

## Variabilita obsahu kyseliny fytové v zrně ječmene

### Variability in Phytic Acid Content in Barley Grain

KATEŘINA VACULOVÁ<sup>1</sup>, MARTA BALOUNOVÁ<sup>1</sup>, FRANTIŠEK KVASNIČKA<sup>2</sup>, IRENA SEDLÁČKOVÁ<sup>1</sup>, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ<sup>3</sup>, ELIŠKA VÁCLAVÍKOVÁ<sup>2</sup>, MILAN POUCH

<sup>1</sup> Agrotest fyto, s.r.o. / Agrotest Fyto, Ltd. Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž

<sup>2</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze / Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice

<sup>3</sup> Mendelova univerzita v Brně / Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno

e-mail: vaculova.katerina@vukrom.cz

**Vaculová, K. – Balounová, M. – Kvasnička, F. – Sedláčková, I. – Ehrenbergerová, J. – Václavíková, E. – Pouch, M.: Variabilita obsahu kyseliny fytové v zrně ječmene.** Kvasny Prum. 58, 2012, č. 4, s. 100–108.

V zrně ječmene se cca 65 % fosforu (P) nachází v podobě fytové kyseliny (PA) a jejích solí – fytátů, které negativně ovlivňují úroveň využitelnosti minerálních látek a dalších nutričně významných živin, podílejí se na minerálních deficiencích u lidí i ve výživě hospodářských zvířat a přispívají ke znečištění životního prostředí. Detekce a tvorba nových odrůd se změněným poměrem obou forem P, ve prospěch stravitelného fosfátu (Pi), je jedním ze způsobů řešení. Předložená práce se zabývala hodnocením variability obsahu PA a fosfátu (Pi) v zrně vybraných odrůd jarního a ozimého ječmene, genetických zdrojů a nových vlastních linií ječmene jarního, vytvořených hybridizací s tzv. „lpa“ chemomutanty – donory nízkého obsahu PA (M422, M1070, M635 a M955). U jarního ječmene byla variabilita obsahu obou forem P ovlivněna ročníkovými vlivy a pouze při rozšíření hodnoceného souboru o lpa mutanty také genotypem. I přes vysokou ročníkovou proměnlivost zůstal u lpa mutantů přibližně stejný poměr Pi/PA (od 138,4 % u M422 po 772,1 % u M955), zatímco u standardních odrůd činil v průměru pouze 31,3 %. Porovnání ozimého a jarního ječmene prokázalo, že ozimé odrůdy mají silnou tendenci k vyšší kumulaci P v zrně a ve formě PA (12,42 mg.g<sup>-1</sup> vs. 10,94 mg.g<sup>-1</sup>). Rozpracování screeningové metody hodnocení obsahu volného P v zrně pomocí kolorimetrického testu (KT) umožnilo provádět rozsáhlejší výběr materiálů s rozdílným obsahem PA a Pi. Mezi výsledky získanými aplikací metody KT a klasicky stanoveným obsahem Pi byla vypočtena silná kladná korelace ( $r = 0,85^{**}$ ,  $P \leq 0,01$ ). Naopak využití existujících molekulárních markerů (SCAR marker ABC153) pro detekci kříženců se sníženým obsahem PA v zrně se ukázalo jako velmi málo účinné. Křížením s lpa mutanty a následujícím výběrem za využití KT byly vytvořeny nové linie ječmene jarního se sníženým obsahem PA, zvýšeným podílem Pi a porovnatelným celkovým obsahem P v obilce, které mohou být využity ve šlechtění nebo dalším výzkumu. Zajímavým novým genovým zdrojem pro vývoj potravinářských odrůd ječmene se jeví nová linie KM2881.622.2.07, u které je zvýšený obsah volného P spojen s waxy charakterem škrobu (snížený podíl polysacharidu amylosy).

**Vaculová, K. – Balounová, M. – Kvasnička, F. – Sedláčková, I. – Ehrenbergerová, J. – Václavíková, E. – Pouch, M.: Variability in phytic acid content in barley grain.** Kvasny Prum. 58, 2012, No. 4, p. 100–108.

Around 65 % of phosphorus (P) in barley grain is in the form of phytic acid (PA) and phytates (PA salts), both forms negatively affect the usability of mineral substances and other important nutrients, thus participating in mineral deficiencies in human as well as livestock nutrition, and contributing to the pollution of the environment. Detection and creation of new varieties with a changed rate of both P forms in favor of digestible phosphate (Pi) is one of possible solutions. The submitted study dealt with the evaluation of variability in contents of PA and Pi in grains of selected spring and winter barley varieties, genetic resources and new spring barley lines created by hybridization with so-called „lpa“ chemo-mutants – donors of low PA content (M422, M1070, M635, and M955). Variability in the content of both P forms in spring barley was affected by year and only if the assessed set included lpa mutants also by a genotype. In spite of high year variability, Pi/PA rate in lpa mutants remained nearly the same (from 138.4 % in M422 to 772.1 % in M955), while in the standard varieties it was on average only 31.3 %. The comparison of winter and spring barley varieties proved that winter varieties have a strong tendency to a higher accumulation of P in grain in the PA form (12.42 mg.g<sup>-1</sup> vs. 10.94 mg.g<sup>-1</sup>). The screening method developed for the evaluation of free P content in grain using the colorimetric test (CT) allowed to perform a more extensive selection of materials with different PA and Pi contents.

A strong positive correlation was calculated between the results obtained by the CT and classically determined Pi ( $r = 0.85^{**}$ ,  $P \leq 0.01$ ). On the other hand, the use of existing molecular markers (SCAR marker ABC153) for the detection of crosses with reduced PA content in grain was not very effective. Crossing with lpa mutants and following selection using the CT led to creation of new lines of spring barley with reduced PA content, increased Pi rate and comparable total P content in a caryopsis, which can be used in breeding or further research. A new line KM2881.622.2.07 where an increased content of free P is connected with a waxy starch character (reduced portion of polysaccharide amylose) can be a new interesting gene resource for the development of food barley varieties.

**Vaculová, K. – Balounová, M. – Kvasnička, F. – Sedláčková, I. – Ehrenbergerová, J. – Václavíková, E. – Pouch, M.: Die Variabilität des Phytinsäuregehalts im Gerstenkorn.** Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 4, S. 100–108.

Im Gerstenkorn findet man etwa 65 % Phosphor in der Form der Phytinsäure und ihre Salze – Phytate, die den Grad an Benutzerfreundlichkeit von Mineralstoffen und von weiteren ernährungswichtigen Nährstoffen negativ beeinflussen, nehmen an menschliche und tierische mineralische Mangel teil und tragen zur Umweltverschmutzung bei. Die Detektion und Schaffung der neuen Gerstensorten mit einem geänderten Verhältnis der beiden P – Formen zugunsten verdaulichem Phosphat (Pi) stellt eine Lösung dar. Der Artikel befasst sich mit einer Auswertung der Variabilität des Gehalts an PA und an Phosphat (Pi) im Korn von ausgesuchten Sommer- und Wintergerstensorten, genetischen Quellen und durch Hybridisierung mit sog. „lpa“ Chemomutanten – Donors niedrigen Gehalts an PA (M422, M1070, M635 und M955) geschaffene neue eigene Sommergerstenlinien. Die Variabilität des Gehalts an beide Formen P der Sommergerste wurde durch Jahrgangseinflüsse, in Falle der Verbreitung der bewerteten Datei um lpa Mutante auch durch Genotyp beeinflusst. Trotz der hohen Jahrgangsvariabilität blieb bei den lpa Mutanten etwa gleiches Verhältnis Pi/PA (von 138,4 % bei der Sorte M422 bis zu 772,1 % bei M955), bei den Standardsorten wurde Verhältnis Pi/PA im Durchschnitt nur 31,3 %. Der Sommer- und Wintergerstevergleich zeigte, dass Wintersorten eine starke Tendenz zur höheren P Kumulation in Form PA im Korn aufweisen (12,42 mg.g<sup>-1</sup> vs. 10,94 mg.g<sup>-1</sup>). Die Entwicklung von screening Methoden des Gehalts an freiem P durch kolometrischen Test (KT) hat es ermöglicht eine breitere Auswahl vom Korn mit dem verschiedenen Gehalt an PA und Pi durchzuführen. Zwischen der durch die KT Methode erworbenen Ergebnissen und auf klassisch gemessenen Gehalt an Pi wurde eine starke positive Korrelation festgestellt ( $r = 0,85^{**}$ ,  $P \leq 0,01$ ). Im Gegenteil für die Detektion von Hybriden mit reduziertem Gehalt an PA im Korn war die Anwendung der existierenden molekularen Marker (SCAR Marker ABC153) sehr wenig wirksam. Durch die Hybridisierung mit den lpa Mutanten und unter Anwendung der KT Methode folgender Auswahl wurden neue Sommergerstenlinien mit dem reduzierten Gehalt an PA, erhöhtem Gehalt an Pi und mit dem vergleichbaren gesamten Gehalt an P in der Grasfrucht geschaffen, die weiter veredelt oder in Forschung angewandt werden können. Für weitere Entwicklung der Lebensmittelgerstensorten als das interessante Gen – Quelle scheint zu sein eine Linie KM2881.622.2.07, bei der erhöhter Gehalt an freiem P ist mit dem „waxy“ Charakter verbunden (reduzierter Anteil an Polysaccharid Amylose).

