

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

BRNO 2014

VÁCLAV TROJAN

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



**Vyhledávání a charakteristika genů
zodpovědných za purpurové zbarvení obilek
pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)**

Disertační práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

Vypracoval:
MVDr. Ing. Václav Trojan

Brno 2014

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vyhledávání a charakteristika genů zodpovědných za purpurové zbarvení obilky pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) vypracoval 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 ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, 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

Pár symbolickými řádky na začátek, které nikdy nedokážou vyjádřit celý obsah: Děkuji panu profesoru Ladislavu Havlovi, který stál za zrodem, vedením a podpoře při dosahování výsledků mé doktorské práce, doktorce Mileně Musilové, za sdílení radosti i za proteklé slzy při realizaci experimentů, dále kolegovi doktoru Tomáši Vyhnánkovi zodpovědnému za perfektní fungování laboratoře i pokusných ploch a panu profesoru Bořivoji Klejdusovi za pomoc při chemické analýze. Děkuji podmínkám Mendelovy univerzity v Brně za umožnění seberealizace se silnou podporou tradiční univerzity a v neposledním řádku celé své rodině, dvojnásobně milované doktorce Ivě za nepřetržitý tlak při finalizaci práce včetně opravdových přátel, kteří při mně stáli, stojí a věřím, že budou stát navždy.

Tato disertační práce vznikla za podpory finančních prostředků specifikovaného vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektů Interní grantové agentury Agronomické fakulty, Mendelovy univerzity v Brně č. IP 1/2010, TP 1/2010, TP 7/2011 a Grantové agentury České republiky č. GD204/09/H002.

ABSTRAKT

Purpurová barva obilek u pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) je obvyklým příkladem rozmanitosti Matky přírody. Cílem práce bylo přispět k pochopení genetického založení tvorby těchto pigmentů, jejich ukládání v průběhu zrání obilky množstvím pigmentů v obilce. Červené a bílé obilky jsou běžné u pšenice. Netradiční purpurové zbarvení obilek je způsobeno ukládáním pigmentů do perikarpu. Po chemické stránce patří barviva mezi antokyany. Klíčovým enzymem v biosyntetické dráze antokyanů je chalkonsyntáza, která katalyzuje hned první krok této dráhy. Dále bylo sledováno ukládání antokyanů do perikarpu, exprese genu příslušnému enzymu chalkonsyntáze a obsah hlavních antokyanů kyanidin-3-glykosidu, který je hlavní součástí pigmentace purpurového perikarpu a dále delphinidin-3-glukosidu. Ukládání barviv v průběhu vývoje obilky není stejnorodé. Nejprve vznikají izolované skvrnky, které následně splynou v jeden celek. V případě exprese mRNA chalkonsyntázy došlo k projevům o pět dnů dříve, než bylo zaznamenáno ukládání pigmentů mikroskopicky. S koncem vývoje obilky hodnoty hlavního antokyanu kyanidin-3-glykosidu klesaly, protože došlo k přeměně na více komplexní látku, jev označovaný jako kopigmentace.

ABSTRACT

The purple color of the caryopses in common wheat (*Triticum aestivum* L.) is an example of the countless diversity of the Mother Nature. Red and white caryopses are typical in common wheat. Genotypes with purple caryopses are also described. This coloring is caused by anthocyanins which deposit in the pericarp (purple). The anthocyanins biosynthetic pathway is well described. The key enzyme is chalcone synthase (CHS). It catalyzes the first step. We observed the deposition of anthocyanins in the pericarp, the expression of a chalcone synthase gene and the amount of the major anthocyanins – cyanidin-3-glycoside (pericarp of purple caryopses) and delphinidin-3-glycoside during caryopsis development. Purple pigment deposition was not homogeneous and/or uniform. At first, small isolated spots of purple color were formed and thereafter they expanded. The expression of chalcone synthase mRNA occurred five days before pigment deposition and finished earlier than expected. Amounts of cyanidin-3-glycoside increased continuously. Amounts of these fell at the end of caryopses development probably due to formation of more complex substances, process which is described as copigmentation.

