



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Využití DNA markerů u pšenice s nestandardním
zbarvením obilky**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Jana Pečinková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: „**Využití DNA markerů u pšenice s nestandardním zbarvením obilky**“ vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za skvělé vedení, trpělivost a cenné rady během celé tvorby mé závěrečné práce. Děkuji svému konzultantovi Ing. Petru Martinkovi, CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. za poskytnutí experimentálního materiálu, doporučení a připomínky k celé práci. Také velmi děkuji své rodině a přátelům za skvělou podporu během mého studia.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV č. QJ1510206.

ABSTRAKT

V dnešní době stále více stoupá zájem o lepší a zdravější potraviny, proto se velká pozornost zaměřuje na barevné pšenice s vysokým obsahem anthokyanů. Pozitivní vliv anthokyanů v podobě antioxidačních účinků byl prokázán v mnoha studiích. Na základě toho se usiluje o šlechtění nových odrůd pšenic s nestandardním zbarvením obilky. Z kolekce genotypů, pocházejících z Agrotest Fyto Kroměříž s. r. o. bylo analyzováno šestnáct genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) s purpurovým perikarpem a dva genotypy s červenými obilkami, použitými jako standardní kontroly. Byly prováděny analýzy založené na PCR pomoci specifických primerů. Detekovaly se alely *Pin* proteinů (*Pina-D1* a *Pinb-D1*), ovlivňující tvrdost obilek. U téměř poloviny vzorků nebyl detekován PCR produkt pro lokus *Pinb-D1* a zbývající genotypy vykazují genetické předpoklady pro *hardness* (tvrdé) obilky. Další analýzy byly provedeny na detekci nulových alel *Waxy* genů. U vybraných genotypů se nenacházela žádná nulová alela. Důležitou součástí pekařské kvality jsou nízkomolekulární gluteniny, udávané lokusem *Glu-A3* s vysokou alelickou variabilitou. V analyzovaných vzorcích byly detekovány alely *Glu-A3d* a *Glu-A3f*, díky kterým mohou mít tyto genotypy žádané vlastnosti pro pekařské účely.

Klíčová slova: *T. aestivum* L., purpurový perikarp, PCR, nízkomolekulární podjednotky gluteninů, purinoindolin, *Waxy* geny.

ABSTRACT

Nowadays, there is a growing interest in better and healthier food, a lot of attention is focussed on colored wheat with high anthocyanin content. The positive effect of anthocyanins is their antioxidant effects which has been demonstrated in many studies. On this basis, there is effort to breed new wheat varieties with non-standard coloration of the grain. From a collection of genotypes provided from Agrotest Fyto Kroměříž Ltd. Sixteen genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) with purple pericarp and two genotypes with red grains used as standard controls were analyzed. PCR-based analyses were performed using specific primers. The *Pin* protein alleles (*Pina-D1* and *Pinb-D1*) were detected affecting the kernel hardness. Nearly half of the samples did not form the PCR product for *Pinb-D1* locus and the rest of genotypes show genetic predisposition for hardness grain. Further analyzes were performed on the detection of null alleles of the *Waxy* genes. Any null alleles were found in selected genotypes. An important part of baking quality is low molecular weight glutenins, labeled with *Glu-A3* locus with high allelic variability. *Glu-A3d* and *Glu-A3f* alleles were detected in analyzed samples, which may have these genotypes as required for baking purposes.

Key words: *T. aestivum* L., purple pericarp, PCR, low molecular weight glutenin subunits, purinoindolyl, *Waxy* genes.

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍLE PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Pšenice setá	12
3.1.1	Systematické zařazení a historie rodu <i>Triticum</i>	12
3.1.2	Charakteristika obilky	13
3.1.3	Chemické složení obilky	15
3.2	Kvalita pšenice.....	16
3.2.1	Ukazatele pekařské kvality	17
3.3	Flavonoidy	18
3.3.1	Anthokyany	20
3.4	Pšenice s nestandardním zbarvením obilky	20
3.4.1	Červená a bílá pšenice.....	21
3.4.2	Modrá a žlutá pšenice.....	22
3.4.3	Purpurová pšenice	22
3.4.4	Současné využití barevných pšenic.....	23
3.5	Molekulární markery	25
3.5.1	Využití DNA markerů ve šlechtění.....	26
4	MATERIÁL A METODIKA	27
4.1	Použitý materiál	27
4.2	Metodika	28
4.2.1	Izolace rostlinné DNA, kontrola čistoty.....	28
4.2.2	PCR	28
4.2.3	Elektroforetické separace na agarózovém gelu.....	31
4.2.4	Vyhodnocení výsledků.....	32
5	VÝSLEDKY.....	33
5.1	Detekce alel <i>Pina-D1</i> a <i>Pinb-D1</i>	33
5.2	Detekce nulových alel <i>Waxy</i> genů	34
5.3	Analýza nízkomolekulárních gluteninů	35
6	DISKUZE.....	37
6.1	Markery tvrdosti obilky	37
6.2	Detekce nulových alel <i>Waxy</i> genů	38

6.3	Analýza nízkomolekulárních gluteninů	39
6.4	Polní podmínky pěstování vybraných genotypů.....	40
6.4.1	Charakteristika vegetačního roku 2015/2016.....	40
6.4.2	Agrotechnika pokusů 2015/2016 pro ozimou pšenici.....	41
7	ZÁVĚR.....	43
8	PREZENTACE VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	45
9	LITERATURA	46
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	55
11	SEZNAM TABULEK	56

1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je nejvíce pěstovanou plodinou v České republice a jednou z nejdůležitějších plodin na světě. Mnohé využití nalézá různých odvětvích, především v potravinářství ve výrobě pečiva, sušenek, těstovin aj., dále v krmivářství jako potrava pro hospodářská zvířata a uplatnění nachází také v průmyslu při výrobě škrobu a lihu. Většina pěstovaných pšenic jsou tetraploidních a hexaploidních, jejichž současná podoba vznikla postupným křížením. Nejdůležitější součástí pšenice jsou její obilky, které jsou zdrojem bílkovin, vlákniny, v menším množství vitamínů a minerálů. Tradičně pěstované jsou odrůdy pšenic s červeným zbarvením obilky.

V současné době se ale velký zájem zaměřuje na pšenice s nestandardním zbarvením obilek, jako je purpurová, žlutá a modrá. Tyto pšenice jsou zajímavé díky obsahu rostlinných barviv, obzvláště anthokyanů, které jsou významné díky svým antioxidačním vlastnostem a možnou prevencí vůči civilizačním chorobám. U standardních odrůd pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) se klade velký důraz na pekařskou kvalitu, která je determinována mnoha faktory, jak genetickými, tak enviromentálními. Významnou vlastností obilek je jejich tvrdost (*Hardness*), důležitá pro mlynářskou jakost. Tvrdost obilek je ovlivňována *Pin* proteiny, lokalizovanými na chromozomu 5D. Důležitou roli hraje obsah a kvalita škrobu v obilkách. Škrob je tvořen podjednotkami amyλόzy a amylopektinu. Jejich poměr je ovlivňován *Waxy* geny, kdy přítomnost nulových alel ukazuje na míru voskovitosti obilky, které jsou žádané v asijských zemích pro výrobu těstovin. Sleduje se také zastoupení a kvalita nízkomolekulárních gluteninů na lokusu *Glu-A3*, jejichž alelické složení udává kvalitu lepku, nepostradatelnou v produkci různých druhů pečiva.

Všechny tyto charakteristiky mají určitou variabilitu v alelickém složení. Jejich detekce a rozlišení se provádí pomocí metod molekulární biologie. Jedná se o metody využívající DNA markery, obvykle založené na PCR, které jsou také velmi nápomocné ve výběru odrůd pro šlechtění v rámci markery asistované selekce.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na problematiku využití molekulárních markerů ve šlechtění pšenice s nestandardním zbarvením obilky se zaměřením na genotypy s purpurovým perikarpem.
- Izolace genomické DNA vybraných genotypů/linií pšenice s purpurovým perikarpem, včetně standardů (kontrol).
- Realizace vlastních PCR reakcí pro detekci markerů využitelných pro markery asistovanou selekci na technologickou u pšenice s nestandardním zbarvením obilky, včetně elektroforetické separace a případné optimalizace PCR protokolů.
- Vyhodnocení a interpretace výsledků, včetně doporučení pro praxi.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Pšenice setá

3.1.1 Systematické zařazení a historie rodu *Triticum*

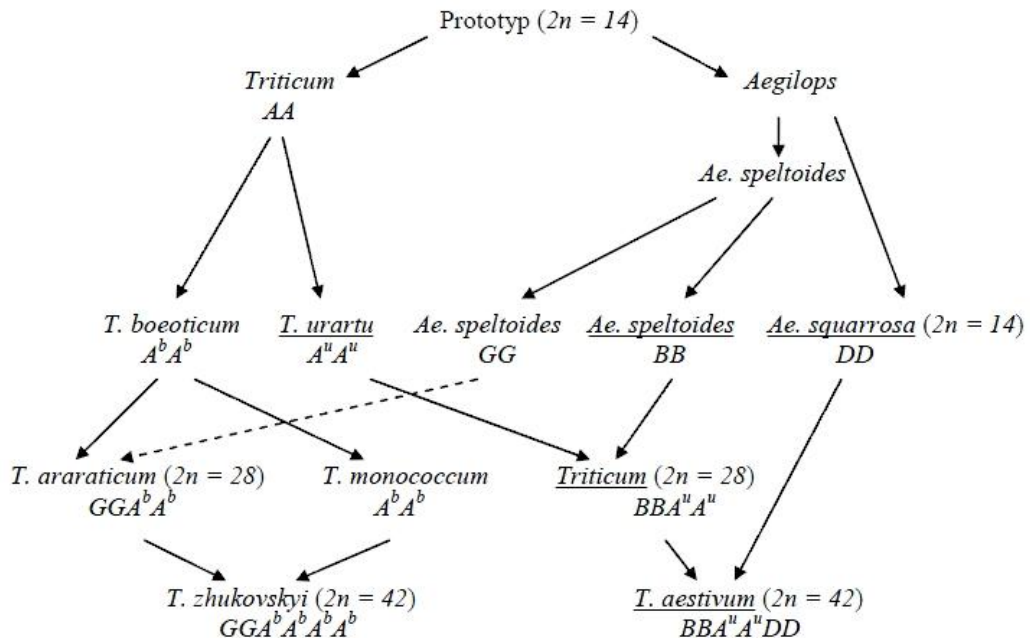
Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednoděložná, cévnatá rostlina, taxonomicky řazena do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Existují 3 podskupiny, které se liší v počtu sad chromozomů, a to diploidní, tetraploidní a hexaploidní. Mezi diploidní ($2n = 2x = 14$) pšenice je řazena pšenice jednozrnka, a to jak planá forma (*T. boeoticum* L.), tak kulturní forma (*T. monoccocum* L.). Jednozrnky se obvykle vyznačují květenstvím typu lichoklas se dvěma kvítky.

Tetraploidní ($2n = 4x = 28$) pšenice zahrnují tvrdé pšenice (*T. durum* Desf.), které jsou významné ve výrobě těstovin a je nejvíce rozšířená v jižní Evropě. Pro tvrdou pšenici je typická neochmýřená, sklovitá obilka s dlouhými osinami.

Nejvýznamnější je ovšem hexaploidní ($2n = 6x = 42$) pšenice, kam řadíme pšenici setou (*T. aestivum* L.) a také velmi známou pšenici špaldu (*T. spelta* L.). U pšenice seté můžeme rozlišit celkem 4 variety – *lutescens*, *ferrugineum*, *milturum* a *erythrospermum*. Typickými znaky je různě hustý lichoklas, osinatý nebo bez osin a nelámavý. Špalda se pěstuje v ozimé i jarní formě, s řidším klasem a pluchatých obilkách (ZIMOLKA et al., 2005).

Původ hexaploidní pšenice sahá až do pozdní doby kamenné, kdy byly pěstovány první domestikované plodiny, zahrnující nejen pšenici, ale i ječmen (GONCHAROV et al., 2008). Během svého vývoje byl genom hexaploidní pšenice pod vlivem různých evolučních sil. Obecně by se dalo říci, že základní struktura je výsledkem velkých genomových přestaveb, polyploidizace, fúze chromozomů, zahrnující ztrátu genů nebo celých chromozomů, pocházejících od různých předků (CHOULET et al., 2010). Na základě molekulárních analýz sekvencí jaderných a chloroplastových DNA byla zjištěna shoda u evolučně starších druhů a vytvořen fylogenetický strom. Společnými předky dnešní pšenice jsou rody *Triticum* a *Aegilops* (Obrázek 1). Analýzy prokázaly, že donorem genomu A je rod *Triticum*, zahrnující *T. monoccocum*, *T. urartu* a *T. boeoticum* L. (GONCHAROV et al., 2008). Rod *Aegilops* je donorem genomu B. Křížením plané *T. urartu* s *Aegilops speltoides*, která již dnes

neexistuje, došlo ke vzniku tetraploidních pšenic (LUO et al., 2007). Následné křížení tetraploidních pšenic s donorem D genomu – *Aegilops squarrosa* L. (syn. *Ae. tauschii* Coss) došlo postupně ke vzniku hexaploidní pšenice *T. aestivum*.



Obrázek 1 Schéma vzniku pšenice (GONCHAROV, 2002).

3.1.2 Charakteristika obilky

Rostliny pšenice mají složený klas, tvořený podobně jako stonek článkovaným větvením, na které přisedají jednotlivé klásky obsahující dva až pět kvítků s plevami. Z vnější strany jednotlivé kvítky chrání pluchy, které mohou být osinaté. Plodem pšenice je obilka, která se skládá ze tří základních částí – embrya, endospermu a obaly (Obrázek 2) (ZIMOLKA et al., 2005).