**Klíčová slova:** ječmen, kyselina fytová, fosfát, variabilita, nové linie ječmene jarního

**Keywords:** barley, phytic acid, phosphate, variability, new lines of spring barley

## 1 ÚVOD

Fosfor je zdrojem energie pro buňky ve formě adenosintrifosfátu (ATP) a součástí nukleových kyselin (DNA, RNA), které řídí syntézu bílkovin (Brady a Weil, 2002). Je tedy nezbytným makroprvkem pro všechny živé organismy. V zrně obilovin, olejnin a luštěnin se většina fosforu (50–85 %) nachází v podobě fytové kyseliny (myoinositol – 1, 2, 3, 4, 5, 6 – hexakis dihydrogen fosforečná kyselina – dále jen PA), která se váže s vitálně důležitými minerálními látkami (zejména zinkem, vápníkem, měďí a dalšími), blokuje trávicí enzymy (pepsin, alfa-amylázu, lipázu, apod.) Zvýšený obsah PA a jejich solí – fytátů pak negativně ovlivňuje využitelnost živin a nutričně významných látek. Fytáty jsou proto považovány za přirozeně se vyskytující toxikanty pro monogastriční hospodářská zvířata a mláďata obecně (Marounek, 2004; Oberleas, 1989). V lidské výživě je nutné posuzovat roli PA ze dvou hledisek – jako silný antioxidant snižuje riziko vzniku civilizačních chorob a v podobě prekursoru derivátu inositolu plní významné fyziologické funkce. Na druhé straně je jednou z významných příčin deficiencí železa a zinku ve stravě a zejména v oblastech s převahou potravin ve formě obilovin a luštěnin hlavní příčinou minerálních malnutricí (Manary et al., 2000; Mendoza et al., 1998). Fytátový fosfor se navíc spolu s odpady při výkrmu drůbeže, prasat a ryb stává významným zdrojem znečištění povrchových vod (Raboy, 2001), a tedy životního prostředí.

Řešení problematiky příjmu, distribuce v rostlinách, akumulace v zrně a využitelnosti fosforu patří v současné době ke světově významným výzkumným tématům (Hegeman et al., 2000; Raboy et al., 2000; aj.). I když se problém nízkého využití fytátového fosforu hospodářskými zvířaty řeší přidáváním mikrobiální fytázy do krmných směsí (Marounek, 2004), alternativou je šlechtění plodin na nízký obsah PA nebo vyšší aktivitu fytázy. Jedním ze způsobů jak zlepšit využitelnost fosforu je vývoj nových odrůd ječmene se sníženým obsahem PA a zvýšenou hladinou fosforu. V procesu klasického šlechtění jsou k tomuto účelu využívány materiály s geneticky podmíněnou redukcí obsahu kyseliny fytové, vytvořené chemickou mutagenézí (Raboy, 1999; Rasmussen a Cook, 1998). Odlišným přístupem je vytvoření transgenního ječmene se zabudovanou fytázou (Brinch-Pedersen et al., 2003). V této oblasti již byly dosaženy první praktické úspěchy (Ohnoutková, 2010, personální sdělení).

Hlavním záměrem práce bylo prostudovat obsah a variabilitu kyseliny fytové a fosfátu, jako dvou nutričně odlišných forem fosforu, ve vzorcích zrna standardních odrůd jarního i ozimého ječmene, mutantů s geneticky determinovaným sníženým obsahem fytové kyseliny a nově vytvořených vlastních linií ječmene jarního. Dále se práce zaměřila na ověření možnosti aplikace klasických (chemických) a dalších (screeningových a genetických) metod detekce genotypů s odlišným obsahem obou forem z pohledu jejich možného využití jako výběrového kritéria pro praktické i výzkumné účely.

## 2 MATERIÁL A METODY

### Materiál

Byly studovány vzorky zrna standardních i bezpluchých odrůd, genetických zdrojů a nových šlechtitelských linií ječmene jarního a ozimého (viz níže). Součástí souboru byly jak materiály se standardním složením škrobu, tak genové zdroje a nové linie se sníženým podílem polysacharidu amylosy (tzv. „waxy“). Jako zdroje sníženého obsahu fytové kyseliny (tzv. „lpa“ ječmeny) byly využity mutanty vytvořené metodou chemické mutagenéze z původní odrůdy Harrington (Raboy a Cook, 1999) s rozdílnou genetickou determinací tohoto znaku: M422 (gen *lpa1-1*, lokalizovaný na chromosomu 2HL), M1070 (gen *lpa2-1*, lokalizovaný na chromosomu 7HL – oba viz. Larson et al., 1998), M635 (gen *lpa3-1*, lokalizovaný na chromosomu 1HL – (Roslinsky et al., 2007) a M955 (bez genetické lokalizace znaku), získané v roce 2001 od prof. V. Raboye (University Idaho, USA). Byly rovněž hodnoceny nové genotypy vytvořené křížením těchto lpa donorů se standardními sladovnickými odrůdami a vlastními novými liniemi nesladovnického ječmene (materiály označené KM).

### Metody

Materiály ječmene byly pěstovány v polních podmínkách lokality Kroměříž v letech 2001–2010. Lokalita Kroměříž (49° 17' s.š., 17° 22'

## 1 INTRODUCTION

Phosphorus in the form of adenosintriphosphate (ATP) is a source of energy for cells and a component of nucleic acids (DNA, RNA) that controls protein synthesis (Brady and Weil, 2002). Therefore, it is a necessary macro-element for all living organisms. In grains of cereals, oil plants and legumes, most phosphorus (50–85 %) is in the form of phytic acid (myo – inositol – 1, 2, 3, 4, 5, 6 – hexakis dihydrogen phosphoric acid – further only PA) which binds with vital mineral substances (namely zinc, calcium, copper and others), it blocks digestive enzymes (pepsin, alpha-amylase, lipase, etc.) and increased content of PA and their salts – phytates negatively affects the usability of nutrients and nutritiously important substances. Therefore, phytates are considered naturally occurring toxicants for monogastric livestock and young stock generally (Marounek, 2004; Oberleas, 1989). In human diet, the role of PA must be considered from two aspects; as a strong antioxidant, it reduces the risk for the development of civilization diseases and in the form of a precursor of derivative of inositol, it fulfills important physiological functions. On the other hand, it is one of significant causes of iron and zinc deficiency in the diet and in the areas with prevailing food in the form of cereals and legumes, a main cause of mineral malnutrition (Manary et al., 2000; Mendoza et al., 1998). Furthermore, phytate phosphorus together with wastes from poultry, pig and fish fattening become an important source of pollution of surface waters (Raboy, 2001).

Currently, solution of the issues of phosphorus intake, distribution in plants, accumulation in a grain and its usability belong to the important research topics worldwide (Hegeman et al., 2000; Raboy et al., 2000). Although the problem of a low use of phytate phosphorus by the livestock is compensated by addition of microbial phytase into feeding mixtures (Marounek, 2004), crop breeding for a low content of PA or higher phytase activity is another alternative. One of ways how to improve the usability of phosphorus is the development of new barley varieties with a reduced PA content and increased phosphorus level. In the process of classical breeding, materials with genetically conditioned reduction of PA content, formed by chemical mutagenesis, are used for this purpose (Raboy and Cook, 1999; Rasmussen and Hatzak, 1998). Creation of transgenic barley with built-in phytase is another approach (Brinch-Pedersen et al., 2003). First practical achievements have been reached in this area (Ohnoutková, 2010, oral communication).