OBSAH:

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
2.1 Původ pšenice seté (<i>Triticum aestivum</i> L.)	11
2.2 Vývoj a stavba obilky pšenice seté.....	17
2.3 Zbarvení obilky pšenice	23
2.4 Lokalizace genů zodpovědných za zbarvení obilek.....	26
2.4.1 Červené zbarvení.....	26
2.4.2 Purpurové zbarvení.....	26
2.4.3 Modré zbarvení.....	29
2.4.4 Žluté zbarvení	30
2.5 Biosyntetické dráhy a geny zodpovědné za produkci antokyanů.....	30
2.6 Regulační geny biosyntézy flavonoidů	34
2.6.1 MYB faktory	35
2.6.2 bHLH faktory	36
2.6.3 WDR proteiny	37
2.6.4 Negativní regulace	37
3. CÍLE	39
4. MATERIÁL A METODY	40
4.1 Experimentální materiál	40
4.2 Genetická příbuznost	43
4.3 Anatomická studie.....	45
4.4 Identifikace a kvantifikace antokyanů – kyanidin-3-glukosid a delphinidin-3-glukosid v průběhu vývoje obilék.....	46
4.5 Sledování genové exprese metodou qPCR.....	47
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	49

5.1 SSR markery při zjištění genetické příbuznosti experimentálního materiálu.....	49
5.2 Anatomická studie, makro- a mikroskopické analýzy	55
5.3 Analýza antokyanů	63
5.4 Genomická analýza.....	65
5.5 Sledování exprese genu.....	67
5.6 Výsledky a diskuze – souhrn	70
6. ZÁVĚR.....	73
7. SUMMARY	76
8. LITERATURA.....	79
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	96
10. SEZNAM TABULEK.....	98
11. SEZNAM ZKRATEK	99

1. ÚVOD

V lokálním i globálním měřítku hraje pšenice v lidské společnosti nezastupitelnou roli. V dnešní době nejen pod hledáčkem vědců, zkoumajících genom, šlechtících nové výkonnější odrůdy, ale především z pohledu běžné populace je pšenice a její produkty hlavní součástí potravinového koše a v nemalé části světa tvoří základní složku výživy mnoha národů. V zemědělství je pšenice nerozšířenější kulturní plodina pěstovaná po celém světě. Poskytuje 20% podíl dávky příjmu bílkovin a energie pro více než 4,5 miliardy lidské populace. V rozvojových zemích je pšenice řazena na druhé místo ve velikosti produkce hned za rýží.

V současnosti objemy sklizně pšenice nejsou ale dostatečné pro uspokojení poptávky, což vede k nestabilitě cen a v krajním případě i ke vzniku hladomorů. S výhledem exponenciálně rostoucí celosvětové populace lidstva, která by mohla k roku 2050 dosáhnout 9 miliard lidí, bude nutné požadavek na produkci pšenice, nejen jako potraviny, zvýšit o 60 %. K dosažení popsaných hodnot je nutné navýšit současnou úroveň roční celosvětové produkce pšenice z 1,0 % alespoň na 1,6 %. Celý svět sdílí potřebu zvýšit výnosy pšenice, zajistit lepší odolnost vůči abiotickému stresu, patogenům a dalším negativním vlivům, stejně jako zlepšit trvalou udržitelnost pěstování pšenice pomocí kvalitnějšího osiva a lepších pěstebních postupů (statistiky z www.fao.org).

Archeologické nálezy dokládají pěstování pšenice na území Íránu již 6 000 let př. n. l. Na území České republiky se objevila o tisíc let později, časově se jedná o neolit 5000 let př. n. l. Z výše popsaných fakt není třeba detailněji vysvětlovat význačnost pěstování pšenice na světě pro zajištění základních potřeb lidstva. A v tomto okamžiku vzniká možnost obohatit proces běžného příjmu základních potravin (pšeničných produktů) o látky s pozitivním vlivem na lidské zdraví. Směr výzkumu pšenic s purpurovým zbarvením obilky je jednou z unikátních možností, jak tohoto cíle dosáhnout. Látky flavonoidního charakteru, které jsou příčinou purpurového zbarvení, tyto vlastnosti přinášejí. Jejich vlastnosti budou vysvětleny dále v předložené práci. A právě potraviny, jejichž dopad na zdraví a přímý význam vyslovil už ve starověkém Řecku učenec kóské školy Hippokrates slovy: „Tvá výživa bude tvým lékem.“

V nedávné době byl svět ohromen s objevem tzv. zlaté rýže, kdy za pomoci genetických modifikací byly do genomu rýže vneseny geny *psy* (phytoene synthase)

z narcisu a *crtI* (carotene desaturase) z půdní bakterie *Erwinia uredovora*, zodpovědné za klíčové enzymy v biosyntetické dráze provitaminu A (Al-Babili & Beyer 2005).