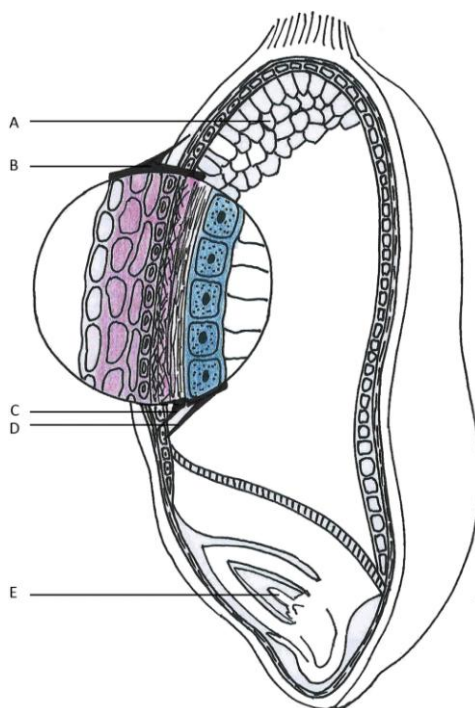
Embryo neboli zárodek je nejmenší částí pšeničné obilky, tvoří asi 3 % její hmotnosti. Nachází se na bázi hřbetní strany obilky. Z vrchní strany je krytý oplodím a osemením. První děloha (štítek) přiléhá k endospermu a na apikální straně se nachází vzrostný vrchol se základy listů, který je krytý blanitou pochvou, koleoptilí. Hypokotyl se zárodky kořenů se nachází na bazální straně (EVERS a MILLAR, 2002). V embryu je obsaženo také velké množství enzymů, především alfa-amylázy schopné štěpit škrob, což snižuje technologickou kvalitu, a proto bývá před mletím mechanicky

odstraňováno. V některých případech se využívají inhibitory enzymů (CORNELL a HOVELING, 1998)

Největší část obilky zaujímá právě endosperm (80 – 85 %). Tvoří ho velké tenkostěnné buňky trojúhelníkových tvarů se škrobovými zrny, které plní zásobní funkci. Na endosperm těsně přiléhá aleuronová vrstva, která je bohatá na proteiny a enzymy důležité pro klíčení (BELDEROK et al., 2000).

Mezi obalové vrstvy řadíme oplodí (*perikarp*) a osemení (*testa*). Pod nimi se nachází aleuronová vrstva, která těsně přiléhá k endospermu. Oplodí tvoří jednovrstevná pokožka, epidermis z celulózových buněk a pod ní nalezneme jednu nebo dvě vrstvy podpokožkových buněk (EVERS a MILLAR, 2002). Hlavní funkcí oplodí je ochrana obilky před mechanickým poškozením, krátkodobými účinky vody a škodlivými látkami (PŘÍHODA et al., 2004).

Osemení je uloženo pod oplodím, v jeho buňkách jsou uložena některá barviva (xanthofyly a karotenoidy), určující vnější vzhled obilky. Také zde nalezneme polysacharidické látky, které přispívají k udržování vlhkosti zrna a mají vliv na bobtnání. Aleuronová vrstva na povrchu endospermu obsahuje z velké části bílkoviny (30 %), také minerální látky a ukládají se zde barviva pro modré zbarvení. Obalové vrstvy jsou obvykle součástí otrub (ŠRÁMKOVÁ et al., 2009).



Obrázek 2 Obilka pšenice na podélném řezu. A – endosperm, B – oplodí, C – testa, D – aleuronová vrstva, E – klíček. Upraveno dle TROJAN et al. (2014).

3.1.3 Chemické složení obilky

Nejpodstatnější část pšeničné obilky tvoří sacharidy, z nichž je zde zastoupena celá řada. Můžeme zde nalézt polysacharidy, škrob, celulózu, hemicelulózy, pentosany, monosacharidy a oligosacharidy. Některé sacharidy zároveň tvoří komplexy s lipidy nebo bílkovinami, v tom případě se jedná o glykolipidy a glykoproteiny. Nejvíce je však zastoupen škrob, a to 50 – 70 %. Škrob slouží jako zásobní látka a je tvořen dvěma základními složkami – amylosem a amylopektinem (PRUGAR et al., 2008). Poměr a obsah amylosem a amylopektinu zásadně ovlivňuje kvalitu škrobu a jeho stravitelnost (NAKAMURA et al., 1993).

Velmi významnou součástí obilky jsou bílkoviny, jejichž základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Jedná se o vysokomolekulární sloučeniny, jejichž struktura a aminokyselinové složení jim dává specifické vlastnosti. Obsah bílkovin v pšeničné obilce je asi 8 – 20 %. Jsou uloženy převážně v aleuronové vrstvě a endospermu.

Dle rozpustnosti se bílkoviny obsažené v obilce rozdělují do čtyř skupin:

- albuminy – rozpustné ve vodě,
- globuliny – rozpustné v solných roztocích,
- gliadiny (prolaminy) – rozpustné v 70% ethanolu,
- gluteniny – částečně rozpustné ve zředěných roztocích slabých kyselin.

Gluteniny a gliadiny jsou zásobními bílkovinami a společně tvoří lepek (CORNELL et al., 1998). Bílkoviny mají zásadní význam v technologické kvalitě a zároveň ovlivňují nutriční a krmné hodnoty (PRUGAR et al., 2008).

Další složkou pšeničné obilky jsou lipidy. Obiloviny obecně obsahují poměrně malé množství tuků (1 – 3 %). Lipidy jsou tvořeny nasycenými mastnými kyselinami, z nichž má největší zastoupení kyselina linolová, dále palmitová, olejová, linolenová nebo kyselina stearová. Svoji úlohu lipidy hrají při hnětení těsta, kdy se některé vážou do struktury lepku. Mohou ale také mít nežádoucí vliv při špatném skladování mouky a vyšší vlhkosti, při kterém může docházet ke žluknutí (PŘÍHODA et al., 2004).

V aleuronové vrstvě a klíčku jsou obsaženy také vitamíny. Můžeme zmínit vitamíny skupiny B, vitamin A, C a E. Jsou to významné antioxidanty, ale jejich obsah v obilovinách je nízký, protože většina jich je obsažena v otrubách, a proto se jich do konečných produktů dostává jen zanedbatelné množství (VACULOVÁ et al., 2003).

Velmi důležitou složkou obilky jsou také rostlinná barviva – xanthofyly, karotenoidy a anthokyany, které jsou popsány v kapitole 3.3.1.

3.2 Kvalita pšenice

Kvalita neboli jakost pšenice je souborem mnoha velmi důležitých znaků, které musí odpovídat určitému standardu na základě požadavků spotřebitelů a zpracovatelů. Kvalitu pšenice také můžeme hodnotit z několika hledisek (ZIMOLKA et al., 2005):

- technologická jakost – obsah účinných látek, zpracovatelnost,
- hygienická jakost – zdravotní nezávadnost,
- nutriční jakost – vyhovění nutričním požadavkům,
- senzorická jakost – vzhled, křupavost,
- užitná jakost – směr a způsob využití, trvanlivost.

Technologická jakost je sice geneticky determinována, ale velký vliv zde hrají i environmentální podmínky, jako počasí, ale také zvolená agrotechnika. Pro technologickou jakost má zásadní vliv obsah a složení bílkovinného komplexu v obilce, a to především u kynutých produktů. Jedná se o bílkoviny endospermu ze skupiny prolaminů, které společně s vodou tvoří lepek (HUBÍK A MAREČEK, 2002). Gluteniny jsou polymerního charakteru, jednotlivé podjednotky jsou spojovány disulfidickými vazbami. Na základě štěpení pomocí redukčních činidel je možné je rozdělit na vysokomolekulární (HMW-GS) a nízkomolekulární (LMW-GS) podjednotky (BUSHUK A BEKÉS, 2002). Tyto podjednotky tvoří alelické kombinace v různých odrůdách a jsou přímo spojeny s pekařskou jakostí pšenice (BRADOVÁ A ŠTOČKOVÁ, 2010). Technologickou jakost můžeme rozdělit na základě hodnocených parametrů (ZIMOLKA et al., 2005):

- Mlynářská jakost – pokusný zámel, objemová hmotnost, hmotnost tisíce zrn, výtěžnost mouky, obsah popela v krupicích, mouce, tvrdost zrn, sklovitost.
- Pekařská jakost – obsah bílkovin, obsah a vlastnosti lepku, sedimentační hodnota, číslo poklesu, fyzikální vlastnosti těsta.

3.2.1 Ukazatele pekařské kvality

Požadavky pro potravinářskou pšenici jsou stanoveny normou ČSN 46 0011-1, dle které musí splňovat dané parametry.

3.2.1.1 Číslo poklesu

Následkem startu klíčení obilky se pomocí hydrolytických enzymů poškozují zásobní látky endospermu, a tím se snižuje číslo poklesu. Nižší číslo poklesu značí horší pekařskou kvalitu, těsto je hůře zpracovatelné a lepivé, výsledné pečivo má menší objem (NOVOTNÝ A HUBÍK, 1997). Zjišťování čísla poklesu spočívá v sledování aktivity alfa-amylázy po vložení suspenze mouky s vodou do vroucí lázně, kdy dojde působením amylázy ke ztekucení škrobu. Pomocí viskozimetrů se měří čas v sekundách, za který dojde k poklesu míchadla o danou vzdálenost. U potravinářské pšenice by hodnota čísla poklesu měla být vyšší než 220 sekund (PŘÍHODA A HRUŠKOVÁ, 2007).

3.2.1.2 Sedimentační test – Zelenyho test

Sedimentační test slouží jako ukazatel viskoelastických vlastností lepkových bílkovin, zodpovědných za udržení plynů pro objem pečiva. Test funguje na principu bobtnání zrn v roztoku kyseliny mléčné. Čím vyšší hodnoty, tím lepší kvalita. Pomocí tohoto testování se vyřazují odrůdy s nízkým obsahem dusíkatých látek a špatnou kvalitou lepku, které jsou nevhodné pro pekařské účely (ZIMOLKA et al., 2005).

3.2.1.3 Objemová hmotnost

Objemová hmotnost souvisí s výtěžností mouky jako ukazatel mlynářské jakosti. Je ovlivňována podmínkami pěstování v daném roce, včasnou sklizní, ale mimo jiné odrůdou (KULP a PONTE, 2000). Je to poměr hmotnosti obilovin vůči objemu. Při stanovení objemové hmotnosti je nutné vysušit zrna na požadovanou vlhkost a odstranění nečistot. Vyjadřuje se v $\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$ (PRUGAR et al., 2008).

3.2.1.4 Obsah lepku

Lepek je velmi důležitou součástí kvality pekařské pšenice. Tvoří jej bílkoviny ze skupiny gluteninů a prolaminů. Samotné složení a poměr těchto bílkovin udávají kvalitu lepku – gluteniny zajišťují pružnost a bobtnavost, zatímco gliadiny tažnost a lepivost (WIESER, 2006). Kvalita lepku se hodnotí pomocí tzv. gluten indexu, který nám dává informaci o pevnosti a zpracovatelnosti těsta (BOTH a CHLOUPEK, 2005).

3.2.1.5 Vlhkost

Vlhkost vyjadřuje obsah vody v celých obilkách pšenice. Stanovuje se v procentech a její maximální obsah je dán normou ČSN pro pekařskou pšenici (ČSN 46 1200-2).

3.2.1.6 Obsah dusíkatých látek

Dusíkaté látky mají vliv na fyzikální i chemické vlastnosti těsta (KULP a PONTE, 2000). Větší obsah dusíkatých látek má pozitivní vliv na těsto a objem pečiva. Naopak nízký obsah dusíkatých látek se snižuje kvalita těsta a tažnost lepku. Stanovuje se pomocí Kjeldahlovy nebo NIR (Near Infra-Red) metody (NOVOTNÝ a HUBÍK, 2006).

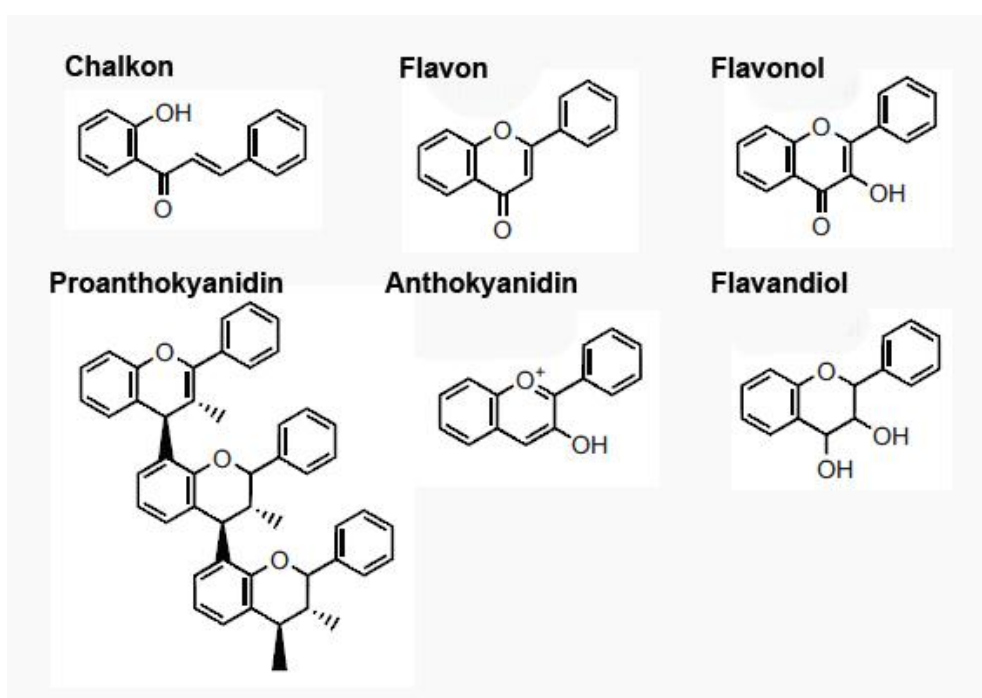
3.2.1.7 Příměsi a nečistoty

Podle norem ČSN 46 1100-2 a ČSN 46 1200-2 jsou jako příměsi definovány zlomky zrn, tedy mechanicky poškozená zrna nebo zrna poškozená škůdci, která propadnou sítím s otvory o průměru 2 mm. Za nečistoty mohou být považována cizí semena, cizí škodlivé látky, náměl, plesnivá nebo jinak napadená zrna. Nečistoty jsou veškerý propad sítím o velikosti otvorů 1 mm (SEDLÁČKOVÁ, 2010).

