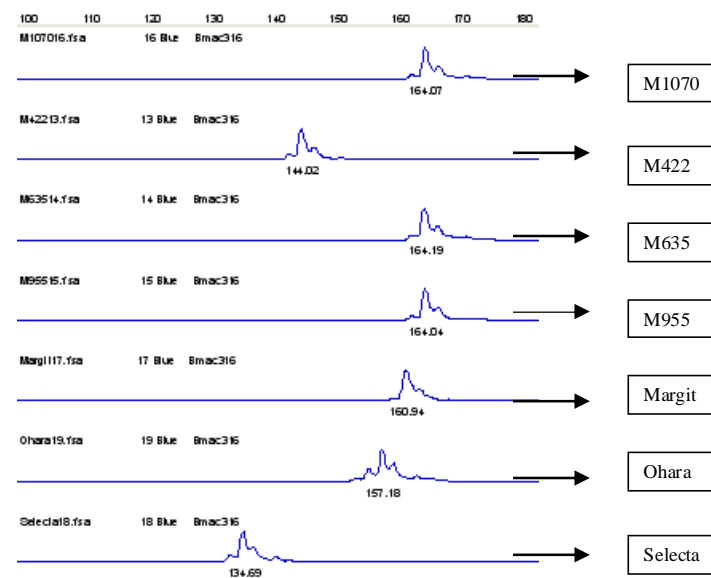
Označení kombinace, lpa donora / ukazatel	pedigree	typ zrna ¹⁾	kys. fytová KT ²⁾	fosfát		podíl, % ³⁾	celkový obsah P v % ⁴⁾	
				(PA)	(Pi)			
				mg.g ⁻¹	PA			Pi
M422	M422	pl	4.5	4.00	1.71	67.6	32.4	78.2
M635	M635	pl	5	3.58	3.67	46.5	53.5	101.9
KM2640.411.2.1	No94609D7/CDC Candle	n	2.5	9.71	0.65	93.1	6.9	138.0
KM2645.412.6.1	Nordus/CDC Candle	n	3.5	9.23	0.59	93.3	6.7	130.9
KM2881.622.2.07	KM2645.412.6.1/M635	nw	>5	2.82	3.83	39.6	60.4	94.2
KM2715.645.4.07	Barke/M635	pl	>5	3.24	3.81	43.1	56.9	99.4
KM2666.644.05	KM2311/M635	pl	2.5	9.44	1.06	88.8	11.2	140.6
KM2666.542.4.08	KM2311/M635	pl	>5	2.93	3.56	42.3	57.7	91.5
KM2742.154.09	M1070/Prestige	pl	3.5	4.51	3.01	57.2	42.8	104.3
KM2693.583.2.07	M422/KM2283	n	3.5	5.97	1.53	77.7	22.3	101.7
KM2693.390.1.5.03	M422/KM2283	n	4	4.04	2.14	62.8	37.2	85.2
KM2693.88.6.08	M422/KM2283	n	4	7.30	1.41	82.2	17.8	117.5
KM2693.88.12.08	M422/KM2283	n	3	3.79	1.62	67.5	32.5	74.2
KM2693.568.09	M422/KM2283	n	3	4.14	1.27	74.4	25.6	73.7
KM2693.569.09	M422/KM2283	n	3	2.87	1.33	65.9	34.1	57.8
KM2691.24.1.08	M422/KM2311	pl	3.5	4.36	1.57	71.1	28.9	81.0
KM2691.290.1.05	M422/KM2311	pl	5	3.71	1.69	66.2	33.8	74.1
KM2691.289.2.05	M422/KM2311	pl	4	4.16	1.75	67.9	32.1	81.1
KM2911.623.2.07	M422/KM2640.411.2.1	nw	4	4.27	2.38	61.5	38.5	91.7
KM2911.623.5.07	M422/KM2640.411.2.1	nw	4	4.04	1.75	67.3	32.7	79.4
KM2693.19.2.08	M635/KM2283	n	2.5	9.25	0.65	92.6	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	46.1	134.6
KM2842.348.09	M635/Margit	pl	4	3.74	1.33	71.5	28.5	69.1
KM2842.697.09	M635/Margit	pl	>5	7.99	0.87	89.1	10.9	118.6
KM2912.510.08	M635/Ohara	pl	3.5	6.88	0.68	90.0	10.0	101.1
KM2845.174.05	M635/Prestige	pl	4	6.60	1.17	83.4	16.6	104.7

¹⁾ - n = bezpluchý, pl - pluchatý typ obilky, w = waxy typ škrobu; ²⁾ - bodová hodnota obsahu volného fosforu v zrně, stanovená kolorimetrickou metodou, ³⁾ - podíl PA a Pi na sumárním poolu P v zrně, stanovený přepočtem na molární hmotnost, ⁴⁾ - celkový obsah P v zrně v % k průměru souboru