Názory světa na tento zlomový výzkum byly ovšem protichůdné. Především ze starého evropského kontinentu trpícím genofobií, chorobným odporem k produktům vzniklých genetickými modifikacemi se stále ozývá záporný hlas vůči „nepřirozenému“ přenášení genů pomocí genových manipulací obecně.

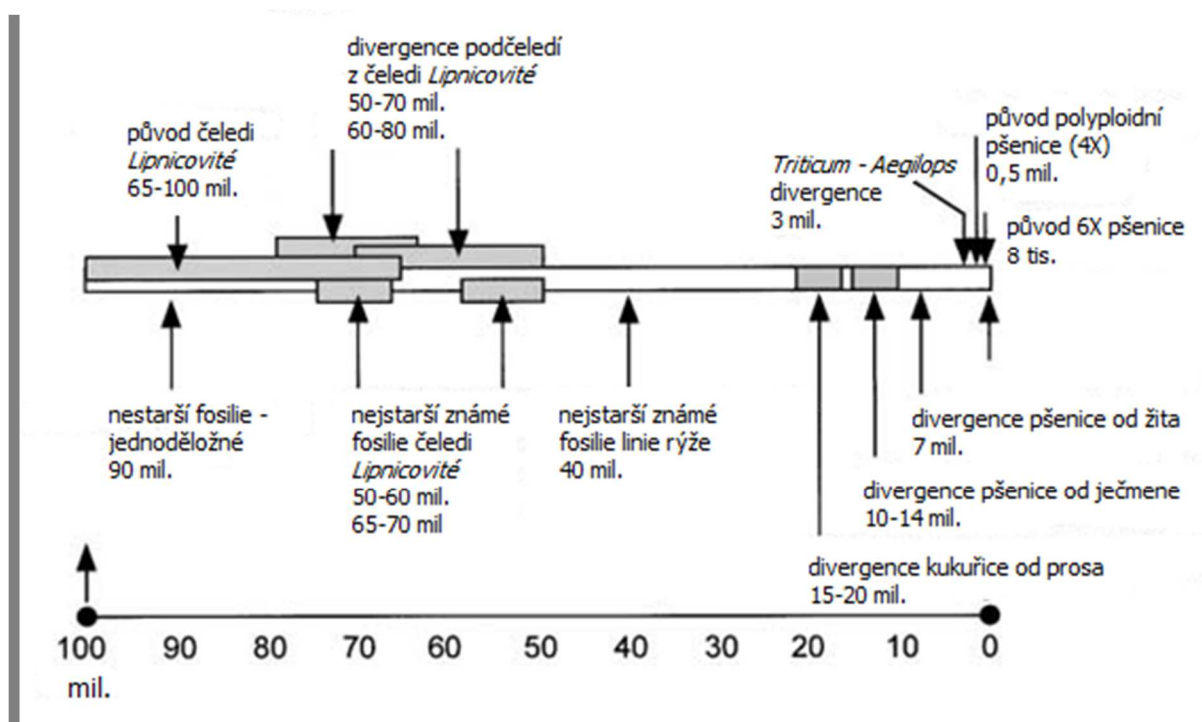
U purpurové pšenice, kterou se zabývá předložená práce, tento problém nemůže nastat, protože genetický základ purpurového zbarvení obilek se dostal do pšenice cestou přirozeného křížení rostlin. Zbarvení je způsobeno antokyany, které mají významný vliv na lidské zdraví (Hosseinian et al. 2008). Vedle antokyanů obsahují obilky ještě zvýšené množství vitamínů, bílkovin, aminokyselin a prospěšných mikroelementů (Li et al. 2002).

Na základě uvedených faktů lze vyslovit přesvědčení, že studium purpurových pšenic přináší nejen teoretické poznatky spojené s výzkumem genů zodpovědných za purpurové zbarvení obilek, lokalizace barviv v obilkách v závislosti s množstvím produkce pigmentů v průběhu vývoje, ale bude mít hlubší dopad na směr pěstování pšenice ve vztahu pozitivního působení na lidské zdraví. Toto přesvědčení dokládá fakt, že v roce 2014 byla na Slovensku registrována první odrůda s purpurovým perikarpem pod názvem PS Karkulka (ústní sdělení Rückschloss 2014).