3.3 Flavonoidy

Pigmenty, které způsobují zbarvení květů, plodů a semen jsou flavonoidy. Jsou to sekundární metabolity, široce rozšířené u rostlin. Můžeme je rozdělit do šesti základních podskupin – chalkony, flavony, flavanoly, flavandioly, anthokyany a proanthokyany nebo kondenzované taniny (Obrázek 3) (FERREYRA et al., 2012).

Luštěniny a menší počet jiných rostlin dokážou syntetizovat specializované flavonoidy, jako jsou isoflavonoidy (WANG, 2011). Bylo identifikováno více než 6000 různých flavonoidů a pravděpodobně to není konečné množství. Odlišné flavonoidy mají rozdílné biologické funkce zahrnující ochranu proti ultrafialovému záření (UV), fytopatogenům, signalizaci během nodulace, transport auxinů nebo zbarvení květů jako atraktant pro opylovače (BRADSHAW a SCHEMSKE, 2003). Flavonoidy jsou také zodpovědné za ochranu buněk listů před fotooxidativním poškozením a předčasnou senescencí. Pravděpodobně nejstarší a nejvíce významné jsou flavonoly, které se účastní stresové reakce (FERREYRA et al., 2012).



Obrázek 3 Struktura základních podskupin flavonoidů. Upraveno podle FERREYRA et al., 2012.

Flavonoidy jsou syntetizovány přes fenyylpropanovou cestu, kde je transformován fenyllalanin na kumaroyl-CoA, který vstupuje do biosyntézy flavonoidů. První enzym specifický pro flavonoidovou dráhu je chalkon syntáza, která tvoří tzv. chalkonové lešení, ze kterého jsou odvozeny všechny flavonoidy. Obecně syntetické dráhy jsou v rostlinách konzervativní a podílí se na nich skupina enzymů jako izomerázy, reduktázy a hydroxylázy. V závislosti na druhu rostliny vznikají různé modifikace a podtřídy flavonoidů (BOWLES et al., 2005).

3.3.1 Anthokyany

Anthokyany jsou bioaktivní látky s fotoprotektivní a antioxidační schopností. (KONG et al., 2003). Jsou zodpovědné za modré, fialové, červené a případně oranžové zbarvení rostlinných pletiv (ŽOFAJOVÁ et al., 2012). Jedná se o sekundární metabolity produkované rostlinami, které jsou tvořené různými sloučeninami. Nejčastěji se jedná o fenolické látky. Jejich hlavní význam spočívá v prevenci chronických chorob, jako je obezita, rakovina, diabetes, kardiovaskulární choroby. Pro lidské zdraví má zásadní význam jejich antioxidační aktivita (MAZZONCINI et al., 2015). Antioxidační účinky závisí na poloze hydroxylové skupiny. Tyto významné látky můžeme nalézt nejen v otrubách, ale také v obilce pšenice, kde se vyskytují v nerozpustné formě (LIYANA-PATHIRANA a SHAHIDI, 2006). U pšenice je obsah a kvalita fenolických sloučenin udávána genotypem, vnějším prostředím, ale i interakcemi mezi nimi (LV et al., 2012).

Protože anthokyany patří do skupiny flavonoidů, jejich biosyntéza probíhá přes fenylypropanoidovou a fenylypropanoidacetátovou cestu, kde významnou roli hrají enzymy fenylyalaninamoniumlyáza (PAL) a tyrosinamoniumlyáza (TAL). Dalšími enzymy, které významně ovlivňují tyto biosyntetické dráhy jsou chalkonsyntáza (CHS), flavanon 3-hydroxyláza (F3H), dihydroflavonol 4-reduktáza (DFR), chalkonisomeráza (CHI) a další (LIN et al., 2003). Produkce anthokyanů je ovlivňována geny, které jsou zároveň zodpovědné za jejich degradaci a zároveň regulačními geny (FICCO et al., 2004). Biosyntetické dráhy jsou stále intenzivně studovány a jejich pochopení může napomoci ve šlechtění nestandardně zbarvených odrůd pšenice a zároveň i navýšení obsahu zdraví prospěšných látek (MARTINEK et al., 2014).

3.4 Pšenice s nestandardním zbarvením obilky

Nestandardní zbarvení obilky je způsobeno syntézou rostlinných barviv, v případě pšenice se jedná převážně o anthokyany ze skupiny flavonoidů. Biosyntéza barviv je ovlivňována geny pro pigmentaci obilek, které jsou považovány za transkripční faktory strukturálních genů pro biosyntézu flavonoidů (WANG A SHU, 2007).

Expres zbarvení obilky se mění v závislosti na tom, jakého původu je dané pletivo. Obilka pšenice se geneticky skládá ze 4 typů pletiv: oplodí (perikarp), osemení, embryo

a endosperm. Osemení a oplodí jsou mateřská pletiva odvozená od plodolistu a vaječných obalů. Vzhledem k tomu, že fialová barva je exprimována v perikarpu, není možné sledovat segregaci mezi jednotlivými zrny uvnitř klasu. V případě triploidního endospermu dvě dávky genetické informace přichází od mateřské a jedna od otcovské rostliny. Protože je aleuronová vrstva součástí endospermu, bude exprese modrého a žlutého zbarvení endospermu záviset na genové dávce, a to může vést k rozdílné segregaci barev mezi zrny dokonce v jednom klasu. Geny pro modrý aleuron a fialový perikarp se nachází na různých chromozomech, proto lze v F_2 generaci pozorovat velkou škálu zbarvení (LACHMAN et al., 2017). Jev kdy, dochází k rozdílné segregaci při reciprokém křížení v F_2 generaci se nazývá fenomén „xenie“ (ZEVEN, 1991).

3.4.1 Červená a bílá pšenice

U naprosté většiny současně pěstované pšenice je zbarvení zrna červené, méně často bílé. Zároveň jsou známy i pšenice s výrazně odlišným zbarvením obilky, které je dáno rostlinnými pigmenty – karotenoidy, flavonoidy, anthokyany, některými fenolickými sloučeninami. Tato barviva v lidském těle mají důležité antioxidační účinky (MARTINEK et al., 2014).

Červené zbarvení je řízeno jednou až třemi dominantními alelami *R-A1*, *R-B1* nebo *R-D1* na chromozomu 3 (MARTINEK et al., 2014). Jediný lokus s exprimující dominantní alelou, je dostačující pro červené zbarvení. Bílé zbarvení je tedy dáno sestavou recesivních alel ve všech třech lokusech. Stupeň červené barvy je dán aditivním účinkem, tzn. určován počtem dominantních alel (LACHMAN et al., 2017).

Barevný pigment je tvořen deriváty katechinu a taninu, které vychází z biosyntézy flavonoidů. S tím samozřejmě souvisí i vyšší obsah hořkých fenolových komponent v červeně zbarvené pšenici, také nižší aktivitu hydrolytických enzymů a lepší odolnost proti klíčení. Fenolické kyseliny jsou nízkomolekulární sloučeniny s antioxidační aktivitou a mohou být v obilkách oxidovány pomocí polyfenol oxidázy na tmavě zbarvené sloučeniny (taniny a ligniny). Ty následně inhibují lipoxygenázu a jsou nekompetitivními inhibitory s protektivní funkcí proti nemocem. Bílé obilky mají nízký obsah polyfenol oxidázy a díky absenci hořkých látek jsou produkty z bílé pšenice přirozeně sladší, což je výhodou například v cukrářství. Pšenice s bílými obilkami

jsou náchylnější ke klíčení, ale mletí umožňuje vyšší výtěžnost z mouky a díky tomu obsahuje více vlákniny, minerálních látek a bílkovin (LACHMAN et al., 2003).

3.4.2 Modrá a žlutá pšenice

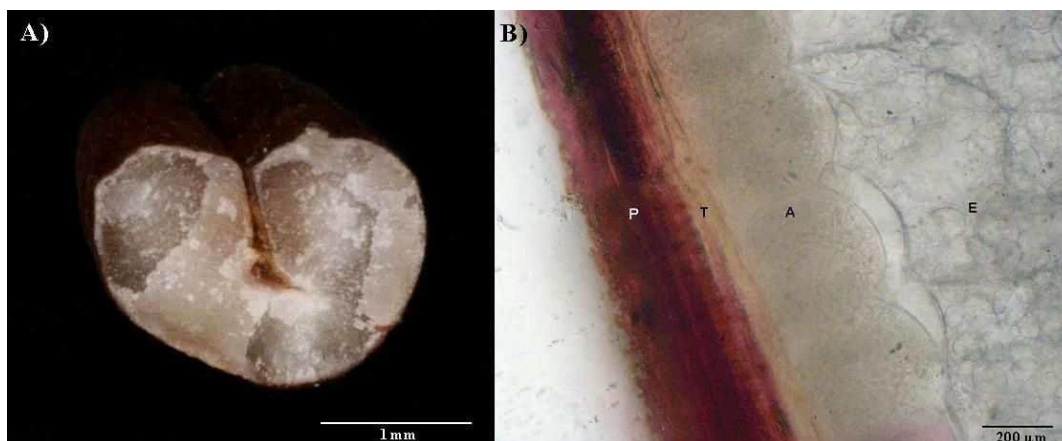
Pšenice s anthokyany obsaženými v aleuronové vrstvě označujeme jako modré pšenice. Linie modrých pšenic mají vnesenou část chromatinu z planých příbuzných pšenic, jako například *Thinopyrum ponticum* a *Triticum monococcum*, které jsou donory genů *Ba1* a *Ba2* zodpovědné za biosyntézu anthokyanů. Tyto geny jsou lokalizovány na dlouhém rameni chromozomu 4A (*Ba2*) a 4B (*Ba1*) (BUREŠOVÁ et al., 2015). Pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) byly detekovány u modrých pšenic delfinidin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, definidin-3-rutinosid a kyanidin-3-rutinosid, patřící mezi anthokyany (ABDEL-AAL et al., 2008).

Žlutě zbarvené obilky pšenice jsou obvykle tetraploidní pšenice tvrdé, díky své pevné struktuře vhodné na výrobu těstovin. Zlatavá barva endospermu pak udává typickou barvu těstovin. Je to způsobeno žlutými pigmenty – luteinem a zeaxanthinem. Žluté zbarvení endospermu je determinováno především dvěma lokusy *Psy1* a *Psy2*, které se nachází na chromozomech 5 a 7. Dokonce i některé hexaploidní pšenice mají žlutý endosperm, ale zbarvení není moc výrazné (LACHMAN et al., 2017).

3.4.3 Purpurová pšenice

Purpurová barva je způsobena geny pro purpurový perikarp (oplodí), označovanými *Pp*, které byly převedeny do pšenice seté z tetraploidní *Triticum turgidum* L. ssp. *abyssinicum*, pocházející z Etiopie. Charakteristická je přítomnost anthokyanů na povrchové vrstvě obilky (perikarpu) (Obrázek 4) (MARTINEK et al., 2014). Největší zastoupení ve fialových obilkách mají sloučeniny kyanidin 3-glukosid, kyanidin 3-rutinosid a sukcinyl glukosid (KNIEVEL et al., 2009). V případě tetraploidní *T. durum* byl gen *Pp* nalezen na krátkém raménku 7B chromozomu, zatímco u hexaploidních pšenic se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7B (KHLESTKINA et al., 2010). U odrůdy Purple Feed byly na chromozomech 7A a 7B identifikovány dva geny *Pp1* a *Pp2*, zatímco u odrůdy Purple byly detekovány *Pp1* a *Pp3* (ARBUZOVA a MAYSTRENKO, 2000). Později bylo

zjištěno, že *Pp3* se skládá ze dvou alel, které byly pojmenovány *Pp3a* a *Pp3b* (DOBROVOLSKAYA et al., 2006). Obě alely se nachází v centromerické oblasti chromozomu 2A (RÜCKSCHLOSS et al., 2010). Na chromozomu 7D, kde se nachází geny pro fialovou barvu je zároveň také lokus *Rc-D1* pro červené zbarvení koleoptile. Homologní sada *Pp1* je popsána jako *Pp-A1* na 7A, *Pp-B1* na 7B a *Pp-D1* na 7D chromozomech. Geny *Pp1* a *Pp3* jsou komplementární, ale kódují odlišné typy transkripčních faktorů (GORDEEVA et al., 2015). Byly studovány účinky kombinací *Pp3* a *Pp1* alel na přepisu *TaMyc1*, který kóduje transkripční faktor *MYC*. V genotypech nesoucích dominantní alelu *Pp3* byl *TaMyc1* silně přepisován v perikarpu a mnohem méně v koleoptile a v listech. Bylo zjištěno, že dominantní alely *Pp1-D1* potlačují transkripci *TaMyc1* (LACHMAN et al., 2017).



Obrázek 4 Purpurový perikarp a) lom zralou obilkou (MARTINEK, ZVÚ Kroměříž, s.r.o.), b) mikroskopický snímek uložení barviva (TROJAN et al., 2011).

3.4.4 Současné využití barevných pšeníc

Vzhledem k tomu, že v posledních letech velmi roste poptávka o potravinách s vyššími přírůsky pro lidské zdraví, zaměřuje se šlechtění rostlin na vyšší obsah anthokyanů, které mají pozitivní účinek na živé organismy, jak bylo zmíněno v kapitole o flavonoidech. Je dobře známo, že anthokyany mají dobré antioxidační účinky aj., ale zároveň je nutné sledovat osud těchto látek v lidském a zvířecím organismu (VARGA et al., 2013).