The main aim of this project was to study the content and variability of phytic acid and phosphate, i.e. two nutritiously different forms of phosphorus in grain samples of standard spring and winter barley varieties, mutants with genetically determined reduced content of phytate acid and newly formed lines of spring barley and in addition, to verify possible applications of classical (chemical) and other (screening and genetic) methods for the detection of genotypes with different content of both forms in terms of their possible use as a selection criterion for practical and research purposes.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### Material

Grain samples of standard and hulless varieties, genetic resources and new breeding lines of spring and winter barley (see below) were studied. The set contained both materials with standard starch composition and gene resources and new lines with a reduced content of amylose (so-called. „waxy“). Following mutants formed by the method of chemical mutagenesis from the original variety Harrington (Raboy and Cook, 1999) with a different genetic determination of this parameter were used as resources of reduced content of phytic acid (so-called „lpa“ barleys): M422 (gene *lpa1-1*, localized on chromosome 2HL), M1070 (gene *lpa2-1*, localized on chromosome 7HL – both see (Larson et al., 1998), M635 (gene *lpa3-1*, localized on chromosome 1HL – (Roslinsky et al., 2007) and M955 (without genetic localization of this parameter), obtained in 2001 from prof. V. Raboy (University Idaho, USA). In addition, new genotypes created by crossing these lpa donors with standard malting varieties and new lines of non-malting barley (materials denoted as KM) were also assessed.

### Methods

Barley materials were grown under the field conditions of the local-

v.d.) se nachází v řepařské zemědělské výrobní oblasti, v průměrně nadmořské výšce 235 m n.m. Region je charakterizován jako teplý a mírně vlhký. Půdní typ pokusných pozemků je klasifikován jako černozem luvická, půdní druh hlinitá půda středně těžká. Příprava pozemků pod pokusy byla provedena podle metodiky optimální pro pěstování jarního, resp. ozimého ječmene v dané lokalitě. Hnojení PK bylo provedeno na podzim předcházejícího roku podle výsledků chemických analýz půdy. Regenerační přihnojení N u ozimých odrůd bylo provedeno dávkou 30 kg.ha<sup>-1</sup> a stejná dávka byla aplikována k jarnímu ječmeni.

#### **Analýza obsahu fytové kyseliny a fosfátu**

Ve vzorcích ječmene, rozemletých pomocí odstředivého mlýnu Retsch ZM 200 (velikost oka síta 0,75 mm) a dále na vibračním mlýnu Retsch MM301, byl obsah PA a fosfátu (dále jen Pi - vyjádřeno jako kyselina fosforečná) stanovený metodou kapilární isotachoforesy (Blatný et al., 1995) ve VŠCHT Praha. Analýza byla provedena na dvoukapilárním elektroforetickém analyzátoru IONOSEP 2004 (Recman-laboratorní technika, ČR) s vodivostním bezkontaktním detektorem. Hodnoty byly vyjádřeny v mg.g<sup>-1</sup> vzorku. Pro porovnání jednotlivých materiálů ječmene byl na základě molární hmotnosti proveden výpočet podílu PA a Pi (%) vůči celkovému poolu fosforu (P) ve vzorku a stanoven podíl P ve vzorku (%) vůči průměru daného experimentálního souboru.

#### **Kolorimetrický test stanovení obsahu volného fosforu**

Screeningové kolorimetrické stanovení volného anorganického fosforu v zrně bylo provedeno upravenou metodou podle Raboye (2002 – písemné sdělení) v laboratoři Agrotestu fyto, s.r.o., s využitím tzv. Chenova činidla na bázi molybdenátu amonného, kyseliny sírové a kyseliny askorbové (Vaculová et al., 2011). Tato vizuální screeningová metoda hodnocení obsahu volného fosforu v zrně za pomoci kolorimetrické reakce umožňuje rychlou detekci kříženců s recesivním projevem lpa alel. Hodnocení bylo provedeno podle bodové stupnice 1-5, kde „1“ = 0-155 ng P, „2“ = 155-465 ng P, „3“ = 155-465 ng P, „4“ = 465-930 ng P, „5“ = 930-1395 ng P.

#### **Molekulární analýzy znaku „lpa“**

Odběr vzorků a extrakce DNA: vzorky tkání analyzovaných materiálů ječmene byly odebírány v laboratorních (z 10 denních klíčících rostlin) a polních podmínkách (listové segmenty). Odebrané vzorky tkání byly použity přímo k extrakci DNA, resp. po odběru byly zamrazeny v tekutém dusíku a až do izolace DNA umístěny v hlubokomrazicím boxu (-85 °C). DNA byla extrahována pomocí DNeasy plant mini kitu (Qiagen). Koncentrace a kvalita DNA byla analyzována na 1% agarózovém gelu porovnáním s hmotnostním markerem  $\lambda$ /HindIII.

MMAS (Molecular Marker Assisted Selection): pro detekci polymorfismu byl použit SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker ABC153, připravený podle (Roslinsky et al., 2007). PCR amplifikace markeru ABC153 byla prováděna v objemu 20  $\mu$ l na vzorek s finálními koncentracemi: 50 ng DNA, 1x Taq pufr, 400  $\mu$ M dNTPs, 0,2  $\mu$ M forward primer, 0,2  $\mu$ M reverse primer, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 1 U Taq polymerasy (Fermentas), doplnit H<sub>2</sub>O do objemu 20  $\mu$ l. PCR produkty byly naneseny na 1,5% agarosový gel a separovány 1 h při napětí 90 V.

Pro statistické zpracování výsledků byl použit program STATISTICA verze 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Byla použita analýza variance s mnohonásobným tříděním (LSD test), vzájemné vztahy mezi sledovanými ukazateli byly hodnoceny korelačními koeficienty. Štěpný poměr po aplikaci molekulárních markerů byl hodnocen výpočtem kritéria  $\chi^2$  (Rokickij, 1964).

### **3 VÝSLEDKY A DISKUSE**

#### **Hodnocení ječmene chemickými metodami**

Materiály ječmene jarního s odlišným typem zrna (pluchaté a bezpluché) a různým chemickým složením (lpa a waxy) byly pěstovány v letech 2001–2003. Celková průměrná hodnota obsahu PA ve vzorcích ječmene byla 6,27±0,51 mg.g<sup>-1</sup> a Pi 2,97±0,29 mg.g<sup>-1</sup>. Průměrný obsah PA kolísal od 1,12±0,21 mg.g<sup>-1</sup> (M955) po 9,84±4,84 mg.g<sup>-1</sup> (bezpluchá linie KM2037) a Pi v rozmezí 1,76±1,03 mg.g<sup>-1</sup> (Thuringia) až 8,67±2,39 mg.g<sup>-1</sup> (M955). Výsledky stanovení PA a Pi se vyznačovaly vysokou variabilitou. Variční koeficienty kolísaly pro PA od 19,02% (M955) po 94,24% (M1070) a pro Pi od 7,6% (M635) po 85,44% (Pax). Na vysoké míře proměnlivosti se podepsal hlavně

ity Kroměříž over the period of 2001–2010. The locality Kroměříž (49° 17'N Lat., 17° 22'E Long.) is found in the sugar-beet agricultural production area, in the average altitude of 235 meters above the sea level. The region is characterized as warm and moderately wet. The soil type of the experimental plots is Luvic Chernozem, loamy soil medium. Preparation of plots under the experiments was conducted according to the methods optimal for growing spring or winter barley in the given locality. Fertilizing with PK was performed in autumn of the previous year and it was based on the soil chemical analyses. Regeneration fertilizing with N in winter varieties was performed with a dose of 30 kg.ha<sup>-1</sup> and the same dose was applied in spring barley.

#### **Analysis of phytic acid and phosphate contents**

Barley samples were ground in the centrifugal mill Retsch ZM 200 (0.75 mm openings) and then on the vibration mill Retsch MM301, contents of PA and phosphate (further only Pi – expressed as phosphoric acid) were determined using the method of capillary isotachopheresis (Blatný et al., 1995) in ICT Prague. The analysis was conducted in the two-capillary electrophoresis analyzer IONOSEP 2004 (Recman-Laboratory Systems, CR) with a contactless conductivity detector. Values were expressed in mg.g<sup>-1</sup> of a sample. For the comparison of the individual barley materials, based on molar weight PA and Pi rate (%) to the total phosphorus pool (P) in the sample was calculated and P rate in the sample (%) to the average of the given experimental set determined.

#### **Colorimetric test for the determination of free phosphorus content**

Screening colorimetric determination of free inorganic phosphorus in a grain was carried out by the modified method after Raboy (2002 – written communication) in the laboratory of Agrotestu fyto, s.r.o. using a so-called Chenov agent on the basis of ammonium molybdate, sulphur and ascorbic acids (Vaculová et al., 2011). This visual screening method for the evaluation of free phosphorus content in a grain using the colorimetric reaction allows a fast detection of crosses with the recessive expression of lpa alleles. The evaluation was done according to the scale 1-5, where „1“ = 0-155 ng P, „2“ = 155-465 ng P, „3“ = 155-465 ng P, „4“ = 465-930 ng P, „5“ = 930-1395 ng P.