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Původ pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), představující z genetického hlediska poměrně kompaktní skupinu, která vznikla před 55–75 milióny let. Nyní převažuje na 20 % souše naší planety. Mimo to hlavní obilniny (rýže, kukuřice a pšenice), které vznikly před 400 milióny let ze společného předka, poskytují většinu potravinových zdrojů člověka. Před asi 3 milióny let se oddělily od společného předka diploidní druhy s genomy, které se dnes označují jako A, B, a D. Tyto diploidní druhy se po dlouhou dobu rozvíjely vedle sebe. Až před asi 200 tisíci let došlo k vzájemné hybridizaci, a tím se začaly vytvářet polyploidní pšenice (obrázek 1). Vznikly tak tetraploidní a hexaploidní druhy, tedy i z dnešního hlediska nejvýznamnějšího hexaploidního druhu pšenice seté (*Triticum aestivum* L.).



Obrázek 1: Časové schéma vývoje polyploidních druhů rodu pšenice (Gill et al. 2004)
mil. = před milióny let, *tis.* = před tisíci let

Původ polyploidních druhů pšenice není i přes nahromadění velkého množství literatury zcela jasný. Prvotní příčinu lze hledat v taxonomii celého rodu *Triticum*. Existují zde dvě značně odlišné klasifikace. Systém, který publikoval Mac Key v roce

1988 (obrázek 2), je odlišný od systému, jenž vytvořili Dorofeev et al. (1979). I když se dnes mnoho současných výzkumů věnuje r. *Triticum*, klasifikace jak ji popsal Dorofeev et al. (1979) je povětšinou mimo Rusko neznámá. Klasifikace je kontroverzní, protože označení druhu je zde přiřazeno všem hlavním domestikovaným pšenícím. A mezi poddruhy a variety byly zařazeny všechny rozeznatelné morfologické formy (obrázek 3).

Původní klasifikace dle Mac Key se objevila v roce 1966 na druhém sympóziu s oficiálním názvem: International Wheat Genetics Symposium. Revidovanou verzi nabídl Mac Key 1975 ve svém vystoupení na 12. botanickém kongresu, který se konal v Leningradu, dnes Petrohrad. Bohužel sborník této konference jeho příspěvek neobsahoval, rozhodl se v roce 1977 opublikovat systém na malém vědeckém setkání v Bari (Itálie) a znovu s doplněním v roce 1988 ve vědeckém časopise *Biologisches Zentralblatt*. Tato publikace se dodnes bere jako počátek jeho systému. Do revidované klasifikace přidal *Triticum urartu* a změnil názvy *T. turgidum* subsp. *paleocolchicum* na *T. turgidum* subsp. *georgicum*, *T. timopheevii* subsp. *araraticum* na *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*, a změnil zařazení *T. zhukovskyi*.

***Triticum* L.**

>subsp. *spelta* (L.) Thell.

Section *Monococca* Flaksb.

Triticum monococcum L.

subsp. *monococcum*

subsp. *boeoticum* (Boiss.) Á.Löve & D.Löve

var. *aegilopoides* (Link) MacKey

var. *thaoudar* (Reuter in Bourg. ex Hausskn.) Percival

Triticum urartu Tumanian ex Gandilyan

Section *Dicoccoidea* Flaksb.

Triticum turgidum L.

subsp. *turgidum*

conv. *turgidum*

conv. *durum* (Desf.) MacKey

conv. *turancium* (Jakubz.) MacKey

conv. *polonicum* (L.) MacKey

subsp. *carthlicum* (Nevski in Kom.) Á.Löve & D.Löve.

subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübler) Thell.

subsp. *georgicum* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebner) Thell.

Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk.

subsp. *timopheevii*

subsp. *armeniicum* (Jakubz.) MacKey

Section *Speltoidea* Flaksb.

Triticum aestivum L.

subsp. *aestivum*

subsp. *compactum* (Host) MacKey

subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *sphaerococcum* (Percival) MacKey

Triticum zhukovskyi Menabde & Ericzjan

Obrázek 2: Klasifikace rodu *Triticum* podle Mac Key z roku 1988
dostupné na: <http://www.k-state.edu./wgrc/Taxonomy/taxmk88.html>

***Triticum* L.**

Subgenus *Triticum*

Section *Urartu* Dorof. & A.A.Filatenko

Triticum urartu Tumanian ex Gandilyan

Section *Dicoccoides* Flaksb.

Triticum dicoccoides (Körn. ex Asch. & Graebner) Schweinf.