Doposud byly prováděny výzkumy na laboratorních potkanech, kde se sledoval vliv krmení purpurovou pšenicí, odrůda Konini, na antioxidační aktivitu v játrech. Pro experiment bylo zvoleno 64 jedinců potkanů laboratorního kmene Wistar, pokusná

skupina byla krmena pouze odrůdou Konini s purpurovým zbarvením, zatímco kontrolní skupina potkanů byla krmena běžnou pšenicí. Antioxidační aktivita byla měřena pomocí několika metod – DPPH test, FR (Free radicals method), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) a ABTS test. Experimentální skupina potkanů měla prokazatelně vyšší naměřené hodnoty antioxidační aktivity v játrech (KARÁSEK et al., 2014).

Další výzkumy vlivu purpurové pšenice Konini na kuřatech broilerů. Experimentální skupina byla krmena směsí, obsahující 78 % purpurové pšenice a kontrolní skupina měla v krmivu 78 % běžné pšenice. Sledovala se spotřeba krmiva, přibývání hmotnosti a celková výtěžnost. V tomto experimentu ale bohužel nebyly dostatečně průkazné rozdíly ve prospěch purpurových pšenic (ŠŤASTNÍK et al., 2014).

Další analýzy byly zaměřeny na využití purpurové pšenice Konini pro pekařské účely. Byly hodnoceny parametry mlynářské a pekařské kvality. Hlavní pozornost byla zaměřena na přidání 10 – 30 % otrub do pečiva a sledování jejich vlivu na výsledný produkt. Otruby v tomto případě obsahují vysoké množství anthokyanů, ale zároveň mají negativní vliv na senzorycké vlastnosti pečiva, jako je objem, tvar, textura a chuť. Z výsledných pokusů lze tvrdit, že množství otrub v pečivu by nemělo překročit 10 % z celkového množství, aby se zabránilo jejich negativním vlastnostem (JANEČKOVÁ et al., 2014).

V zahraničí se v současné době využívá purpurová pšenice pro výrobu chleba značky Pur Pur. Jedná se o polskou firmu, působící ve Velké Británii se širokým pečivářským sortimentem (POLISH VILLAGE BREAD, 2017). Na Slovensku působí společnost CELPO spol. s.r.o., která se zabývá výrobou trvanlivých celozrnných chlebiček ze 100 % purpurové pšenice (CELPO, 2017). Na výrobu sušenek z tvrdé purpurové pšenice (*Triticum durum* Desf.) se zaměřili v Itálii. Byly upečeny sušenky z odrůdy CItr 14629 a stejné sušenky z nepigmentované standardní mouky. Následně byl zjišťován obsah anthokyanů, který byl u sušenek z purpurových pšenic poměrně vysoký, zatímco u kontrolních sušenek anthokyanů obsaženy nebyly (PASQUALONE et al., 2015).

Úspěšná aplikace odrůd pšenic s barevnými obilkami bude záviset na úrovni výnosových i agronomických vlastnostech. Ve srovnání se současně pěstovanými standardními odrůdami červené pšenice, výnosově zaostávají a ani nedosahují požadovaných vlastností. Dále bude nutné zjistit, jaký vliv má teplota na rostlinná

barviva a jaké produkty jejich rozpadem vznikají, aby se zamezilo případnému negativnímu vlivu na lidské zdraví (MARTINEK et al., 2014).

3.5 Molekulární markery

Markery jsou výborným nástrojem pro studium variability. Dříve se hojně využívaly markery morfologické pro rozlišování jednotlivých odrůd. Tyto markery ale mají pouze málo fenotypových variant a mohou být ovlivňovány prostředím, proto nejsou vhodné pro studium genetické variability.

Později byly objeveny izoenzymové markery, kdy se využívají různé formy daného enzymu, které katalyzují stejný chemický proces. Ani tyto markery nemohou odhalit celkovou variabilitu, protože se pracuje pouze s kódující částí genomu a vzhledem k degeneraci genetického kódu nelze rozeznat záměny aminokyselin (WHITE A COOKE, 1992).

V současné době se nejvíce využívají molekulární markery, které nám mohou poskytovat informace o alelických variantách ve studovaném lokusu. Mezi molekulární markery řadíme jednak zmíněné allozymy, různé signální sloučeniny nebo barviva, ale především bývají často spojovány s DNA markery (HIMI et al., 2005). Pomocí DNA markerů je možné detekovat polymorfismus přímo v sekvenci DNA, a to jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech genomu. Nejsou ovlivňovány ani stářím zkoumané rostliny (SCHLÖTTERER, 2004). DNA markery můžeme rozdělit do tří skupin (GUPTA et al., 1999):

- Markery založené na hybridizaci se sondou – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- Markery založené na PCR – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), STS (Sequence Tagged Site).
- Markery založené na DNA čipecích a sekvenování – SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

3.5.1 Využití DNA markerů ve šlechtění

Lidé prováděli selekci a domestikaci žádoucích genotypů už v dávných dobách. Během historie se postupně vyvíjely různé metody, jak získat lepší odrůdy, ale k výraznému rozvoji došlo až v minulém století, na základě objevu genetické podstaty dědičnosti, vysvětlení mutací i objev DNA. Požadavky na výnos a kvalitu zemědělských plodin stále stoupají, a proto je nutné vyvíjet efektivní metody pro zjednodušení šlechtění. Rodičovské rostliny musí být velmi pečlivě vybírány. K tomu slouží metody založené na markerech (OVESNÁ et al., 2002).

Velmi často jsou využívány DNA markery ve šlechtění pšenice. Bylo popsáno mnoho metod založených na PCR. Charakteristiky kvality pšenice jako je obsah bílkovin a jejich složení jsou obecně řízeny skupinou více genů, které bývají ovlivněny prostředím. V současnosti jedna z nejpoužívanějších metod pro mapování QTL (lokusy kvantitativních znaků) jsou mikrosatelitní markery, také označované jako SSR. Tyto markery umožňují detekovat polymorfismus u jednotlivých odrůd (OBREHT et al., 2008). Cílem studií QTL je poskytnout informace k pochopení komplexních znaků díky identifikaci a zjišťování relativního vlivu alel na chromozomové oblasti. Nalezené QTL mohou být dále využívány k MAS (Marker Assisted Selection) pro zvýšení efektovnosti šlechtění (CAMPBELL et al., 2003).

Základem kvalitní produkce je materiál odolný vůči biotickému a abiotickému stresu. To je důvodem, proč se provádí také šlechtění na rezistenci zemědělských plodin vůči konkrétním patogenům nebo nepříznivým podmínkám (POLAND et al., 2009). Byly vyvinuty specifické markery pro rezistenci vůči rzi a padlí (ŠLIKOVÁ et al., 2004).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

Pro vlastní analýzy bylo použito 18 vzorků pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) s nestandardním zbarvením obilky. Vzorky byly poskytnuty Ing. Petrem Martinkem CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž s.r.o. (Tabulka 1). Pro detekci alel lokusu *Glu-A3* byly využity kontrolní vzorky z Genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. Jednalo se o odrůdy: Chinese Spring (*Glu-A3a*), Gabo (*Glu-A3b*), Gawain (*Glu-A3c*), Abbodanza (*Glu-A3d*), Liocorno (*Glu-A3e*), Apostle (*Glu-A3f*) a Glenlea (*Glu-A3g*).

Tabulka 1 Přehled genotypů pšenice seté pro analýzy.

Název	Barva obilky
V1-142-15	Purpurová
V1-143-15	Purpurová
V2-60-15	Purpurová
V2-62-15	Purpurová
KM 178-14*)	Purpurová
V3-5ab-15	Purpurová
V1-170-15	Purpurová
V1-169-15	Purpurová
V1-168-15	Purpurová
V1-167-15	Purpurová
PS Karkulka	Purpurová
V2-98-15	Purpurová
V2-95-15	Purpurová
V2-68-15	Purpurová
V1-176-15	Purpurová
V1-175-15	Purpurová
Bohemia**)	Červená
Vanessa**)	Červená

Vysvětlivky: *) – linie testovaná v oficiálních státních odrůdových zkouškách,

***) – kontroly.

4.2 Metodika

Vlastní molekulárně biologické analýzy sestávaly z následujících kroků:

- Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA,
- Polymerázová řetězová reakce (PCR), s využitím specifických primerů,
- Elektroforetická separace na agarózovém gelu,
- Vyhodnocení výsledků.

4.2.1 Izolace rostlinné DNA, kontrola čistoty

Jednotlivé vzorky genotypů byly vysety na Petriho misky, na filtrační papír. Po 5 - 7 dnech byly odebrány vzorky DNA po 100 mg z klíčnicích rostlin pšenice seté, vždy do 2 zkumavek. Část vzorků byla uložena do hlubokomrazicího boxu (-70 °C). DNA byla extrahována pomocí manuálu ke kitu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2012), díky kterému je možné získat celou genomovou DNA – jadernou, mitochondriální i chloroplastovou.

Měření a zjišťování čistoty koncentrace extrahované DNA (ng/μl) bylo provedeno pomocí přístroje Picodrop Spectrometr PICO100 (Picodrop™). Naměřené hodnoty byly dostatečné pro následné analýzy.

4.2.2 PCR

Pro detekci vybraných alel na lokusech *Pina* a *Pinb*, které kódují geny pro tvrdost obilku (*Ha*), byly použity specifické markery podle HUANG, BRÛLÉ-BABEL (2011) (Tabulka 3). Dále byly použity specifické primery pro identifikaci nulových alel pro *Waxy*-geny pšenice podle McLAUCHLAN et al. (2001) (Tabulka 4). Pro identifikaci alel na lokusu *Glu-A3* byly použity alelově specifické STS markery, založené na jednonukleotidových polymorfizmech, navržené podle WANG et al. (2010). Jednotlivé primery použité pro analýzu jsou v tabulce 5.

Reakční směs pro PCR byla připravena postupným přidáváním jednotlivých složek do mikrozkuavky, přesně podle protokolu (Tabulka 2). Takto připravený MasterMix byl rozdělen do mikrozkuavek pro PCR po 24 μl a následně byl přidán 1 μl templátové DNA, která byla dříve izolována. Tyto PCR mikrozkuavky byly pečlivě uzavřeny

a vloženy do jamek termocyklieru T3 (Biometra), kde byl nastaven příslušný program s nastavenými PCR podmínkami.

Pro *Pin a/b*: 5 min při 94°C,
30 s při 95°C 35 cyklů,
30 s při 60°C,
90 s při 72°C,
10 min při 72°C závěrečná extenze (elongace).

Pro *Waxy* geny: 2 min 94°C,
1 min při 94°C 33 cyklů,
2 min při 54°C ,
2 min při 72°C .

Pro *Glu-A3*: 5 min 94°C,
35 s při 94°C 38 cyklů,
35 s při 60°C a
90 s při 72°C,
8 min při 72°C závěrečné extenze (elongace).

Tabulka 2 Složení mastermixu (pro 1 vzorek).

Složky reakce	Množství (μ l)
deionizovaná H ₂ O	16,8
pufř	5
dNTP	0,1
primer (začínající - F)	1
primer (končící – R)	1

Tabulka 3 Primery použité pro analýzu lokusu *Pina* a *Pinb* (upraveno dle HUANG, BRÚLÉ-BABEL, 2011).

A Marker	Alela	Velikost produktu (bp)	B Marker	Alela	Velikost produktu (bp)
STS1	<i>Pina-D1a</i>	704	SNP G	<i>Pinb-D1a</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	922	SNP A	<i>Pinb-D1b</i>	226
STS2	<i>Pina-D1a</i>	704	SNP G	<i>Pinb-D1a</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	1033	SNP A	<i>Pinb-D1b</i>	232
STS3	<i>Pina-D1a</i>	744	SNP T	<i>Pinb-D1a</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	922	SNP C	<i>Pinb-D1c</i>	269
STS4	<i>Pina-D1a</i>	744	SNP C	<i>Pinb-D1c</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	1033	SNP T	<i>Pinb-D1a</i>	269
STS5	<i>Pina-D1a</i>	463	SNP T	<i>Pinb-D1a</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	792	SNP A	<i>Pinb-D1d</i>	237
STS6	<i>Pina-D1a</i>	503	SNP A	<i>Pinb-D1d</i>	423
	<i>Pina-D1b</i>	792	SNP T	<i>Pinb-D1a</i>	236
STS7	<i>Pina-D1a</i>	407			
	<i>Pina-D1b</i>	736			
STS8	<i>Pina-D1a</i>	447			
	<i>Pina-D1b</i>	625			
STS9	<i>Pina-D1a</i>	447			
	<i>Pina-D1b</i>	736			

Tabulka 4 Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu *Waxy*, upraveno dle MCLAUHLAN et al. (2001).

Název	Sekvence	Amplifikovaný lokus
#4F	AAGAGCAACTACCAGT	<i>Wx-A1, Wx-B1a Wx-D1</i>
#4R	TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	

Tabulka 5 Alelově specifické PCR markery pro identifikaci *Glu-A3*, upraveno dle WANG et al. (2010).