#### **Molecular analyses of „lpa” trait**

Sample taking and DNA extraction: tissue samples of the analyzed barley materials were taken under laboratory (from plants germinating for 10 days) and field conditions (leaf segments). The collected sample tissues were either used directly for DNA extraction or they were frozen in liquid nitrogen and placed in a deep-freezing box (-85 °C) till the DNA isolation. DNA was extracted using a DNeasy plant mini kit (Qiagen). DNA concentration and quality was analyzed on 1% agarose gel and compared with mass marker  $\lambda$ /HindIII.

MMAS (Molecular Marker Assisted Selection): polymorphism was detected with a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker ABC153, prepared according to (Roslinsky et al., 2007). PCR amplification of a marker ABC153 was conducted in the volume of 20  $\mu$ l per a sample at final concentrations: 50 ng DNA, 1x Taq buffer, 400  $\mu$ M dNTPs, 0,2  $\mu$ M forward primer, 0,2  $\mu$ M reverse primer, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 1 U Taq polymerases (Fermentas), with addition of H<sub>2</sub>O to the volume of 20  $\mu$ l. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel at 90 V for 1 h.

Results were statistically evaluated with the program STATISTICA version 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). The analysis of variance with multiple comparisons was applied (LSD test), mutual relationships among the studied parameters were evaluated with correlation coefficients. After application of molecular markers, the splitting rate was calculated from  $\chi^2$  criterion (Rokickij, 1964).

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **Evaluation of barley using chemical methods**

Materials of spring barley with a different type of grain (hulled and hullless) and different chemical composition (lpa and waxy) were grown in 2001–2003. The total average value of PA and Pi contents in barley samples were 6.27±0.51 mg.g<sup>-1</sup> and 2.97±0.29 mg.g<sup>-1</sup>, respectively. Average PA content varied from 1.12±0.21 mg.g<sup>-1</sup> (M955) to 9.84±4.84 mg.g<sup>-1</sup> (the hullless line KM2037) and Pi content was in the range from 1.76±1.03 mg.g<sup>-1</sup> (Thuringia) to 8.67±2.39 mg.g<sup>-1</sup> (M955). Results of PA and Pi determination were characterized by a high variability. Coefficients of variation for PA and Pi moved from



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. Dosažené výsledky bylo možné dát do souvislosti s průběhem počasí. Vegetační období 2001 odpovídalo teplotně úrovni 50letého normálu a bylo srážkově bohatší, kdežto v letech 2002–2003 byla naměřena ve stejném období o 11–12% vyšší průměrná teplota a oproti normálu naopak o cca 20–30% nižší suma srážek. Zjištěné výsledky korepondují s poznatky zahraničních autorů, kteří rovněž pozorovali vysokou variabilitu obsahu PA vlivem pěstebních podmínek a průběhu počasí (Dai et al., 2007).

Analýza variance našich dat prokázala, že v celém souboru byly výsoce významným zdrojem proměnlivosti nejen ročníky, jak uvádějí Dai et al. (2007), ale v případě obsahu využitelného fosforu i genotypy (tab. 1). Z uvedené tabulky 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 a HB803) a novými liniemi s bezpluchým typem zrna byla zjištěna statisticky významná difference v obsahu PA (5,11 vs. 7,77 mg.g<sup>-1</sup>), 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 (obr. 1).

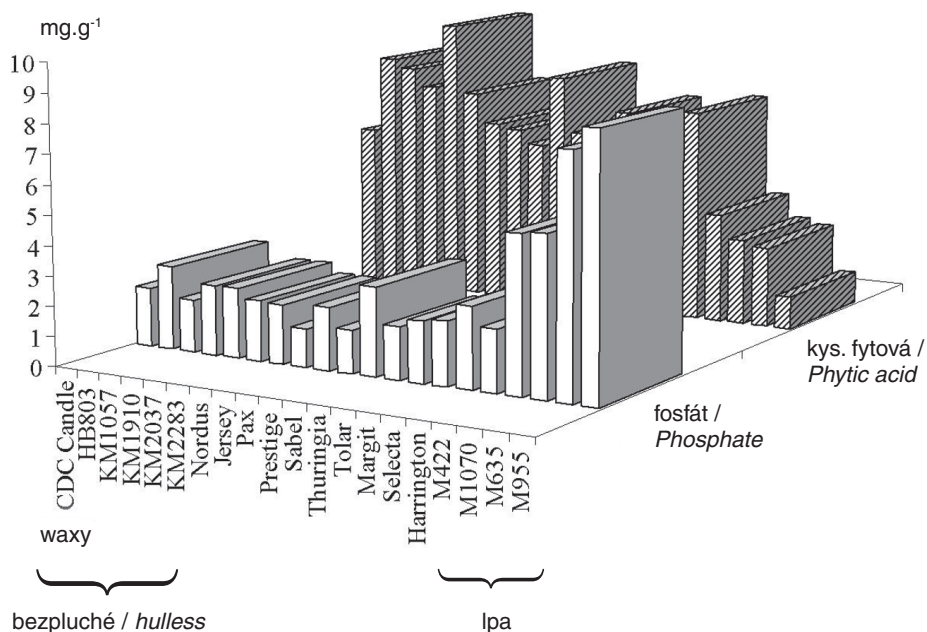
Vyloučení lpa donorů ze souboru rezultovalo ve snížení proměnlivosti, a tak „typ zrna“ jako faktor proměnlivosti nedosáhl hladiny průkaznosti. Typ škrobu (standardní vs. waxy) neměl vliv na rozdíly v obsahu PA ani v Pi.

I přes vysokou ročníkovou proměnlivost zůstával u lpa mutantů přibližně stejný poměr Pi/PA (od 138,4%–M422 po 772,1% u M955), zatímco u standardních odrůd činil v průměru pouze 31,3% a nejnižší byl stanoven pro odrůdu Prestige (17,6%). Dosažené výsledky potvrdily stabilitu donorů nízkého fyttátu a jsou v souladu s údaji tvůrců těchto materiálů, kteří uvádějí, že profily fosforu u mutantů zůstávají neměnné v různých pěstebních podmínkách (Bregitzer a Raboy, 2006).

Pro další využití donorů lpa ve šlechtění je důležitá skutečnost, že snížení obsahu PA je kompenzováno statisticky průkazným zvýšením hladiny volného fosforu (na úrovni 5,19; 5,27; 7,93 a 8,67 mg.g<sup>-1</sup> u M422, M1070, M635 a M935 resp.) a nedochází u nich (s výjimkou M422 s genem *lpa1-1*) ani k výraznému poklesu hladiny celkového fosforu v zrně.

Ječmen ozimý je určen téměř výhradně k výživě hospodářských zvířat a tedy znalost poměru mezi oběma formami fosforu může být důležitou informací o rozdílech v potenciálu nutriční kvality registrovaných odrůd. Ve druhém studovaném souboru byly proto porovnávány vybrané odrůdy ječmene ozimého a jarního, pěstované v letech 2002–2004 v pokusech SDO.

Obr. 1 Průměrné hodnoty obsahu fyttátu a fosfátu v zrně vybraných odrůd, genetických zdrojů a nových linií ječmene jarního (Kroměříž, 2001–2003) / Fig. 1 Mean values of phytate and phosphate contents in grain of selected varieties, genetic resources and new lines of spring barley (Kroměříž, 2001–2003)



19.02% (M955) to 94.24% (M1070) and from 7.6% (M635) to 85.44% (Pax), respectively. The high variability level was mainly affected by year 2001 with significantly different values of PA (on average even 3.2 higher) and Pi contents (on average even 2.1 lower) than in 2002–2003. The achieved results could be associated with the course of weather. The vegetation period in 2001 corresponded in temperatures to the level of 50-year normal and was richer in rainfalls while in 2002–2003 the average temperature in the same period was by 11–12% higher and on the contrary, compared to the normal sum of precipitations by ca 20–30% lower. The determined results correspond to the data of foreign authors who also reported a high variability of PA content caused by growing conditions and weather (Dai et al., 2007). The analysis of variance of our data showed that in the whole set not only years as reported by Dai et al. (2007) but also genotypes in case of usable phosphorus content were high significant sources of variability (Tab. 1).

It is evident from this table that the change in significance of the variety as a variability factor for Pi was achieved by including the lpa mutants. On the other hand, their presence also affected average contents of PA and Pi in the set of hulled varieties and a type of grain was therefore also considered as a significant source of variability.