Triticum dicoccum Schrank ex Schübler

Triticum karamyshevii Nevski

Triticum ispahanicum Heslot

Triticum turgidum L.

Triticum jakubzineri Udaczin & Schachm.

Triticum durum Desf.

Triticum turanicum Jakubz.

Triticum polonicum L.

Triticum aethiopicum Jakubz.

Triticum carthlicum Nevski in Kom.

Section *Triticum*

Triticum macha Dekapr. & Menabde

Triticum spelta L.

Triticum vavilovii (Tumanian) Jakubz.

Triticum compactum Host

Triticum aestivum L.

Triticum sphaerococcum Percival

Triticum petropavlovskyi Udaczin & Migush.

Subgenus *Boeoticum* Migush. & Dorof.

Section *Monococcon* Dum.

Triticum boeoticum Boiss.

Triticum monococum L.

Triticum sinskajae A.A.Filatenko & U.K.Kurkiev

Section *Timopheevii* A.A.Filatenko & Dorof.

Triticum araraticum Jakubz.

Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk.

Triticum zhukovskyi Menabde & Ericzjan

Triticum militinae Zhuk. & Migush.

**Obrázek 3: Klasifikace rodu *Triticum* podle Dorofeev et al., z roku 1979
dostupné na: <http://www.k-state.edu/wgrc/Taxonomy/taxdor.html>**

Tehdejší geopolitické uspořádání světa vedlo k tomu, že vznikly na základě těchto dvou taxonomických škol dva značně odlišné směry výzkumu. Tuto divergenci se nepodařilo do dnešní doby zcela odstranit (srov. Goncharov 2011).

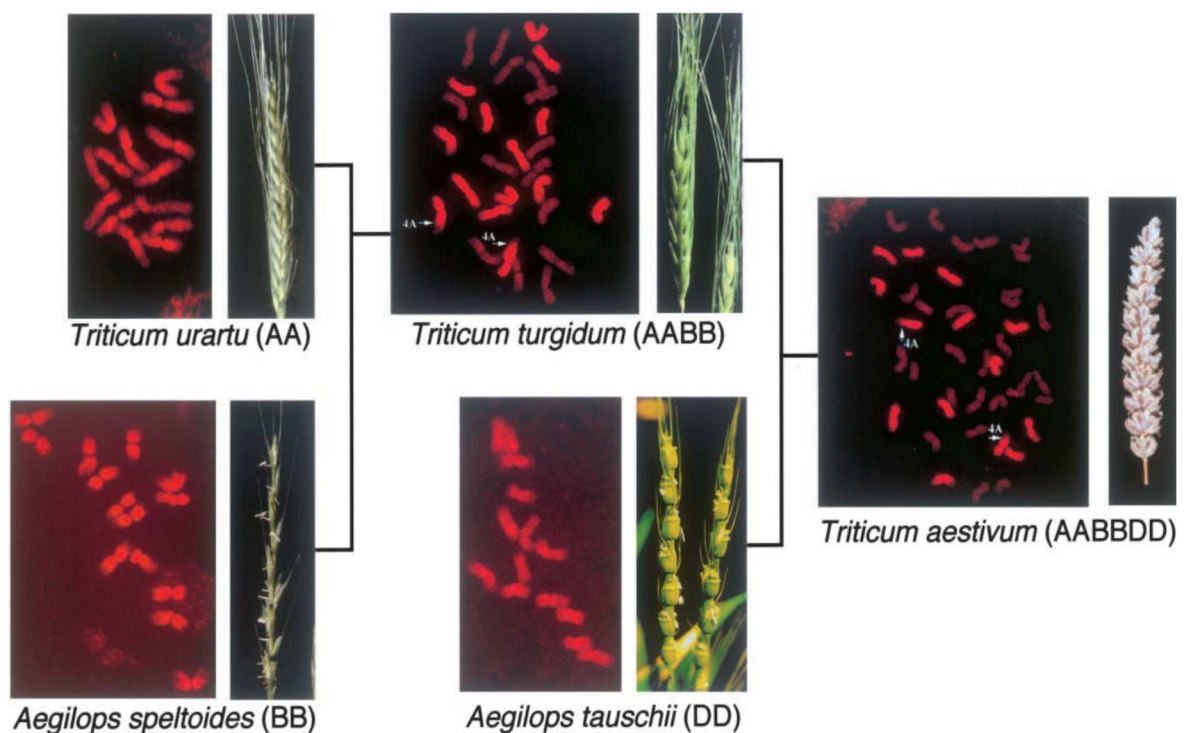
Nejnovější poznatky se shodují na tom, že rod *Triticum* zahrnuje relativně malé množství druhů – *Triticum monococcum* L. (AA genom); *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan (AA genom); *Triticum turgidum* L. (AABB genom); *Tritium timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (AAGG genom); *Triticum aestivum* L. (AABBDD genom) a *Triticum zhukovskyi* Menabde & Ericz. (AAAAGG genom). Tyto druhy jsou rozděleny do tří sekcí: Monococcon (zahrnující diploidní druhy, 2n = 14); Dicoccoidea (zahrnující tetraploidní druhy, 2n = 28); Triticum (zahrnující hexaploidní druhy, 2n = 42). Některé z těchto druhů jsou známy jen jako plané rostliny (*T. urartu*). *T. aestivum* a *T. zhukovskyi* se vyskytují jen jako pěstované rostliny. *T. monococcum*, *T. turgidum* a *T. timopheevii* jsou známy jako plané, tak kulturní rostliny (Matsuoka 2011). Veškerá dostupná literatura se shoduje, že všechny tyto druhy vznikly na Blízkém východě a v Zakavkazsku. Nejnovější pohled na systematiku rodu *Triticum* zahrnuje sice jen 6 druhů, ale ty se dále člení v řadu poddruhů (tabulka 1).