Set primerů	Sekvence (5' - 3')	Cílová alela	Velikost produktu (bp)
LA1F	AAACAGAATTATTAAGCCGG	<i>a</i>	529
SA1R	GGTTGTTGTTGTTGCAGCA		
LA3F	TTCAGATGCAGCCAAACAA	<i>b</i>	894
SA2R	GCTGTGCTTGGATGATACTCTA		
LA1F	AAACAGAATTATTAAGCCGG	<i>ac</i>	573
SA3R	GTGGCTGTTGTGAAAACGA		
LA3F	TTCAGATGCAGCCAAACAA	<i>d</i>	967
SA4R	TGGGGTTGGGAGACACATA		
LA1F	AAACAGAATTATTAAGCCGG	<i>e</i>	158
SA5R	GGCACAGACGAGGAAGGTT		
LA1F	AAACAGAATTATTAAGCCGG	<i>f</i>	552
SA6R	GCTGCTGCTGCTGTGTAAA		
LA1F	AAACAGAATTATTAAGCCGG	<i>g</i>	1345
SA7R	AAACAACGGTGATCCAATAA		

4.2.3 Elektroforetické separace na agarózovém gelu

Pro analýzy alelových variant *Glu-A3*, *Pin* a nulových alel *Waxy* genů byl použit 1 % agarózový gel, připravený podle následujícího postupu: 1891 ml destilované vody bylo smícháno s 38 ml 50x TAE puftru (trisacetátový puftr). Z roztoku bylo odlito cca 270 ml do lahve a přidáno 2,8 g agarózy, odvážené na analytických vahách. Vzniklá směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě až k varu. Mezitím byla sestavena vanička pro nalévání gelu, společně s hřebenem, sloužícím ke tvorbě jamek pro vzorky DNA. Po rozvaření agarózy s roztokem puftru a následném zchlazení byly přidány 2 µl ethidium bromidu, což je fluorescenční barvivo, které se váže na dvoušroubovici DNA a pod UV světlem svítí. Díky tomu je možné z gelu detekovat pozitivní výskyt alel. Takto připravený horký gel byl přelit do sestavené vaničky a případné vzduchové bubliny byly odstraněny. Poté gel tuhnul cca 20 minut v digestoři. Po vyjmutí hřebenu ze ztuhlého gelu byla vanička přenesena

do elektroforetické vany a zalita zbytkem naředěného TAE pufru. Gel byl připraven pro nanášení vzorků. Jednotlivé složky pro přípravu gelu jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6 Komponenty pro přípravu 1 % agarózového gelu, pro systém Agagel Maxi (Biometra).

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Použité množství
Agaróza (Serva, USA)	-	2,8 g
TAE pufr	50x	38 ml
Destilovaná voda	-	1891 ml
Ethidium bromid (Serva, USA)	10 mg/ml	2 μ l

Horizontální elektroforéza byla provedena v systému Agagel Maxi (Biometra). Vzorky DNA byly napipetovány po 20 μ l do gelu, zalitého pufrém. Elektroforetická vana byla zakryta bezpečnostním krytem a aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Zdroj jednosměrného napětí byl dodáván pomocí Minicell Power Pack P20 (Biometra). Analýzy probíhaly při napětí cca 70 – 80 V, po dobu 1 - 2 hodin.

Po ukončení elektroforézy byla soustava odpojena od proudu a gel vyjmut i s vaničkou z pufru. Výsledné produkty na gelu byly vizualizovány pomocí kamery pod UV lampou v transiluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc.). K zaznamenání obrazu byla použita softwarově ovládaná černobílá kamera CCTV (Panasonic).

4.2.4 Vyhodnocení výsledků

Produkty amplifikace pomocí PCR vizualizované na agarózovém gelu byly následně porovnány s velikostními markery, na základě velikosti produktu. Byly využity 100 bp DNA Ladder (Promega) a pBR322 DNA *HaeII* (ABgene).

5 VÝSLEDKY

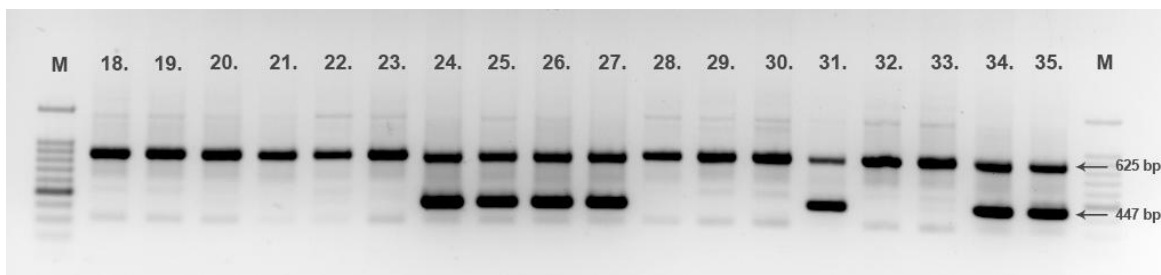
5.1 Detekce alel *Pina-D1* a *Pinb-D1*

Pro detekci genů tvrdosti byly použity primery navržené dle (HUANG, BRÛLÉ-BABEL, 2011). Pomocí kombinací 9 STS markerů (Tabulka 3) pro *Pina* a 4 kombinací markerů pro *Pinb* bylo analyzováno 18 vybraných genotypů (Tabulka 1). V případě *Pina* jsme detekovali dvě alely pro každý genotyp - *Pina-D1a* a *b* (Tabulka 7). U vybraných vzorků byly detekovány v 44% alely *Pina-D1a*, u těchto vzorků ale byla zároveň detekována i alela *Pina-D1b* (Obrázek 5). Přítomnost alely *Pina-D1b* byla totiž detekována u všech analyzovaných vzorků. V případě *Pinb-D1* (Obrázek 6) byly analyzovány 4 alely (*Pinb-D1a*, *b*, *c* a *d*). Alela *Pinb-D1c* se vyskytovala nejčastěji, a to u 44 %. V některých případech byla detekována přítomnost specifický produktů u čtyř různých alel zároveň (*a*, *b*, *c* a *d*). U deseti analyzovaných vzorků (56 %) nebyla detekována přítomnost specifického produktu pro námi testované alely (Tabulka 7).

Tabulka 7 Alelická skladba pro lokusy *Pina* a *Pinb*.

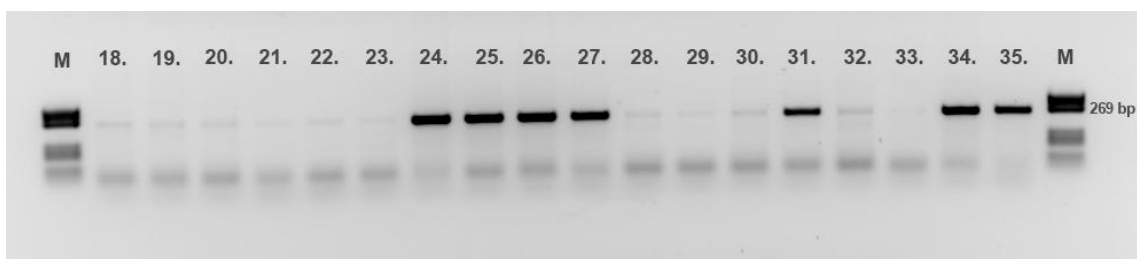
Název	Barva	Výsledná alela	
		<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
V1-142-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V1-143-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V2-60-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V2-62-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
KM 178-14	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V3-5ab-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>c</i>
V1-170-15	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>
V1-169-15	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>
V1-168-15	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>a/b/c/d</i>
V1-167-15	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>a/b/c/d</i>
PS Karkulka	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>ND</i>
V2-98-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V2-95-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V2-68-15	Purpurová	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-176-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
V1-175-15	Purpurová	<i>b</i>	<i>ND</i>
Bohemia	Červená	<i>a/b</i>	<i>a/b/c/d</i>
Vanessa	Červená	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>

Vysvětlivky: *ND* – nedetekováno



Obrázek 5 Detekované alely *Pina-D1a* a *Pina-D1b*.

Vysvětlivky: **18** – V1-142-15, **19** – V1-143-15, **20** – V2-60-15, **21** – V2-62-15, **22** – KM 178-14, **23** – V3-5ab-15, **24** – V1-170-15, **25** – V1-169-15, **26** – V1-168-15, **27** – V1-167-15, **28** – PS Karkulka, **29** – V2-98-15, **30** – V2-95-15, **31** – V2-68-15, **32** – V1-176-15, **33** – V1-175-15, **34** – V2-95-15, **35** – Bohemia; **M** – velikostní marker.

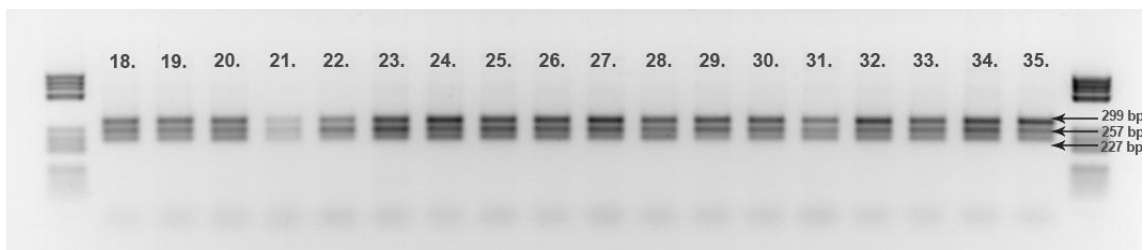


Obrázek 6 Detekované alely *Pinb-D1c*.

Vysvětlivky: **18** – V1-142-15, **19** – V1-143-15, **20** – V2-60-15, **21** – V2-62-15, **22** – KM 178-14, **23** – V3-5ab-15, **24** – V1-170-15, **25** – V1-169-15, **26** – V1-168-15, **27** – V1-167-15, **28** – PS Karkulka, **29** – V2-98-15, **30** – V2-95-15, **31** – V2-68-15, **32** – V1-176-15, **33** – V1-175-15, **34** – V2-95-15, **35** – Bohemia; **M** – velikostní marker.

5.2 Detekce nulových alel *Waxy* genů

K analýzám bylo opět použito 18 genotypů uvedených v tabulce 1 a primery navržené podle MCLAUHLAN et al. (2001) uvedené v tabulce 3. Tyto primery jsou navrženy tak, aby amplifikovaly všechny tři kopie GBSS (Granule-bound starch synthase) genu v genomu A, B i D. Největší fragment byl u D genomu 299 bp, u genomu A byl fragment o velikosti 257 bp, nejmenší 227 bp u genomu B. U testovaných genotypů nebyla detekována nulová alela (Obrázek 7).



Obrázek 7 PCR produkty *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1*.

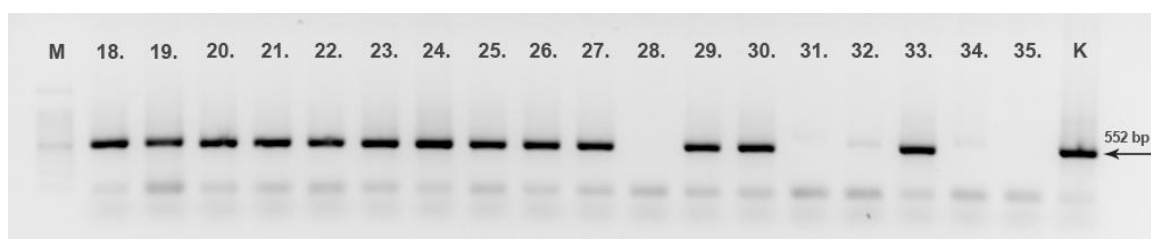
Vysvětlivky: **18** – V1-142-15, **19** – V1-143-15, **20** – V2-60-15, **21** – V2-62-15, **22** – KM 178-14, **23** – V3-5ab-15, **24** – V1-170-15, **25** – V1-169-15, **26** – V1-168-15, **27** – V1-167-15, **28** – PS Karkulka, **29** – V2-98-15, **30** – V2-95-15, **31** – V2-68-15, **32** – V1-176-15, **33** – V1-175-15, **34** – V2-95-15, **35** – Bohemia; **M** – velikostní marker.

5.3 Analýza nízkomolekulárních gluteninů

V tabulce 8 jsou shrnuty detekované alely u vybraných 18 genotypů (Tabulka 1). Nejčastěji se vyskytovala varianta *Glu-A3fd*, a to u 100 % testovaných vzorků. Alely *Glu-A3c* (16 %) a *Glu-A3f* (72 %) se vyskytovaly méně často (Obrázek 8), avšak zároveň s alelou *Glu-A3d*. Ostatní varianty alel (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3e*, *Glu-A3g*) nebyly detekovány. Mezi testovanými genotypy se vyskytovaly pouze dvě homozygotní linie (výskyt jedné alely ve vzorku: PS Karkulka a Vanessa).

Tabulka 8 Alelická skladba pro lokus *Glu-A3*.

Název	Barva	Výsledná alela
		<i>Glu-A3</i>
V1-142-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V1-143-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V2-60-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V2-62-15	Purpurová	<i>d/f</i>
KM 178-14	Purpurová	<i>d/f</i>
V3-5ab-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V1-170-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V1-169-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V1-168-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V1-167-15	Purpurová	<i>d/f</i>
PS Karkulka	Purpurová	<i>d</i>
V2-98-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V2-95-15	Purpurová	<i>d/f</i>
V2-68-15	Purpurová	<i>c/d</i>
V1-176-15	Purpurová	<i>c/d</i>
V1-175-15	Purpurová	<i>d/f</i>
Bohemia	Červená	<i>c/d</i>
Vanessa	Červená	<i>d</i>



Obrázek 8 PCR produkty získané pomocí markeru *Glu-A3f*.

Vysvětlivky: **18** – V1-142-15, **19** – V1-143-15, **20** – V2-60-15, **21** – V2-62-15, **22** – KM 178-14, **23** – V3-5ab-15, **24** – V1-170-15, **25** – V1-169-15, **26** – V1-168-15, **27** – V1-167-15, **28** – PS Karkulka, **29** – V2-98-15, **30** – V2-95-15, **31** – V2-68-15, **32** – V1-176-15, **33** – V1-175-15, **34** – V2-95-15, **35** – Bohemia; **K** – kontrolní vzorek (*Apostle*), **M** – velikostní marker.