Statistically significant difference in PA content (5.11 vs. 7.77 mg.g<sup>-1</sup>) was found in barley materials with hulled varieties (CDC Candle and HB803) and new hullless lines, probably also as a result of high PA content in the line KM2037 differing thus statistically significantly not only from lpa mutants but also from all standard varieties (Fig. 1). The

Tab. 1 Efekt vlivu zdrojů proměnlivosti na obsah kyseliny fytové a fosfátu u ječmene / The effect of variability sources on phytic acid and phosphate contents in barley

Zdroj proměnlivosti MS / Source of variability MS	df	celý soubor / whole set		df	bez „lpa“ genotypů / whitout „lpa“ genotypes	
		PA	Pi		PA	Pi
odrůda / Variety	18	13.67	13.23***	14	3.89	0.56
rok / Year	2	286.11***	21.56*	2	293.17***	26.82***
typ zrna <sup>1)</sup> / Grain type <sup>1)</sup>	1	93.52*	28.83*	1	22.61	0.06
typ škrobu / Starch type <sup>2)</sup>	1	6.66	3.53	1	0.04	0.42

PA – Fytová kyselina; Pi – fosfáty; <sup>1)</sup> – pluchaté vs. bezpluché; <sup>2)</sup> – se standardním vs. waxy typem škrobu; <sup>3)</sup> – soubor standardních materiálů ječmene, bez lpa donorů; \* –  $P_{0,05}$ ; \*\* –  $P_{0,01}$ ; \*\*\* –  $P_{0,001}$   
PA – Phytic acid; Pi – Phosphate; <sup>1)</sup> – hulled vs. hullless; <sup>2)</sup> – with standard vs. waxy type of starch; <sup>3)</sup> – set of the standard barley materials, without lpa donors; \* –  $P_{0,05}$ ; \*\* –  $P_{0,01}$ ; \*\*\* –  $P_{0,001}$

Výběr zahrnoval celkem 13 odrůd obou forem, přičemž u ječmene ozimého bylo testováno 7 odrůd víceřadých (Alissa, Carola, Lomerit, Luran, Luxor, Merlot a Nelly) a 6 odrůd dvouřadých (Camera, Duet, Jolante, Reni, Tiffany a Vilna). Hodnocení bylo rozšířeno o porovnání podílu PA a Pi na celkovém obsahu fosforu a relativního podílu P v zrně jednotlivých odrůd (tab. 2). Nejnižší celkový obsah P vůči celému souboru byl stanoven u jarní odrůdy Philadelphia (90,5 %), nejvíce P bylo zjištěno v zrně ozimé odrůdy Reni (123,6 %) a stejné marginální pozice měly obě odrůdy i pro obsah PA (9,70 mg.g<sup>-1</sup> vs. 15,00 mg.g<sup>-1</sup>, resp.). Odrůda Philadelphia měla rovněž neprůkazně nejvyšší obsah Pi (2,58 mg.g<sup>-1</sup>) a nejnižší podíl PA na celkovém fosforu (77 %). Celkově neprůkazně nejvyšší obsah Pi byl stanoven u ozimé odrůdy Tiffany (1,46 mg.g<sup>-1</sup>) a nejvyšší podíl PA z celkového podílu P měla rovněž odrůda ozimého ječmene Lomerit (89,2 %).

Hodnocení vlivu jednotlivých forem ječmene, jako faktoru proměnlivosti pro akumulaci obou PA a Pi, ukázalo, že u ozimého ječmene se kumuluje více P ve formě PA (12,42 mg.g<sup>-1</sup> vs. 10,94 mg.g<sup>-1</sup>) a také celkový pool P byl u většiny odrůd vyšší oproti ječmeni jarnímu. Výsledky mohou mít analogii s poznatky George et al. (2011), kteří u ozimého ječmene zaznamenali vyšší příjem P jak list, tak i kořeny. Mezi 2-řadými a 6-řadými odrůdami nebyl zjištěn prakticky žádný rozdíl, a to jak v obsahu PA (11,58 mg.g<sup>-1</sup> vs. 11,96 mg.g<sup>-1</sup>), tak i Pi (1,95 mg.g<sup>-1</sup> vs. 2,06 mg.g<sup>-1</sup>). Průkazná negativní korelace mezi obsahem PA a Pi u jarních i ozimých odrůd ( $r = -0,51^{**}$  a  $r = -0,50^{**}$ ,  $P \leq 0,01$ ) dokumentuje existující vzájemný vztah obou forem fosforu u běžných genotypů ječmene.

elimination of lpa donors from the set resulted in the reduction of variability and thus the "type of a grain" as a variability factor did not achieve the significance level. Type of starch (standard vs. waxy) did not affect the difference in PA or Pi contents. Despite high year variability, Pi/PA rate in lpa mutants remained nearly the same (from 138.4%–M422 to 772.1% in M955), while in the standard varieties it was on average only 31.3% and the lowest value was determined for the variety Prestige (17.6%). The achieved results confirmed stability of donors of low phytate and are in compliance with the data of authors of these materials who claim that phosphorus profiles in mutants remain stable under different growing conditions (Bregitzer and Raboy, 2006).

The fact that reduction in PA content was compensated by a statistically demonstrable increase in the free phosphorus level (at the levels of 5.19; 5.27; 7.93 and 8.67 mg.g<sup>-1</sup> in M422, M1070, M635, and M935 respectively) and the total phosphorus level in grain did not decline markedly (with the exception of M422 with the gene *lpa1-1*), is important for a further use of lpa donors in breeding.

Winter barley is almost exclusively determined for feeding of livestock and knowledge of the rate of both phosphorus forms can be important information about the differences in the potential of nutritional quality of the registered varieties. Therefore, in the second set under study, selected varieties of spring and winter barley grown in the experiments for the List of Recommended Varieties in 2002–2004 were compared.

The total selected set included 13 varieties of both forms, 7 six-row varieties (Alissa, Carola, Lomerit, Luran, Luxor, Merlot, and Nelly) and

Tab. 2 Průměrné hodnoty a variabilita obsahu fosforu, kyseliny fytové a fosfátu v zrně jarních a ozimých odrůd ječmene (2002–2004) / Average values and variability of phosphorus, phytic acid and phosphate contents in grain of spring and winter barley varieties (2002–2004)

Odrůda / Variety ukazatel / Parameter	PA, mg.g <sup>-1</sup>		Pi, mg.g <sup>-1</sup>		podíl / rate, % <sup>1)</sup>		celkový obsah P / total P content, % <sup>2)</sup>
	průměr / mean	s <sub>x</sub>	průměr / mean	s <sub>x</sub>	PA	Pi	
ječmen jarní / spring barley							
Amulet	10.98ab <sup>3)</sup>	0.69	1.81a	0.27	84.3	15.6	93.5
Annabell	11.67abc	0.79	2.02a	0.22	83.7	16.3	100.2
Diplom	10.97ab	1.30	2.32a	0.37	80.8	19.2	97.6
Heris	11.66abc	0.86	1.90a	0.48	84.5	15.5	99.2
Jersey	11.60abc	1.02	1.83a	0.34	84.9	15.1	98.2
Kompakt	11.00ab	1.13	1.90a	0.09	83.8	16.2	94.4
Malz	9.81a	1.47	2.08a	0.25	80.8	19.2	87.3
Nordus	10.43a	1.15	1.96a	0.59	82.6	17.4	90.8
Orthega	11.32abc	1.17	1.50a	0.18	87.0	13.0	93.5
Philadelphia	9.70a	2.03	2.58a	0.77	77.0	23.0	90.5
Prestige	10.28a	1.11	2.48a	0.25	78.7	21.3	93.9
Scarlett	11.74abc	1.33	1.75a	0.02	85.6	14.4	98.6
Tolar	11.04ab	0.76	2.14a	0.50	82.1	17.9	96.6
ječmen ozimý / winter barley							
Alissa	10.92ab	1.02	1.99a	0.36	83.0	17.0	94.6
Camera	13.01abc	1.61	1.88a	0.38	86.0	14.0	108.7
Carola	10.84ab	1.47	2.53a	1.09	79.2	20.8	98.4
Duet	12.28abc	0.94	2.02a	0.48	84.4	15.6	104.6
Jolante	12.80abc	1.24	1.54a	0.23	88.0	11.9	104.5
Lomerit	14.63bc	2.35	1.57a	0.19	89.2	10.8	117.8
Luran	11.32abc	0.79	2.23a	0.32	81.9	18.1	99.4
Luxor	11.34abc	0.79	2.47a	0.15	80.3	19.7	101.4
Merlot	12.62abc	1.87	1.86a	0.38	85.8	14.2	105.7
Nelly	12.02abc	1.01	1.78a	0.27	85.7	14.3	100.8
Reni	15.00c	2.29	1.96a	0.42	87.2	12.8	123.6
Tiffany	12.40abc	1.73	1.46a	0.26	88.3	11.7	100.9
Vilna	12.33abc	1.30	1.83a	0.46	85.7	14.3	103.4

PA – fytová kyselina; Pi – fosfát, <sup>1)</sup> – viz Materiál a metodika; <sup>2)</sup> – celkový obsah P v % k průměru pokusu; <sup>3)</sup> – průměrné hodnoty ve sloupci, označené různými písmeny, se průkazně liší při P0.05

PA – Phytic acid; Pi – Phosphate; <sup>1)</sup> – see Materials and methods; <sup>2)</sup> – total P content in % to the average of the experiment; <sup>3)</sup> – average values in the column indicated with different letters differ significantly at P0.05

**Využití screeningové kolorimetrické metody**

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 náročné.