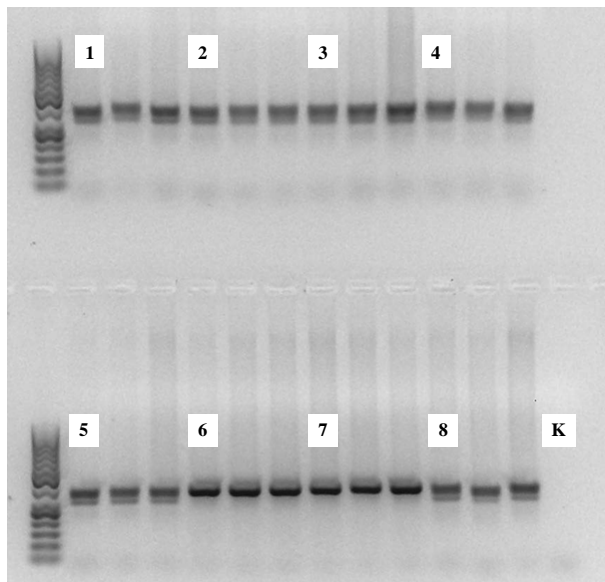
Obr. 2

Výsledky hodnocení obsahu volného fosforu v zrně vybraných materiálů ječmene pomocí screeningového kolorimetrického testu

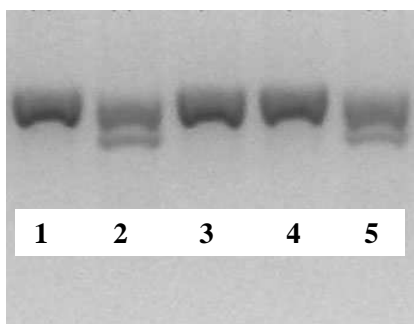


Obr. 3

Elektroforetogram získaný po separaci PCR produktů mikrosatelitu Bmac0316 v prostředí kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 310.



Obr. 4
Variabilita markeru ABC153 v souboru rodičovských genotypů. (1–Harrington, 2–M422, 3–M635, 4–M955, 5–M1070, 6–Margit, 7–Ohara, 8–Selecta)
Zdroj: Vaculová *et al.* (2012)



Obr. 5
Identifikace genotypu rostlin F2 generace z křížení odrůd Clearwater (1pa) a Streif prostřednictvím markeru ABC153. Vzorky 2 a 5 mají genotyp odpovídající odrůdě Clearwater (310 a 340 bp).
Zdroj: Vaculová *et al.* (2012)

Tab. 9

Průměr a variabilita obsahu nejvýznamnějších fenolových kyselin v zrně vybraných odrůd a nových linií

Odrůda, linie / ukazatel	N	celková kys. ferulová (mg.kg ⁻¹)		volná kys. ferulová (mg.kg ⁻¹)		kys. kumarová (mg.kg ⁻¹)	
		průměr	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x
		Abyssinian 1139	4	835.7	56.1	4.3	0.3
KM1057-1906.223.1.05	4	1142.8	59.8	9.5	1.4	93.6	21.5
KM1910-2	4	735.4	24.4	4.9	0.8	73.0	16.5
KM2084-2	4	759.5	23.2	4.7	0.9	57.4	8.2
KM2283-1	4	686.6	116.8	4.8	1.3	56.4	14.2
KM2454.439.99	4	894.3	35.6	5.1	1.1	67.8	12.2
KM2454.439.99.496.4.02-1	4	1004.8	40.8	9.2	2.2	110.6	25.4
KM2454.439.99.496.4.02-2	4	696.1	60.6	6.1	1.8	51.8	8.6
KM2619.413.4.03	4	710.3	29.4	5.1	1.0	51.1	10.3
KM2620.352.9.03	4	610.5	36.3	3.8	1.1	33.1	3.1
KM2642.416.5.03	4	738.0	56.9	5.3	1.0	39.3	6.1
KM2645.355.1.03	4	625.0	29.8	3.5	0.7	42.8	5.8
KM2645.412.1.1.1.03-1	4	677.1	49.9	5.8	1.1	37.2	10.2
KM2666.644.05	4	987.1	75.7	6.7	1.6	144.8	34.1
KM2842.537.08	4	822.3	36.5	9.5	1.8	94.9	5.8
KM2881.541.08	4	662.5	60.8	4.6	0.6	50.9	5.8
KM2912.510.08	4	806.2	85.7	8.2	2.4	87.4	10.5
Wanubet	4	582.9	36.9	3.2	0.8	33.8	2.1
Xanadu	4	646.1	52.1	8.8	3.6	140.1	25.2
Annabell	6	750.2	53.7	7.7	1.4	146.2	24.2
KM2460.312.00.494.3.02-1	6	722.2	40.2	5.3	1.0	100.7	7.6
KM2640.411.7.3.12.03	6	668.6	31.1	6.7	1.2	46.3	3.8
KM2645.412.1.1.1.03-2	6	768.5	64.1	5.4	0.6	62.2	10.1
KM2678.287.7.05	6	731.2	59.3	5.0	0.9	48.1	4.6
KM2691.290.1.05	6	927.1	51.4	6.5	1.8	97.9	7.9
KM2696.648.13.0	6	743.1	36.3	6.2	1.3	49.3	4.3
Nudimelanocrithon	6	729.8	23.9	6.6	0.9	49.2	8.2