6 DISKUZE

6.1 Markery tvrdosti obilky

Tvrдость obilky je velmi důležitá charakteristika pro pekařské účely i technologickou kvalitu (CHEN et al., 2007). Mouka z pšenice s tvrdší obilkou je nejvhodnější pro pečení chleba a mouka z měkké pšenice se využívá hlavně na koláče, pečivo a sušenky (HUANG, BRÚLÉ-BABEL, 2011). Struktura endospermu může být sklovitá (tvrdá) nebo moučná (škrobová). Moučný endosperm obsahuje obvykle vyšší podíl škrobu než proteinů ve srovnání se sklovitým endospermem. Tvrдость je definována jako odolnost materiálu vůči průniku cizorodé látky (PSOTA et al., 2008). Tvrдость obilky je ovlivňována především genetickými faktory a determinována primárně lokusem *Ha* (hardness, tvrdost), který tvoří komplex tří úzce vázaných genů *Pina*, *Pinb* a *GSP-1*, které byly nalezeny na chromozomu 5D (CHANTRED et al., 2004). Pšenice obsahuje dva typy proteinů – purinoindolin a (*Pina*) a purinoindolin b (*Pinb*). Přítomnost těchto proteinů zásadně ovlivňuje tvrdost zrna (BHAVE a MORRIS, 2008).

Byly identifikovány dvě alely na lokusu *Pina-D1*, a to *Pina-D1a*, která se obvykle vyskytuje v planých formách a *Pina-D1b*, jejíž nulová forma prezentuje genotypy s tvrdou obilkou. Také byly objeveny čtyři alely pro lokus *Pinb-D1*, označované *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* a *Pinb-D1d*. Tyto alely se od sebe liší v jediném nukleotidu. Kultivary pšenice, obsahující alely *Pinb-D1b,c* nebo *d* vykazují tvrdou strukturu, oproti měkkým pšenícím mající alelu *Pinb-D1a*. Zdá se tedy, že *Pina-D1* se výrazně podílí na tvorbě měkkých obilek, jak bylo prokázáno u pšenic s alelou *Pinb-D1a* a chybějící *Pina-D1* vykazovaly tvrdá zrna (CORONA et al., 2001). V současné době bylo již identifikováno mnohem více alel u zmíněných genů a bylo vyvinuto mnoho metod pro stanovení jednonukleotidového polymorfizmu (SNP), které jsou založeny na ligaci oligonukleotidu a vytvoření primeru specifického pro danou alelu (HUANG, BRÚLÉ-BABEL, 2011).

Detekce více alel v jednom vzorku může ukazovat na příměsi ve vzorcích nebo heterozygoty. Jedná se o maloparcelkové pokusy, kde je vyšší nebezpečí příměsí. Jelikož máme směsný vzorek z více rostlin dané odrůdy, byly by nutné další doplňující analýzy, například sekvenace PCR produktů, následně pomocí bioinformatické analýzy ověřit o jakou alelu se jedná. U genotypů, které netvořily PCR produkt, by bylo vhodné

provést srovnání sekvencí s databází a nové navrzení primerů, společně s jejich otestováním. Víceméně všechny analyzované vzorky vykazují genetické dispozice pro *hardness* (tvrdé) obilky, protože u nich byla detekována alela *Pina-D1b*, charakterizující tvrdé obilky. V tomto případě by bylo vhodné provést analýzy tvrdosti obilky a následně srovnat s provedenými molekulárními analýzami.

6.2 Detekce nulových alel *Waxy* genů

Škrob v pšeničných obilkách tvoří převážnou část (65 – 75 % v sušině), jehož chemické složení ovlivňuje výslednou kvalitu produktů. Jedná se o polymerní sloučeninu, složenou ze dvou základních podjednotek – amylozy a amylopektinu (VANZETTI et al., 2009). Poměr těchto složek se obvykle pohybuje 20 – 30 % amylozy a 70 – 75 % amylopektinu (GUZMÁN a ALVAREZ, 2016). Syntéza amylozy je regulována enzymem GBSS (granule-bound starch synthase), také označovaným jako voskový (*waxy*) protein. Protože je běžná pšenice allohexaploidní, je tento enzym kódován třemi homologními *waxy* geny, které jsou lokalizovány na krátkém rameni chromozomu 7A (*Wx-A1*), 7D (*Wx-D1*) a na dlouhém rameni chromozomu 4A (*Wx-B1*), který je translokován z chromozomu 7B (YAMAMORI et al., 1994). Jestliže jsou funkční pouze jeden nebo dva *waxy* geny, pšenice je označována jako částečně vosková, zatímco genotypy s nulovými alelami ve všech třech lokusech, jedná se o pšenici s voskovou obilkou. V takovém případě škrob téměř neobsahuje amylozové podjednotky, ale pouze amylopektinové (MARYAMI et al., 2014). Voskové nebo částečně voskové typy pšenice jsou velmi žádané pro produkci asijských těstovin (MA et al., 2013). Největší vliv na obsah amylozy a kvalitu byl pozorován u mutantů *Wx-B1*, potom *Wx-D1* a nakonec *Wx-A1* (YAMAMORI, QUYNH, 2000). V několika studiích bylo prokázáno, že absence alel *Wx-A1* nebo *Wx-D1* nemusí mít za následek výrazný úbytek amylozy, což naznačuje možný kumulativní účinek alel.

Byly prováděny i pekařské pokusy s úplně voskovou pšenicí (tři nulové alely). Výrobky z této mouky měly vysoký objem pečiva, avšak během dne po upečení se objem ztrácel v důsledku nestabilní struktury, vzhled pečiva také nebyl uspokojivý a měl tmavě hnědou barvu s velkými póry (GUZMÁN a ALVAREZ, 2016). Můžeme tedy tvrdit, že pšenice s vyšším podílem amylopektinu nejsou příliš vhodné pro pekařské účely, zato nachází využití v průmyslu pro výrobu např. biodegradabilních škrobů

a výrobků z nich, které ekologicky nezatěžují životní prostředí. Analyzované genotypy purpurových pšenic nemají žádnou mutaci v lokusech, nemají nulové alely. Proto spíše vyhovují požadavkům na evropské pšenice, ale i přesto jsou na asijském trhu žádané.

6.3 Analýza nízkomolekulárních gluteninů

Obilky pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) jsou jedinečné pro svoji schopnost tvořit těsto s dobrými reologickými vlastnostmi v široké škále potravin (HE et al., 2005). Velmi podstatnou částí zásobních bílkovin v obilce pšenice jsou monomerní gliadiny a polymerní gluteniny, protože jsou hlavními složkami lepku (BRANLARD et al., 2003). Gluteniny rozdělujeme dle molekulové hmotnosti na vysokomolekulární (HMW-GS) a nízkomolekulární (LMW-GS) podjednotky. Společně jsou drženy pohromadě disulfidickými vazbami, které formují polymerní sloučeninu. Pomocí nekovalentních interakcí v přítomnosti vody reaguje gluteninový polymer s gliadiny za vzniku lepku (SHEWRY et al., 2001). Na kvalitě bílkovinného komplexu se mohou mimo vnitřních (genetických) faktorů podílet i vnější faktory jako je výživa dusíkem podílet nebo výživa sírou ve vztahu k zastoupení sírných aminokyselin důležitých pro tvorbu disulfidických vazeb. Možnostmi zlepšení kvality lepku při hnojení pšenice sírou se zabýval HŘIVNA et al. (2015). Byl porozován vyšší obsah proteinu a lepší hodnoty Zeleného testu, ale toto zvýšení nebylo statisticky průkazné.

Nízkomolekulární gluteniny jsou kódovány geny lokalizovanými na lokusu *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3* a *Glu-D3*) na krátkém rameni chromozomu 1A, 1B a 1D (WANG et al., 2010). Díky aditivnímu účinku a epistatickým interakcím mají společně s vysokomolekulárními gluteniny zásadní vliv na kvalitu (LUO et al., 2001). Bylo identifikováno přes 20 různých alel, zahrnující sedm na lokusu *Glu-A3* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* a *g*), devět pro lokus *Glu-B3* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*, *i*) a pět pro lokus *Glu-D3* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*) Pro lokus *Glu-A3* byl identifikován jeden gen se sedmi alelickými formami, získanými z odlišných odrůd a vytvořeny STS markery pro jejich rozlišení (ZHANG et al., 2004).

Alely lokalizované na lokusu *Glu-A3* významně ovlivňují jak množství, tak velikost polymerů v těstu. Nejvíce pozitivní vliv na odpor a tažnost těsta má přítomnost alel *Glu-A3a*, *c*, *d* a *f*. (ZHANG et al., 2004). V našich analyzovaných vzorcích byly detekovány dvě z těchto alel (*Glu-A3d* a *f*), můžeme proto říci, že vybrané genotypy

mohou mít žádané kvalitativní vlastnosti pro pekařské účely. Ve většině vzorků jsme detekovali obě alely zároveň, což je pravděpodobně způsobeno metodikou pěstování (maloparcelkové polní pokusy), kde je vyšší pravděpodobnost příměsí. Zároveň jsme pracovali se směsnými vzorky z více rostlin.

6.4 Polní podmínky pěstování vybraných genotypů

6.4.1 Charakteristika vegetačního roku 2015/2016

Vegetační rok 2015/2016 by se dal zařadit mezi silně teplé s průměrnou odchylkou teplot (Tabulka 9) a normálním úhrnem srážek (93 % dlouhodobého průměru), který byl podobný předcházejícímu roku, ovšem průběh počasí byl velmi nevyrovnaný. V podzimních měsících se prohluboval deficit srážek z předchozího roku, následoval průměrný leden a srážkově velmi nadprůměrný únor (263 % dlouhodobého úhrnu). Následující měsíce se střídaly sušší, normální i vlhké, jak je uvedeno v tabulce 10.

Zima 2015/2016 byla podobně jako v posledních letech mírná, v době největších mrazů byla na zemi cca 5 cm pokrývka sněhu, takže nebyly poškozeny porosty ozimých rostlin. Pozitivní vliv mělo počasí na rostliny v únoru, který byl mimořádně teplý s vysokým úhrnem srážek. Začátek jara byl podobný předchozím rokům s průměrnými teplotami, během velmi teplého dubna začínaly obilniny sloupkovat. Následovalo prudké ochlazení, které mělo za následek poškození kvetoucích stromů, ale naštěstí žádný zásadní vliv na polní plodiny. V létě docházelo k větším výkyvům počasí, ale celkově byly tyto měsíce spíše normální.

Tabulka 9 Průměrné teploty vzduchu 2015/2016 v Kroměříži.

Měsíc	Dlouhodobý průměr (1971 – 2010) (°C)	Průměrná teplota (°C)	Odchylka od dlouhod. Průměru (°C)	Charakteristika měsíce
Září	14,3	15,6	1,3	teplý
Říjen	9,3	9,1	-0,2	normální
Listopad	4	6,5	2,5	silně teplý
Prosinec	0,1	3,1	3	silně teplý
Leden	-1,3	-1,1	0,2	normální
Únor	0,4	4,9	4,5	mimořádně teplý
Březen	4,3	5,2	0,9	normální
Duben	9,4	9,6	0,2	normální
Květen	14,5	14,9	0,4	normální
Červen	17,3	19,3	2	teplý
Červenec	19,2	20,6	1,4	teplý
Srpen	18,8	19	0,2	normální
Rok	9,2	10,6	1,4	silně teplý

Tabulka 10 Suma srážek 2015/2016 v Kroměříži.

Měsíc	Dlouhodobý průměr (1971 – 2010) (mm)	Suma srážek (mm)	Procenta k dlouhodobému průměru (%)	Charakteristika měsíce
Září	54,2	22,6	42	suchý
Říjen	38,5	24,6	64	normální
Listopad	40	31,1	78	normální
Prosinec	33,3	13,7	41	suchý
Leden	24,9	21,8	88	normální
Únor	26,6	69,9	263	mimořádně vlhký
Březen	32,8	21,8	66	normální
Duben	40,7	73,8	181	silně vlhký
Květen	66,1	39,1	59	suchý
Červen	80,6	51,4	64	suchý
Červenec	73,6	123	167	vlhký
Srpen	65,6	43,4	66	suchý
Rok	576	536,2	93	normální

6.4.2 Agrotechnika pokusů 2015/2016 pro ozimou pšenici

Testované genotypy barevných pšenic byly pěstovány ve vegetačním období 2015/2016 v Agrotest Fyto s.r.o. Kroměříž. Ozimé pšenice byly vysety v první polovině října (6. 10. 2015) po ozimé řepce na lokalitě hon Terezov. Výsevek byl 4 mil. klíčivých zrn/ha. Do konce října došlo ke vzházení a před nástupem zimy byly porosty odnožené. Byly vedeny výnosové zkoušky na parcelách o velikosti 10 m², vždy ve

čtyřech opakováních. První a druhé opakování představovalo nižší intenzitu pěstování (jen s regeneračním hnojením a jedním fungicidním ošetřením), třetí a čtvrté opakování bylo vedeno jako intenzivní (se třemi dávkami hnojení, morforegulátorem růstu a dvěma fungicidy). Sklizeň proběhla 23. – 24. 7. 2016. Pro hodnocení bylo použito zrno z nízké intenzity pěstování bez ošetření fungicidy (MARTINEK, 2017, osobní sdělení). V tabulce 11 jsou uvedené výnosy sklizně a některé ukazatele jakosti zrna.

Na základě naměřených hodnot v tabulce 11 můžeme vidět, že některé výnosové i jakostní parametry pěstovaných genotypů purpurových pšenic jsou celkově nižší, než u standardně pěstovaných odrůd. Proto by se následovně šlechtění odrůd těchto pšenic mělo zaměřit na zlepšení výnosových parametrů.

Tabulka 11 Výnosové a kvalitativní parametry vybraných genotypů pšenice s nestandardním zbarvením obilky.