Z tohoto důvodu byly rozpracovány screeningové metody, které jsou vodítkem pro šlechtitele i praktické využití při odhadu obsahu volného fosforu různých vzorků obilovin. Dosažené body screeningového hodnocení vybraných materiálů ječmene (první experimentální soubor) metodou kolorimetrického testu (KT) byly v souladu se zjištěnými průměrnými hodnotami obsahu PA i Pi (tab. 3). 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;  $P \leq 0,01$ ).

Vzhledem k potřebě pouze malého množství zrna (Vaculová et al., 2011) je použití screeningového KT vhodné k výběru nejen ve výzkumu nebo procesu tvorby nových genotypů ječmene, ale i k orientačnímu sledování obsahu volného fosforu v cereálních surovinách nebo krmivech.

Výběr hybridních linií po křížení s lpa donory v průběhu let 2002–2010 rezultoval ve vytvoření celé řady nových materiálů ječmene s rozdílným obsahem PA, Pi i celkovým poelem obou forem P. Screening na základě bodových hodnot KT byl doplněn o výběr genotypů s menší mírou variability v morfologických a hospodářsky významných znacích (tab. 4).

V souladu s údaji, které uvádějí Bregitzer a Raboy (2006), jsou výsledky šlechtění na snížený obsah PA ovlivněny nejen použitým donorem lpa, ale také genetickým pozadím, tj. diferencemi danými rozdíly mezi produktivními rodičovskými odrůdami. Z pohledu požadavku na snížený podíl PA, zvýšený obsah Pi a současně co nejmenší snížení celkového P se jako perspektivní jeví nová linie KM2715.645.4.07 (Barke/M635) s pluchatým a linie označená KM2696.614.15.07 (M635/KM2283) s bezpluchým zrnem, u kterých bylo dosaženo zvýšení podílu Pi na 56,9%, resp. 46,1% z celkového P. Obdobné hodnoty uvádějí Rosnagel et al. (2008) v popisu odrůdy Lophy-1, která má rovněž v pedigree mutanta M635 s genem *lpa3-1*. U linie KM2696.614.15.07 byl navíc naměřen o 34,6% vyšší celkový obsah P v zrně. Zajímavým novým genovým zdrojem pro vývoj potravinářských odrůd ječmene je linie KM2881.622.2.07 (Nordus/CDC Candle)/M635, u které je zvýšený obsah volného P spojen s waxy charakterem endospermu.

**Genetické metody**

Role kyseliny fytové v metabolismu rostlin a doposud ne plně objasněný mechanismus její akumulace i redukce jsou výzvou pro další genetické studie v této oblasti (Bohn et al., 2008). U ječmene je publikováno několik prací (Raboy a Cock, 1999; Rasmussen a Hatzak, 1998; Larson et al., 1998; Roslinsky et al., 2007), které se zabývaly genetickou podstatou a lokalizací lpa mutací se záměrem nalézt vhodné genetické markery, které by mohly být využity v raných stádiích po křížení k detekci požadovaných genotypů.

6 two-row varieties (Camera, Duet, Jolante, Reni, Tiffany, and Vilna) of winter barley were tested. The evaluation was extended by the comparison of the PA and Pi contribution to the total phosphorus content and relative pool of P in grain of the particular varieties (Tab. 2). The lowest total P content to the whole set was determined in the spring variety Philadelphia (90.5%), the highest amount of P was found in winter variety Reni (123.6%) and both the varieties had the same marginal positions in their PA contents (9.70 mg.g<sup>-1</sup> vs. 15.00 mg.g<sup>-1</sup>, respectively). The variety Philadelphia also had non-significantly highest Pi content (2.58 mg.g<sup>-1</sup>) and the lowest PA rate of the total phosphorus (77%). The non-significantly lowest Pi content was determined in the winter variety Tiffany (1.46 mg.g<sup>-1</sup>) and the winter barley variety Lomerit had the highest PA rate of the total pool of P (89.2 %).

The evaluation of the effect of the individual barley forms as a variability factor for the accumulation of both PA and Pi showed that in winter barley more P in the form of PA (12.42 mg.g<sup>-1</sup> vs. 10.94 mg.g<sup>-1</sup>) was accumulated and also the total pool of P was in most varieties higher compared to spring barley. Results may be in analogy with results of George et al. (2011) who recorded in winter barley a higher intake of P both by leaves and roots. Practically no difference was found between the 2-row and 6-row varieties neither in PA content (11.58 mg.g<sup>-1</sup> vs. 11.96 mg.g<sup>-1</sup>) nor in Pi content (1.95 mg.g<sup>-1</sup> vs. 2.06 mg.g<sup>-1</sup>). Significant negative correlation between PA and Pi contents in spring and winter varieties ( $r = -0.51^{**}$  and  $r = -0.50^{**}$ ,  $P \leq 0.01$ ) documents existing mutual relationships between both phosphorus forms in common barley genotypes.

**Use of the colorimetric method for screening**

Selection of crosses with a reduced PA content and increased Pi content in grain requires a comparison of a great amount of lines, which is financially demanding when standard chemical methods are used. For this reason, screening methods, which are a guide for breeders and practical use at the estimation of free phosphorus content in various protein samples, were designed. The score achieved with the screening evaluation of selected barley materials (the first experimental set) with the method of the colorimetric test (CT) was in compliance with the determined average values of PA and Pi contents (Tab. 3).

Spearman's correlation among the data from the CT measurement and PA and Pi contents were strong and significant and had a reverse sign ( $r = -0.64^{***}$  and  $r = 0.85^{***}$  for PA and Pi;  $P \leq 0.01$ ). Considering that only a small amount of grain is needed (Vaculová et al., 2011), the use of screening CT is suitable for the selection not only in research or creation of new barley genotypes but also for monitoring of free phosphorus content in cereal materials or feeds.

Selection of hybrid lines after crossing with lpa donors during 2002–2010 resulted in formation of a number of new barley materials with different PA, Pi contents and total pool of both P forms.

Screening based on score values achieved by CT was extended with the selection of genotypes with a minor variability extent in morphological and significant economic parameters (Tab. 4).

Tab. 3 Screeningové hodnocení obsahu volného fosforu metodou kolorimetrického testu a podíl kyseliny fytové a fosfátu ve vzorcích zrna vybraných materiálů ječmene / Screening evaluation of free phosphorus content by the method of colorimetric test and rate of phytic acid and phosphate in grain samples of selected barley materials

Odrůda, linie, mutant / Variety, line, mutant	bodová hodnota KT <sup>§</sup> / CT score <sup>§</sup>				podíl, % <sup>1)</sup> / Rate, % <sup>2)</sup>		celkový obsah P v % <sup>2)</sup> / Total P content in % <sup>2)</sup>
	A	B	C	D	PA	Pi	
Harrington	1	1.5	1.5	1.5	73.9b <sup>3)</sup>	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

§) – hodnota kolorimetrického testu v opakování – viz Materiál a metodika; <sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>, <sup>3)</sup> – viz tab. 2

§) – Value of the colorimetric test in repetition – see Materials and methods; <sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>, <sup>3)</sup> – see Table 2



Tab. 4 Nové linie ječmene jarního s rozdílným obsahem kyseliny fytové a fosfátu v zrně / *New lines of spring barley with different phytic acid and phosphate contents in a grain*

Označení kombinace, lpa donora / ukazatel / Identification of combination, lpa donor / parameter	pedigree	typ zrna <sup>1)</sup> / Grain type <sup>1)</sup>	bodová hodnota KT <sup>2)</sup> / CT score <sup>2)</sup>	PA	Pi	podíl, % <sup>3)</sup> / Rate, % <sup>3)</sup>		celkový obsah P v % <sup>4)</sup> / Total P content in % <sup>4)</sup>
				mg.g <sup>-1</sup>		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

PA – fytová kyselina; Pi – fosfát; <sup>1)</sup> – n = bezpluchý, pl – pluchatý typ obilky, w = waxy typ škrobu; <sup>2)</sup>, <sup>3)</sup>, <sup>4)</sup> – viz tab. 3

PA – Phytic acid; Pi – Phosphate; <sup>1)</sup> – n = hullless, pl – hulled type of caryopsis, w = waxy type of starch; <sup>2)</sup>, <sup>3)</sup>, <sup>4)</sup> – see Table 3

Na základě výsledků zahraničních autorů byl pro detekci polymorfismu mezi vybranými standardními a lpa muty ječmene využit SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker ABC153. Segregační analýza dvojího haploidu mezi odrůdou CDC McGwire a M422 potvrdila, že existuje vazba (vzdálenost ~15 cM) mezi tímto markerem a lokusem *lpa* na chromozómu 2HL (Roslinsky et al., 2007).