Tab. 10

Průměrné hodnoty a průkaznost aktivity vitamínu E a obsahu celkových tokolů, sumy tokoferolů a tokotrienolů v zrně vybraných odrůd a nových linií ječmene jarního

Odrůda, kombinace	Aktivita E vitamínu		Celkový obsah tokolů		Suma α , β , γ , δ tokoferolů		Suma α , β , γ , δ tokotrienolů	
	mg.kg ⁻¹	HS ¹⁾	mg.kg ⁻¹	HS	mg.kg ⁻¹	HS	mg.kg ⁻¹	HS
KM2666.644.05	6.495	a	25.830	bc	6.898	a	18.932	bcde
Nudimelanocrithon	6.781	ab	17.914	a	6.762	a	11.152	a
Abyssinian 1139	7.650	abc	24.137	b	8.224	abc	15.913	b
KM2454.439.99	8.824	abcd	28.838	bcde	8.181	ab	20.657	cdef
KM2460.312.00.494.3.02	9.131	bcde	29.332	bcdef	10.262	cdefgh	19.070	bcde
KM 2084	9.214	bcde	29.755	bcdef	9.590	bcdef	20.165	bcdef
KM2678.287.7.05	9.483	cdef	28.499	bcde	9.610	bcdef	18.889	bcde
KM2691.290.1.05	9.754	cdef	28.341	bcd	10.644	defgh	17.697	bcd
KM 1910	9.759	cdef	29.496	bcdef	9.004	bcde	20.492	cdef
KM2283	9.816	cdef	29.947	bcdef	6.800	a	23.146	efgh
Xanadu	10.048	cdef	35.144	fgh	9.699	bcdefg	25.445	gh
KM2645.355/1.03	10.128	efg	30.911	cdefg	9.488	bcde	21.423	cdefg
KM2642.416/5.03	10.292	efg	28.766	bcde	9.345	bcde	19.421	bcde
Wanubet	10.489	efg	34.314	efgh	9.188	bcde	25.126	gh
KM2454.439.99.496.4.02-2	10.897	efgh	31.196	cdefgh	9.432	bcde	21.764	defg
KM2696.648.13.0	11.032	efgh	35.923	gh	8.704	abce	27.220	h
KM2645.412.1.1.1.03	11.035	fg	34.379	fgh	10.631	dfgh	23.748	fgh
KM2640.411.7.3.12.03	11.240	efgh	34.106	defgh	11.591	fgh	22.515	efg
KM2620.352/9.03	11.299	fgh	32.610	defgh	10.822	dfgh	21.788	defg
KM1057-1906.223.1.05	11.474	fgh	29.334	bcdef	12.260	h	17.075	bc
Annabel	11.894	gh	36.876	h	11.732	gh	25.143	gh
KM2619.413.4.03	13.360	hi	43.033	i	8.687	abce	34.346	i
KM2454.439.99.496.4.02-1	14.699	i	47.342	i	14.424	i	32.918	i

¹⁾ - homogenní skupiny označené ve sloupci různými písmeny, se průkazně liší při $P_{0,05}$



Obr. 6

Zrno bezpluchého ječmene – první české registrované a právně chráněné odrůdy ječmene jarního AF Lucius, vyšlechtěné ve společnosti Agrotest fyto, s.r.o.

(Foto: Balounová M., 2010)



Obr. 7
Vzorek pluchatého zrna s tenkými pluchami, poškozenými při sklizni.

Ing. Kateřina Vaculová, CSc., Ing. Marta Balounová, Ing. Irena Sedláčková, Prof. Ing. František Kvasnička, CSc., RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D., Ing. Sylvie Běláková, Ing. Karolína Benešová, Ph.D., Mgr. Milan Pouch, Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc.

METODIKA PREBREEDINGU JEČMENE JARNÍHO S DIFERENCOVANÝM OBSAHEM PŘIROZENÝCH ŠKODLIVÝCH LÁTEK V ZRNĚ PRO ŠLECHTĚNÍ ODRŮD NESLADOVNICKÉHO TYPU

Metodika je poskytována bezplatně a je veřejně přístupná na adrese www.vukrom.cz

Vydal: Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

Tisk: Agrotest fyto, s.r.o.

Foto: Ing. Kateřina Vaculová, CSc., Ing. Marta Balounová, Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D., Mgr. Milan Pouch, Ing. Ondřej Jirsa, Ph.D.

Obálku navrhl: Ing. Marta Balounová, Ing. Petr Míša, CSc.

Tisk obálky: Tiskárna PRINT Kroměříž, marketing4you s.r.o., Sv. Čecha 3582, 767 01 Kroměříž

Počet stran: 46

Vydání: 1. vydání

Rok vydání: 2011

Náklad: 50 výtisků