Genotyp	Barva	Výnos (t/ha)***)	Hmotnost tisíce semen (g)	Objemová hmotnost (kg/hl)	Obsah dusíku (N×5.7) v sušině (%)	Pádové číslo (s)	Zeleného test (ml)	Gluten index
								(-)
V1-142-15	<i>Pp</i>	9,02 c-k	36,8	78,2	12,5	392	30	77
V1-143-15	<i>Pp</i>	9,49 b-j	33,8	77,6	12,7	405	35	77
V2-60-15	<i>Pp</i>	10,14 a-g	36,3	78,2	12,4	337	32	66
V2-62-15	<i>Pp</i>	9,84 a-h	35,1	77,3	13,6	338	34	66
KM 178-14*)	<i>Pp</i>	11,49 ab	37,4	80,4	10,3	310	22	96
V3-5ab-15	<i>Pp</i>	10,05 a-h	37,2	77,8	12,4	348	32	68
V1-170-15	<i>Pp</i>	10,51 a-e	39,3	79,2	10,5	340	31	70
V1-169-15	<i>Pp</i>	9,83 b-h	37,6	77,6	10,7	322	33	83
V1-168-15	<i>Pp</i>	9,89 a-h	36,8	77,9	12,0	394	37	68
V1-167-15	<i>Pp</i>	9,70 b-i	38	77,7	12,6	377	45	58
PS Karkulka	<i>Pp</i>	9,75 b-i	42,7	76,9	11,9	380	28	81
V2-98-15	<i>Pp</i>	10,21 a-f	36,3	78,5	12,4	382	26	81
V2-95-15	<i>Pp</i>	10,74 a-d	35,7	80,5	12,4	400	26	89
V2-68-15	<i>Pp</i>	9,60 b-j	38	74,2	11,1	349	35	94
V1-176-15	<i>Pp</i>	8,56 e-k	36,4	74,3	13,1	392	33	48
V1-175-15	<i>Pp</i>	9,27 c-k	34,2	77,2	12,5	426	30	68
průměr		9,88	37,0	77,7	12,1	368	32	74
Bohemia**)	<i>R</i>	10,87 a-d	49,2	77,5	13,7	376	66	52
Vanessa**)	<i>R</i>	11,53 ab	40	73,9	11,8	293	24	35
průměr		11,47	44,6	75,7	12,8	335	45	44

Vysvětlivky: *Pp* – purpurový perikarp, *R* – červené zbarvení obilky, *) linie testované v oficiálních státních zkouškách, **) komerční variety se standardním zbarvením obilky, ***) hodnoty uvedené ve sloupci se stejnými písmeny nejsou statisticky významně odlišné (LSD, $P < 0,05$).

7 ZÁVĚR

Celosvětově významnou plodinou je pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), hojně využívána v mnoha směrech od pekařských výrobků, krmivářství až po zpracovatelský průmysl. Ve velké míře stoupá zájem o tzv. „funkční potraviny“, tedy zdravější formu tradičně konzumovaných produktů. S tím souvisí i vzrůstající zájem o odrůdy pšenice s nestandardním zbarvením obilky. Toto zbarvení je způsobeno sekundárními metabolity, anthokyany, které jsou obecně součástí rostlin. Anthokyany se vyznačují antioxidační aktivitou a pozitivnímu vlivu na živé organismy. V pšeničné obilce jsou kódovány několika geny – *Pp*, řídící ukládání barviv do perikarpu obilky, *Psy*, pro žluté zbarvení endospermu a *Ba*, způsobující modrou barvu aleuronové vrstvy. Díky anthokyanům obsažených v obilkách, je o barevné pšenice vyvíjen čím dál větší zájem a snaha získat výnosnější odrůdy vhodné pro pekařské účely.

Pomocí DNA markerů založených na PCR byly analyzovány genotypy barevných pšenic s purpurovým perikarpem, společně se standardně pěstovanými genotypy červených pšenic, jako kontrolou. Tyto vzorky pocházejí z Agrotest Fyto s. r. o. Kroměříž. Byly provedeny analýzy některých parametrů pro pekařskou a technologickou kvalitu. Jako první byly provedeny analýzy genů určujících tvrdost obilky, lokalizovaných na lokusech *Pina-D1* a *Pinb-D1*. V případě *Pina-D1* byla ve všech vzorcích detekována alela *Pina-D1b* a současně u 44% byla detekována alela *Pina-D1a*. U 56 % vzorků nebyl detekován PCR produkt *Pinb-D1*. V některých případech byla detekována přítomnost specifických produktů u čtyř různých alel zároveň (*a*, *b*, *c* a *d*). Alelické složení *Pina* a *Pinb* má vliv na výrobu chleba a může napomoci v následném šlechtění odrůd. Následovaly analýzy nulových alel *Waxy* genů, kde v případě nulové alely dochází ke snížení obsahu amylozových podjednotek škrobu vůči amylopektinu a obilky jsou označovány jako částečně voskové. Tyto odrůdy jsou velmi žádané v asijských zemích pro výrobu nudlů. Ve vybraných vzorcích nebyla detekována žádná nulová alela, což naznačuje, že tyto genotypy jsou spíše vhodné pro pekařské účely v Evropě. Ovšem i přesto je v Asii velký zájem o naše odrůdy. Další analýzy se prováděly na identifikaci alel v lokusu *Glu-A3* pro nízkomolekulární gluteniny. Byly detekovány dvě alely, a to *Glu-A3d* a *Glu-A3f*, které mají podle několika studií výrazně pozitivní vliv na kvalitu lepku, a tím i dobré vlastnosti těsta. Proto by se dalo konstatovat, že tyto genotypy mají potenciál pro pekařské účely.

V některých případech byly detekovány obě alely zároveň, což naznačuje, že vzorky byly heterogenní (směsné vzorky z více rostlin) a pravděpodobně zde hraje roli i způsob pěstování.

Laboratorní analýzy probíhaly na Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, kde byly využity metody molekulární biologie, především metody založené na PCR. Další výnosové a kvalitativní analýzy byly prováděny v Agrotest Fyto s. r. o. v Kroměříži. Získané poznatky byly a bude možné využít v následných procesech šlechtění a výběru vhodných odrůd, které povede k efektivnějšímu využívání barevných pšenic pro lidskou výživu.

8 PREZENTACE VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE

POSPIŠ M., PEČINKOVÁ J., VYHNÁNEK T., TROJAN V., MRKVICOVÁ E., JIRSA O., MARTINEK P., 2014: Detection of LMW glutenin allelic composition in *GLU-A3* loci of wheat (*Triticum aestivum L.*) with non-standard color of caryopsis. s. 749 – 751. In: POLÁK O., CERKAL R., BŘEZINOVÁ BELCREDI N., HORKÝ P., VACEK P., (eds): *MendelNet Agro 2016. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 1050 s., ISBN 978-80-7509-443-8.

9 LITERATURA

1. ABDEL-AAL E. S. M., ABOU-ARAB A. A., GAMEL T. H., HUCL P., YOUNG J. C., RABALSKI I., 2008: Fractionation of the blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23): 1117-1177. ISSN 0021-8561.
2. ARBUZOVA VS., MAYSTRENKO OI., 2000: Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Research Communication* 28, 235-237, ISSN 0133-3720.
3. BELDEROK B., MESDAG J., DONNER D. A., 2000: *Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe*. [online]. Kluwer Academic Publishers: Springer Science & Business Media, ISBN 978-94-017-0950-7 [vid. 13. 3. 2017]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=zBbvCAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
4. BHAVE M., MORRIS C. F., 2008: Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant Molecular Biology*, (66) 221-231, ISSN 0167-4412.
5. BOTH Z., CHLOUPEK O., 2005: Seed vitality of wheat and bread making quality, s. 22. In: RYANT P., CERKAL R., STŘEDA T., VEJRAŽKA K. (eds): *MendelNet Agro 2005. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 140 s., ISBN 80-7302-107-2.
6. BOWLES D., ISAYENKOVA J., LIM E. K., POPPENBERGER B., 2005: Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current opinion in plant biology*, 8(3), 254-263, ISSN 1369-5266.
7. BRADOVÁ J., ŠTOČKOVÁ L., 2010: Evaluation of winter wheat collection in terms of HMW- and LMW-glutenin subunits. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding*, 46 (Special Issue): S96–S99, ISSN 1805-9325.
8. BRADSHAW H. D., SCHEMSKE D. W., 2003: Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature*, 426(6963), 176-178, ISSN 1476-4687.
9. BRANLARD G., DARDEVET M., AMIOUR N., IGREJAS G., 2003: Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 50, 669-679, ISSN 0925-9864.

10. BUREŠOVÁ, V., KOPECKÝ, D., BARTOŠ, J., MARTINEK, P., WATANABE, N., VYHNÁNEK, T., & DOLEŽEL, J., 2015: Variation in genome composition of blue-aleurone wheat. *Theoretical and applied genetics*, 128(2), 273-282, ISSN 1432-2242.
11. BUSHUK W., BEKES F., 2002: Contribution of protein to flour duality,. In: *Proceedings of Novel Raw Materials, Technologies and Products – New Challenge for the Quality Control. Sborník z konference 26.–29. května 2002*. ICC Budapest. s. 14–19.
12. CAMPBELL B. T., BAENZIGER P. S., GILL K. S., ESKRIDGE K. M., BUDAK H., ERAYMAN M., DWEIKAT I., YEN Y., 2003: Identification of QTLs and environmental interactions associated with agronomic traits on chromosome 3A of wheat. *Crop Science*, 43(4), 1493-1505, ISSN 1435-0653.
13. CELPO [online], 2017: [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.celpo.sk/>
14. CORNELL H., HOVELING A. W., 1998: *Wheat: Chemistry and utilization*. [online]. CRC press, ISBN 1-56676-348-7 [vid. 5. 3. 2017]. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=2ulokhVcdRsC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Wheat:+Chemistry+and+utilization&ots=ZBhdLBzhKr&sig=aMpIDuqx7riDN4PehCd5InHvjWY&redir_esc=y#v=onepage&q=Wheat%3A%20Chemistry%20and%20utilization&f=false
15. CORONA V., GAZZA L., BOGGINI G., POGNA N. E., 2001: Variation in friabilin composition as determined by PAGE fractionation and PCR amplification, and its relationship to grain hardness in bread wheat. *Journal of Cereal Science*, (34) 243-250, ISSN 1095-9963.
16. DOBROVOLSKAYA O., ARBUZOVA VS., LOHWASSER U., RÖDER MS., BÖRNER A., 2006: Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 150, 355-363, ISSN 0014-2336.
17. EVERS T., MILLAR S., 2002: Cereal grain structure and development: some implications for quality, *Journal of Cereal Science*, 36(3): 261–284, ISSN 1095-9963.
explored using auto-fluorescent compounds in maize cells. *BMC Plant Biology*, (3)10, ISSN 1471-2229.
18. FERREYRA M . L . F . , RIUS S . P , CASATI P . , 2012: Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, ISSN 1664-462X.

19. FICCO D. B. M., MASTRANGELO A. M., TRONO D., BORRELLI G. M., DE VITA P., FARES C., BELEGGIA R., PLATANI C. PAPA R., 2014: The colours of durum wheat: a review. *Crop & Pasture Science*, 65: 1-15, ISSN 1836-0947.
20. GONCHAROV N. P., 2002: *Comparative genetics of wheats and their related species*. Siberian University Press, Novosibirsk, 268 s, ISBN 978-5-94087-046-3.
21. GONCHAROV N. P., GOLOVNINA K. A., KILIAN B., GLUSHKOV S., BLINOV A., SHUMNY V. K., 2008: Evolutionary history of wheats - the main cereal of mankind. *Biosphere Origin and Evolution*, Springer US, 407-419, ISBN 978-0-387-68655-4.
22. GORDEEVA, E. I., SHOEVA, O. Y., KHLESTKINA, E. K., 2015: Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (*Pp*) alleles. *Euphytica*, 203(2), 469-476, ISSN 0014-2336.
23. GUPTA P. K., VARSHNEY R. K., SHARMA P. C., RAMESH B., 1999: Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118 (5): 369-390, ISSN 0179-9541.
24. GUZMÁN C., ALVAREZ J. B., 2016: Wheat waxy proteins: polymorphism, molecular characterization and effects on starch properties. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(1), 1-16, ISSN 0040-5752.
25. HE G. Y., JONES H. D., D'OVIDIO R., MASCI S., CHEN M., WEST J., SHEWRY P. R., 2005: Expression of an extended HMW subunit in transgenic wheat and the effect on dough mixing properties. *Journal of cereal science*, 42(2), 225-231, ISSN 1095-9963.
26. HIMI, E., NODA, K., 2005: Red grain colour gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor. *Euphytica*, 143(3), 239-242, ISSN 0014-2336.
27. HRIVNA L., KOTKOVÁ B., BUREŠOVÁ I., 2015: Effect of Sulphur Fertilization on Yield and Quality of Wheat Grain. *Cereal Research Communications*, (43)2, 344-352, ISSN 0133-3720.
28. HUANG X. Q., BRÛLÉ-BABEL A., 2011: Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 53 (3): 277-284, ISSN 0733-5210.
29. HUBÍK K., MAREČEK J., 2002: Kvalita obilnin. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, sro, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <http://www.agroweb.cz/KVALITA_OBILNIN___s44x8475.html.
30. CHANTRET N., SALSE J., SABOT F., RAHMAN S., BELLEC A., LAUBIN B., DUBOIS I., DOSSAT C., SOURDILLE P., JOUDRIER P., GAUTIER M., CATTOLICO L., BECKERT M.,

- AUBOURG S., WEISSENBACH J., CABOCHE M., BERNARD M., LEROY P., CHALHOUB B., 2005: Molecular basis of evolutionary events that shaped the Hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell*, (17) 1033-1045, ISSN 1040-4651.
31. CHEN F., ZHONGHU H., CHEN D., ZHANG CH., ZHANG Y., XIA X., 2007: Influence of puroindoline allele on milling, steamed bread, noodles and pan bread in common spring wheat. *Journal of Cereal Science*, (45) 59-66, ISSN 1095-9963.
32. CHOULET F., WICKER T., RUSTENHOLZ C., PAUX E., SALSE J., LEROY P., SCHLUB S., LE PASLIER M.-CH., MAGDELENAT G., GONTHIER C., COULOUX A., BUDAK H., BREEN J., PUMPHREY M., LIU S., KONG X., JIA J., GUT M., BRUNEL D., ANDERSON J. A., GILL B. S., APPELS R., KELLER B., FEUILLET C., 2010: Megabase Level Sequencing Reveals Contrasted Organization and Evolution Patterns of the Wheat Gene and Transposable Element Spaces. *The Plant Cell* 22: 1686-1701, ISSN 1040-4651.
33. JANEČKOVÁ M., HŘIVNA L., JŮZL M., NEDOMOVÁ S., VYHNÁNEK T., TROJAN V., MRKVICOVÁ E., 2014: Possibilities of using purple wheat in producing bakery products. In *Proceeding of the International PhD Student Conference MendelNet 2014*. Brno: Mendel University in Brno, 412-416, ISBN 978-80-7509-174-1.
34. KARÁSEK F., MRKVICOVÁ E., ŠŤASTNÍK O., TROJAN V., VYHNÁNEK T., HŘIVNA L., MRÁZKOVÁ E., 2014: The influence of colored wheat Konini feeding on antioxidant activity parameters in rats. In *Proceeding of the International PhD Student Conference MendelNet 2014*. Brno: Mendel University in Brno, 160-162, ISBN 978-80-7509-174-1.
35. KHLESTKINA E. K., 2013: Genes Determining the Coloration of Different Organs in Wheat. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3 (1): 54-65, ISSN 2079-0597.
36. KNIEVEL D. C., ABDEL-AAL E. S. M., RABALSKI I., NAKAMURA T., HUCL P., 2009: Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* 50, 113-120, ISSN 1095-9963.
37. KONG J. M., CHIA L. S., GOH N. K., CHIA T. F., BROUILLARD R., 2003: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64 (5): 923-933, ISSN 0031-9422.
38. KULP K., PONTE J. G., 2000: *Handbook of Cereal Science and Technology*. Second Edition. New York : Marcel Dekker, 790 s.