Aplikace markeru ABC153 ve zvoleném souboru genotypů ječmene jarního (obr. 2) potvrdila, že mezi výchozími lpa donory a odrůdami Margit a Ohara existují vizuálně zřejmé rozdíly.

Kontrola dědivosti lpa charakteru u 71 náhodně vybraných rostlin ve štěpící F2 populaci (z křížení odrůdy Streif s lpa odrůdou Clearwater) potvrdila existenci polymorfismu (obr. 3). V souboru 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. Také hodnocení výsledků štěpení pomocí kritéria  $\chi^2$  ( $\chi=1,86$ ;  $P=0,19$ ) nevyvrátilo nulovou hypotézu, takže bylo možné považovat výsledky štěpného poměru (3 A<sub>1</sub>: 1 aa=*lpa*) za potvrzené.

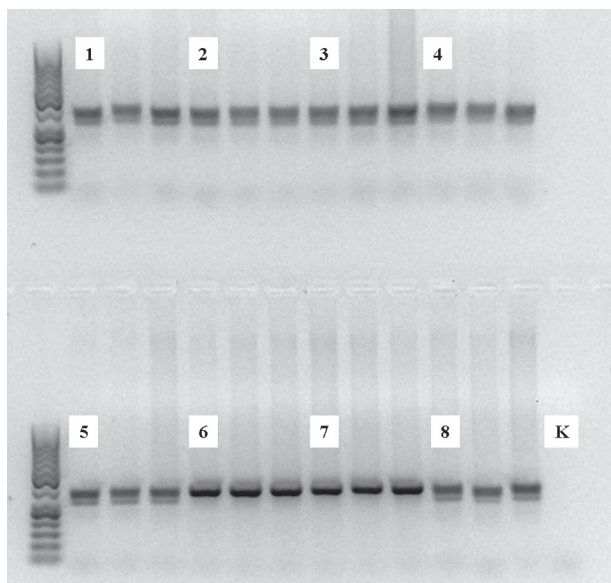
Po sklizni testovaných rostlin byl ve vzorcích zrna stanoven obsah volného P metodou KT. Ukázalo se ale, že mezi výsledky molekulární analýzy a KT testu byla shoda pouze ve 30% případů. Příčinou je zřejmě poměrně velká vzdálenost markeru ABC153 od lokusu *lpa1-1*, což mohlo rezultovat v rekombinaci a vedlo ke vzniku falešně pozitivních či falešně negativních výsledků.

In compliance with the data reported by Bregitzer and Raboy (2006), results of breeding for a lowered PA content are affected not only by the used lpa donor but also genetic background, i.e. differences among productive parental varieties. A new line KM2715.645.4.07 (Barke/M635) with a hulled and a line KM2696.614.15.07 (M635/KM2283) with a hullless grain in which Pi rate was increased to 56.9% and 46.1% of the total P, respectively, seem to be perspective in terms of the requirement for a reduced rate of PA, increased Pi content and at the same time the lowest possible reduction in total P. Similar values are given by Rosnagel et al. (2008), in the description of the variety Lophy-1 which also has a mutant M635 with the gene *lpa3-1* in its pedigree. In addition, in the line KM2696.614.15.07, total P content in grain higher by 34.6% was measured. The line KM2881.622.2.07 (Nordus/CDC Candle)/M635 in which an increased content of free P content is connected with waxy character of the endosperm is a new interesting gene resource for the development of food barley varieties. Only in research or creation of new barley genotypes but also for monitoring of free phosphorus content in cereal materials or feeds.

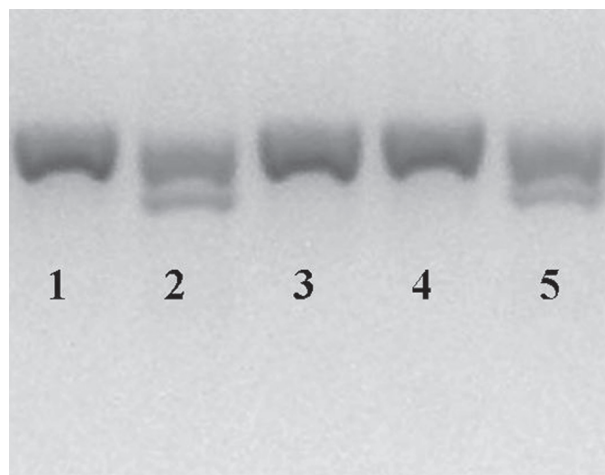
#### Genetic methods

The role of phytic acid in metabolism of plants and so far not fully clarified mechanism of its accumulation and reduction remain a challenge for future genetic studies (Bohn et al., 2008). In barley, several

Obr. 2 Variabilita markeru ABC153 v souboru rodičovských genotypů (1 – Harrington, 2 – M422, 3 – M635, 4 – M955, 5 – M1070, 6 – Margit, 7 – Ohara, 8 – Selecta) / Fig. 2 Variability of ABC153 marker in the set of parental genotypes (1 – Harrington, 2 – M422, 3 – M635, 4 – M955, 5 – M1070, 6 – Margit, 7 – Ohara, 8 – Selecta)



Obr. 3 Identifikace genotypu rostlin F2 generace prostřednictvím markeru ABC153. Vzorky 2 a 5 mají genotyp odpovídající odrůdě Clearwater (310 a 340 bp) / Fig. 3 Identification of the genotype of the F2 generation plants with the ABC153 marker. Samples 2 and 5 have a genotype corresponding to the variety Clearwater (310 and 340 bp)



#### 4 ZÁVĚR

Ječmen jako druhá v České republice a celosvětově čtvrtá nejrozšířenější obilnina je významnou surovinou nejen pro sladovníctví, ale i výrobu krmiv, a to jak v podobě zrna, tak i zbytků (mláto, sladový květ) a odpadů (zadina, splávky) pivovarského průmyslu (Jedlička, 2004). Vzhledem k tomu, že obsah PA je významně vyšší v periferních částech obilky v porovnání s endospermem (O'Dell et al., 1972), dá se u těchto surovin očekávat i vyšší podíl fytátového P. Výsledky studia vybraného souboru odrůd a genetických zdrojů ječmene jarního svědčí o tom, že existující variabilita obsahu obou forem P je poplatná především ročníkovým vlivům (a případně i vlivu pěstební technologie a lokality). Významně nižší obsah PA a současně i průkazně vyšší obsah Pi byl stanoven pouze u lpa donorů a z nich vytvořených nových linií s pluchatým i bezpluchým zrnem. Doposud publikované výsledky hodnocení sladovníckých parametrů u vícenásobných zpětných kříženců lpa mutantů s výchozí rodičovskou odrůdou Harrington ale ukázaly, že tyto materiály nedosahují vyhovující výše sladařsky významných znaků a mají zejména nedostatečnou diastatickou mohutnost (Bregitzer a Raboy, 2006a). O negativní korelaci mezi obsahem PA a obsahem extraktu referují i další autoři (Dai et al., 2007).

Odrůdy ozimého ječmene, které jsou určeny téměř výhradně ke krmení, měly významnou tendenci k vyšší kumulaci PA i celkového P v porovnání s jarním ječmenem. I když průkazné difference byly pozorovány pouze u jednotlivých odrůd obou forem s krajními hodnotami obsahu PA a Pi, mohou být získané výsledky určitým vodítkem i při šlechtění ozimého ječmene. Přesto, že mezi 2-řadými a víceřadými odrůdami nebyly v obsahu PA nebo Pi zjištěny průkazné difference, je možné, že tyto nálezy souvisejí se známým jevem, a to již zvýšeným podílem pluch a vyšším obsahem hrubé vlákniny u ozimého ječmene.

Nově vytvořené linie ječmene jarního s odlišným podílem Pi na celkovém poolu P v obilce mohou představovat potenciální zdroje pro další šlechtění i výzkum odrůd s nízkým obsahem PA. Výběr takových materiálů usnadňuje aplikace screeningové metody KT, která dobře koresponduje s obsahem volného P v zrně, a má tedy obecně využití nejen při hodnocení nových lpa materiálů, ale i případných produktů genetického inženýrství, zaměřených na tvorbu odrůd s vyšší hladinou nebo aktivitou enzymu fytázy. Naopak využití publikovaného SCAR genetického markeru ABC153 se ukázalo jako málo efektivní postup, který nemůže poskytnout spolehlivé výsledky pro další výběr vhodných genotypů. Pokud nebudou k dispozici další výzkumné poznatky, které by umožnily lépe identifikovat existující lpa donory, nelze jejich využití doporučit.

studies have been published (Raboy and Cock, 1999; Rasmussen and Hatzak, 1998; Larson et al., 1998; Roslinsky et al., 2007), studying the genetic basis and localization of lpa mutation with the aim to find suitable genetic markers that could be used in the early phases after crossing for detection of the required genotypes.

Based on the results of foreign authors, the SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker ABC153 was used for the detection of polymorphism among the selected standard and lpa mutants of barley. The segregation analysis of double haploids between the variety CDC McGwire and M422 confirmed the existence of the relationship (distance ~15 cM) between this marker and *lpa* locus on 2HL chromosome (Roslinsky et al., 2007).

The application of ABC153 marker in the selected set of spring barley genotypes (Fig. 2) confirmed the existence of apparent visual differences between the original lpa donors and the varieties Margit and Ohara.

Control of heritability of lpa character in 71 randomly selected plants in splitting F2 population (from crossing the variety Streif with the lpa variety Clearwater) confirmed the existence of polymorphism (Fig. 3). In the set, PCR products 310 and 340 bp are amplified in materials with the expected lpa genotype, while in the lines with standard contents of phytate and heterozygotes only the 340 bp product was detected. The evaluation of results of splitting using the  $\chi^2$  criterion ( $\chi^2=1.86$ ;  $P=0.19$ ) did not disprove the null hypothesis, therefore the results of the splitting rate (3 A.: 1 aa=lpa) could be considered confirmed. After harvest of the tested plants, content of free P in barley samples was determined with the CT method. However, results from the molecular analysis and CT test were in agreement only in 30 % of cases. The probable cause may be a relatively high distance of the ABC153 marker from *lpa1-1* locus, which could result in recombination and led to the origin of false positive or false negative results.

#### 4 CONCLUSION

Barley, in the Czech Republic the second and globally the fourth most widespread cereal, is an important material not only for malting but also feed production both in a form of grain and residues (spent grains, malt culms) and wastes (tailings, swimmers) from the brewing industry (Jedlička, 2004). Considering the fact that PA content is significantly higher in the peripheral parts of a caryopsis compared to the endosperm (O'Dell et al., 1972), higher rate of phytate P can be expected in these materials. Results of study of the selected set of varieties and spring barley genetic resources confirm that the existing variability in the content of both P forms is affected mainly by year (and possibly growing technology and locality). Significantly lower PA content and at the same time significantly higher Pi content were determined only in lpa donors and from them formed new lines with hulled and hullless grain. However, to date published results of the



**Poděkování**

Výsledky byly zpracovány za finanční podpory projektů MZe č. QH91053 a QI101B088. Autoři děkují prof. V. Raboyovi (USDA-ARS, National Small Grains Germplasm Research Facility, Aberdeen, ID, USA) za poskytnutí vzorků osiva mutantů M422, M1070, M635 and M955, použitých v této práci a při tvorbě nových genetických zdrojů se sníženým obsahem kyseliny fytové.

**Literatura / References**

- 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.
- Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K., 2008: Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Sci B* **9**, 3: 165–191.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2002: Soil phosphorus and potassium. *In* The Nature and Properties of Soils. Eds S Helba and MR Carey, Pearson Education, New Jersey: 592–635.
- Bregitzer, P., Raboy, V., 2006: Effects of Four Independent Low-Phytate Mutations on Barley Agronomic Performance. *Crop Sci.* **46**: 1318–1322.
- Bregitzer, P., Raboy, V., 2006a: Effects of Four Independent Low-Phytate Mutations in Barley (*Hordeum vulgare* L.) on Seed Phosphorus Characteristics and Malting Quality. *Cereal Chem.* **83**: 460–464.
- Brinch-Pedersen, H., Hatzack, F., Sorensen, L.D., Holm, P.B., 2003. Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Research*, **12**: 649–659.
- Dai, F., Wang, J., Zhang, A., Xu, Z., Zhang, G., 2007: Genotypic and environmental variation in phytic acid content and its relation to protein content and malt quality in barley. *Food Chemistry* **105**: 606–611.
- George, T., Brown, L., Newton, A., Hallet, P., Sun, B., Thomas, W., White, P., 2011: Impact of soil tillage on the robustness of the genetic component of variation in phosphorus (P) use efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and Soil* **339**: 113–123.
- Hegeman, C.E., Good, L.L., Grabau, E.A., 2000. Expression of D-myo-Inositol-3 Phosphate Synthase in Soybean. Implications for Phytic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* **125**: 1941–1948.
- Jedlička, M., 2004: Nové kapacity na pivovarské a sladařské vedlejší produkty. *Náš chov*, **LXIV**, 12: 16–17.
- 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.
- 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**: 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.
- Mendoza, C., Viteri, F.E., Lonnerdal, B., Young, K.A., Raboy, V., Brown, K.H., 1999: Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, **68** (5), 1123–1127. Erratum in: *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 743.
- 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.
- Oberleas, D., 1989: Phytates. Toxicants occurring naturally in foods. *Natl. Acad. Press, Washington, D.C.*: 363–371.
- Raboy, V., 2000: Low-phytic-acid grains. *Food and Nutrition Bulletin* **4**: 423–427.
- Raboy, V., 2001: Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci.* **6**: 458–462.
- Raboy, V., Cook, A., 1999: An Update on ARS Barley low phytic acid Research. *Barley Genetics Newsletter* **29**: 36–39.
- 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.
- Rokickij, P.F., 1964: *Biologičeskaja statistika*. Izdat. Vysšaja škola, Minsk: 326 s.
- evaluation of the malting parameters in multiple back crosses of lpa mutants with the original parental variety Harrington have shown that these materials do not achieve a suitable level of important malting parameters and namely, they have insufficient diastatic power (Bregitzer and Raboy, 2006a). Negative correlation between PA content and extract content has also been described by other authors (Dai et al., 2007).
- Winter barley varieties which are determined nearly exclusively for feeding, showed a marked tendency to a higher accumulation of PA and total P compared to spring barley. Although the significant differences were observed only in the individual varieties of both forms with the extreme values of PA and Pi contents, the obtained results may be a certain guide also for breeding of winter barley. Although no significant differences in PA or Pi contents between 2-row and six-row varieties were found, it is possible that these findings are related with a well known phenomenon, i.e. an increased rate of hulls and higher content of coarse fiber in winter barley.
- Newly formed lines of spring barley with different Pi contribution to the total P pool in a caryopsis can represent potential resources for further breeding and research of varieties with a low PA content. Selection of these materials is facilitated by the application of the CT screening method which corresponds with a content of free P in grain thus being generally usable not only for the evaluation of new lpa materials but also for relevant products of genetic engineering focused on production of varieties with a higher phytase level or activity. On the other hand, the use of published SCAR genetic marker ABC153 was shown to be a less efficient approach which cannot provide reliable results for other selection of suitable genotypes. Their utilization cannot be recommended unless further research data enabling a better identification of existing lpa donors is available.

**Acknowledgements**

Results were worked out with the financial support of the projects of Ministry of Agriculture no. QH91053 and QI101B088. The authors would like to express their thanks to professor V. Raboy (USDA-ARS, National Small Grains Germplasm Research Facility, Aberdeen, ID, USA) for providing seed samples of M422, M1070, M635 and M955 mutants used in this study and for development of new genetic resources with a reduced content of phytic acid.

- 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. Breed.* **20**: 323–330.
- Rossnagel, B.G., Zatorski, T., Arganosa, G., Beattie, A.D., 2008: Registration of 'CDC Lophy-I' Barley. *Journal of Plant Registrations* **2**: 169–173.
- Vaculová, K., Balounová, M., Sedláčková, I., Kvasnička, F., Mikulíková, R., Pouch, M., Ehrenbergerová, J., 2011: Metodika prebreedingu ječmene jarního s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek v zrně pro šlechtění odrůd nesladovnického typu. *Kroměříž*: 46 s., ISBN 978-80-904594-9-6.