39. LACHMAN J., DUDJAK J., ORSÁK M., PIVEC V., 2003: Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant Soil and Environment* 49, 1-7, ISSN 1805-9368.
40. LACHMAN, J., MARTINEK, P., KOTÍKOVÁ, Z., ORSÁK, M., & ŠULC, M., 2017: Genetics and chemistry of pigments in wheat grain—A review. *Journal of Cereal Science*, 74, 145-154, ISSN 0733-5210.
41. LIN Y., IRANI N. G., GROTEWOLD E., 2003: Sub-cellular trafficking of phytochemicals explored using auto-fluorescent compounds in maize cells. *BMC Plant Biology*, 3(1), 10, ISSN 1471-2229.
42. LIYANA-PATHIRANA C. M., SHAHIDI F., 2006: Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1256-1264, ISSN 0021-8561.
43. LUO C., GRIFFIN W. B., BRANLARD G., MCNEIL D. L., 2001: Comparison of low- and high-molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality. *Theoretical and Applied Genetics*. 102, 1088-1098, ISSN 0040-5752.
44. LUO M.C., YANG Z.L., YOU F.M., KAWAHARA T., WAINES J.G., DVORAK J., 2007: The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics*. (114) 947-959, ISSN 0040-5752.
45. LV J., YU L., LU Y., NIU Y., LIU L., COSTA J., YU L. L., 2012: Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food Chemistry*, 135, 325-331, ISSN 0308-8146.
46. MA H., ZHANG X., WANG C., GAO D., ZHANG B., LV G., WU R., CHENG X., WANG X., CHENG S., BIE, T., 2013: Effect of wx genes on amylose content, physicochemical properties of wheat starch, and the suitability of waxy genotype for producing Chinese crisp sticks. *Journal of Cereal Science*, 58(1), 140-147, ISSN 1095-9963.
47. MARTINEK, P., JIRSA, O., VACULOVÁ, K., CHRPOVÁ, J., WATANABE, N., BUREŠOVÁ, V., KOPECKÝ D., ŠTIASNA K., VYHNÁNEK T., TROJAN, V., 2014: Use of wheat gene resources with different grain colour in breeding. *64 Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2013*, 75-78, ISBN 978-3-902849-00-7.

48. MARYAMI Z., FAZELI A., MEHRABI A. A., 2014: Investigation of diversity of Waxy-A1 gene using amplification in different spices in A genome wheat's. *Advances in Environmental Biology*, (8)7, 2004-2007, ISSN 1995-0756.
49. MAZZONCINI M., ANTICHI D., SILVESTRI N., CIANTELLI G., SGHERRI C., 2015: Organically vs conventionally grown winter wheat: Effects on grain yield, technological quality, and on phenolic composition and antioxidant properties of bran and refined flour. *Food chemistry*, 175, 445-451, ISSN 0308-8146.
50. McLAUHLAN A., OGBONNAYA F. C., HOLLINGSWORTH B., CARTER M., GALE K. R., HENRY R. J., APPELS R., 2001: Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Crop and Pasture Science*, 52 (12): 1409-1416, ISSN 1836-0947.
51. NAKAMURA T., YAMAMORI M., HIRANO H., HIDAKA S., 1993: Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochemical Genetics*, 31 (1-2): 75-86, ISSN 0006-2928.
52. NOVOTNÝ F., HUBÍK K., 2006: Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice, Databáze online [cit. 2017-02-04]. Dostupné z : <http://www.leadingfarmers.cz/library/?ix=21&link=>
53. NOVOTNÝ, F., HUBÍK, K., 1997: Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice Část I: Hodnocení z pohledu odrůdového zkušebnictví ÚKZÚZ Brno, *Obilnářské listy*, č.3, Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, Kroměříž, s. 49-52, ISSN 1213-3981.
54. OBREHT D., KOBILJSKI B., ĐAN M., VAPA L., 2008: Marker assisted selection in BMQ related breeding programs. *Genetika*, 40(1), 39-49, ISSN 0016-6758.
55. OVESNA J., POLAKOVA K., LEISOVÁ L., 2002: DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38(1), 29-40, ISSN 1212-1975.
56. PASQUALONE A., BIANCO A. M., PARADISO V. M., SUMMO C., GAMBACORTA G., CAPONIO F., BLANCO, A., 2015: Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food chemistry*, 180, 64-70, ISSN 0308-8146.
57. POLAND J. A., BALINT-KURTI P. J., WISSER R. J., PRATT R. C., NELSON R. J., 2009: Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in plant science*, 14(1), 21-29, ISSN 1360-1385.
58. POLISH VILLAGE BREAD [online], 2017: [cit. 2017-04-20]. Dostupné z : http://en.polishvillagebread.co.uk/pur_pur_purple_wheat_bread.html

59. PRUGAR J., BARANYK P., BÁRTA J., BJELKOVÁ M., BRADOVÁ J., 2008: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, 327 s, ISBN 978-80-86576-28-2.
60. PŘÍHODA J., HRUŠKOVÁ M., 2007: *Hodnocení kvality: aplikace doporučených přístrojů, metod a interpretace výsledků pro praxi*. Praha, Svaz průmyslových mlýnů České republiky, s. 120- 145, ISBN: 978-80-239-9475-9.
61. PŘÍHODA J., SKŘIVAN P., HRUŠKOVÁ M., 2004: *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. VŠCHT, Praha, 203 s, ISBN 80-7080-530-7.
62. PSOTA V., VEJRAŽKA K., HARTMANN J., MUSILOVÁ M., 2008: Effect of the endosperm structure of barley caryopsis (*Hordeum vulgare* L.) on malt quality. *Kvasný průmysl (Czech Republic)*, ISSN 0023-5830.
63. QIAGEN, 2012: *DNeasy Plant Handbook*. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>
64. RÜCKSCHLOSS L., MATUŠKOVÁ K., HANKOVÁ A., JANČÍK D., 2010: Influence of winter wheat with purple colour of the corn on laying hens' efficiency and eggs quality. *Potravinářstvo 4 (Special Issue)*, 231-235 (In Slovak, English abstract), ISSN 1338-0230.
65. SEDLÁČKOVÁ I., 2010: Jakost obilovin: Příměsi a nečistoty v pšenici – metoda stanovení, sklizeň 2010. In: *Jakost obilovin 2010 - sborník z konference 10. 11. 2010 v Kroměříži*. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., 2010. s. 7 – 9.
66. SHEWRY R. P., POPINEAU Y., LAFIANDRA D., BELTON P., 2001: Wheat glutenin subunits and dough elasticity, findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology* 11, 433-441, ISSN 0924-2244.
67. SCHLÖTTERER C., 2004: The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5 (1): 63-69, ISSN 1471-0064.
68. ŠLIKOVÁ S., GREGOVÁ E., BARTOŠ P., HANZALOVÁ A., HUDCOVICOVÁ M., KRAIC J., 2004: Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24*. *Plant, Soil and Environment*, 50 (10): 43-438, ISSN 1214-1178.
69. ŠRÁMKOVÁ Z., TREFOVÁ E., ŠTURDÍK E., 2009: Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2: 115–138, ISSN 1337-978X.

70. ŠŤASTNÍK O., MRKVICOVÁ E., KARÁSEK F., TROJAN V., VYHNÁNEK T., HŘIVNA L., JAKUBCOVÁ Z., 2014: The influence of colored wheat feeding on broiler chickens performance parameters. In *Proceeding of the International PhD Student Conference MendelNet 2014*. Brno: Mendel University in Brno, 196-198, ISBN 978-80-7509-174-1.
71. TROJAN V., MUSILOVÁ M., VYHNÁNEK T., HAVEL L., 2011: Ukládání anthokyanů v obilkách pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). In: *Proceedings of International Ph.D. Students Conference MendelNet 2011*. Brno: Mendel University in Brno, 726–733, ISBN 978-80-7375-563-8.
72. TROJAN V., MUSILOVÁ M., VYHNÁNEK T., KLEJDUS B., HANÁČEK P., HAVEL L., 2014: Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis. *Journal of Cereal Science*, 59 (1): 48-55, ISSN 0733-5210.
73. VACULOVÁ K., EHRENBERGEROVÁ J., ERBAN V., MILOTOVÁ J., GABROVSKÁ D., POLEDNE R., 2003: Nutriční a zdravotně preventivní přínos obilovin pro výživu lidí. In: *Kvalita rostlinné produkce: současnost a perspektivy směrem k EU. Sborník příspěvků z česko-slovenské konference 6. února 2003*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003. s. 37-44.
74. VANZETTI L. S., PFLÜGER L. A., RODRÍGUEZ-QUIJANO M., CARRILLO J. M., HELGUERA M., 2009: Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*, (12) 1, 1-9, ISSN: 0717-3458.
75. VARGA M, et. al., 2013: The Anthocyanin Content of Blue and Purple Coloured Wheat Cultivars and their Hybrid Generations, *Cereal Research Communications*, 41(2), pp. 284–292, ISSN 0133-3720.
76. WANG C., SHU Q., 2007: Fine Mapping and Candidate Gene Analysis of Purple Pericarp Gene Pb in Rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*, 52: 3097-3104, ISSN 1861-9541.
77. WANG L., LI G., PEÑA R. J., XIA X., HE Z., 2010: Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 51(3), 305-312, ISSN 0733-5210.
78. WANG X., 2011: Structure, function and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Functional & integrative genomics*, 11, 13-22, ISSN 1438-7948.
79. WHITE J., COOKE R. J., 1992: A standard classification system for the identification of barley varieties by electrophoresis. In *Proceedings of the International Seed Testing Association*. ISSN 0020-8663.

80. WIESER H., 2006: Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24: 115–119, ISSN 0740-0020.
81. YAMAMORI M., NAGAMINE T., NAKAMURA T., ENDO T. R., 1994: Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat, *Theoretical and Applied Genetics*, (89) 2-3, 179-184, ISSN 0040-5752.
82. YAMAMORI M., QUYNH N. T., 2000: Differential effects of Wx-A1,-B1 and-D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1), 32-38, ISSN 0040-5752.
83. ZEVEN A. C., 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56 (3): 243-258, ISSN 0014-2336.
84. ZHANG W., GIANIBELLI M. C., RAMPLING L. R., GALE, K. R., 2004: Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum*. L). *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (7), 1409-1419, ISSN 0040-5752.
85. ZIMOLKA J., EDLER S., HŘIVNA L., JÁNSKÝ J. KRAUS P., MAREČEK J., NOVOTNÝ F., RICHTER R., ŘÍHA K., TICHÝ F., 2005: *Pšenice, pěstování, hodnocení a užití zrna*. Profi Press, Praha, 180 s, ISBN 80-86726-09-6.
86. ŽOFAJOVÁ A., PŠENÁKOVÁ I., HAVRLETOVÁ M., PILIAROVÁ, M., 2012: Accumulation of total anthocyanins in wheat grain. *Agriculture*, 58 (2): 50-56, ISSN 1338-4376.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 *Schéma vzniku pšenice.*

Obrázek 2 *Obilka pšenice na podélném řezu.*

Obrázek 3 *Struktura základních podskupin flavonoidů.*

Obrázek 4 *Purpurový perikarp.*

Obrázek 5 *Detekované alely Pina-D1a a Pina-D1b.*

Obrázek 6 *Detekované alely Pinb-D1c.*

Obrázek 7 *PCR produkty Wx-A1, Wx-B1 a Wx-D1.*

Obrázek 8 *PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3f.*

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 *Přehled genotypů pšenice seté pro analýzy.*

Tabulka 2 *Složení mastermixu (pro 1 vzorek).*

Tabulka 3 *Primery použité pro analýzu lokusu Pina a Pinb.*

Tabulka 4 *Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu Waxy.*

Tabulka 5 *Alelově specifické PCR markery pro identifikaci Glu-A3.*

Tabulka 6 *Komponenty pro přípravu 1 % agarózového gelu, pro systém Agagel Maxi (Biometra).*

Tabulka 7 *Alelická skladba pro lokusy Pina a Pinb.*

Tabulka 8 *Alelická skladba pro lokus Glu-A3.*

Tabulka 9 *Průměrné teploty vzduchu 2015/2016 v Kroměříži.*

Tabulka 10 *Suma srážek 2015/2016 v Kroměříži.*

Tabulka 11 *Výnosové a kvalitativní parametry vybraných genotypů pšenice s nestandardním zbarvením obilky.*