**Tabulka 1: Nomenklatura rodu *Triticum*
(van Slageren 1994)**

Sekce	Druhy a poddruhy	Genomová konstituce
Monococcon	<i>Triticum monococcum</i> L.	AA
	subsp. <i>aegilopoides</i> (Link) Thell.	
	subsp. <i>monococcum</i>	
	<i>Triticum urartu</i> Tumanian ex Gandilyan	AA
Dicoccoidea	<i>Triticum turgidum</i> L.	AABB
	subsp. <i>dicoccoides</i> (Körn. ex Asch. & Graebn.)	
	subsp. <i>dicoccon</i> (Schrank) Thell.	
	subsp. <i>durum</i> (Desf.) Husn.	
	subsp. <i>polonicum</i> (L.) Thell.	
	subsp. <i>turanicum</i> (Jakubz.) A. Löve & D.Löve	
	subsp. <i>turgidum</i>	
	subsp. <i>carthlicum</i> (Nevski) A. Löve & D.Löve	
	subsp. <i>paleocolchicum</i> (Menabde) A. Löve & D.Löve	
		<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk.
	subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.) van Slageren	
	subsp. <i>timopheevii</i>	

Triticum	<i>Triticum aestivum</i> L.	AABBDD
	subsp. <i>aestivum</i>	
	subsp. <i>compactum</i> (Host) MacKey	
	subsp. <i>sphaerococcum</i> (Percival) MacKey	
	subsp. <i>macha</i> (Dekapr. & Manabde) MacKey	
	subsp. <i>spelta</i> (L.) Thell. Spelt	
	<i>Triticum zhukovskyi</i> Menabde & Er	AAAAGG

Všeobecně se dnes přijímá, že na vzniku dnešních polyploidijních druhů pšenice podílel vedle rodu *Triticum* i rod *Aegilops* (mnohoštět). Jak podrobně popisuje Goncharov (2011). Linné sice vyčlenil oba rody, avšak jiní autoři od 19. století tyto rody považovali za jeden. Tyto historické nejasnosti ještě dále komplikují data zjištěná pomocí molekulárně biologických metod, že rody *Triticum* a *Aegilops* nemají monofyletický původ (Petersen et al. 2006). Přes tuto komplikovanou situaci existuje dnes model, který je všeobecně akceptován (obrázek 4).



Obrázek 4: Chromozomální konstituce druhů podílejících se na vzniku hexaploidní pšenice (Gill et al. 2004)

2.2 Vývoj a stavba obilky pšenice seté

Obilky v praxi známe jako zrna obilnin. Především jako jeden ze základních zdrojů výživy jsou známy člověku od doby prvních zemědělců, kteří začali pěstovat rostliny, a doprovázejí člověka po celou dobu jeho historie. Do začátku 19. století však byla věnována struktuře obilky jen velmi malá pozornost. Prvním, kdo detailně popsal strukturu obilky, kterou nazval *cerium*, byl M. Mirbel v roce 1808. Vzápětí (1811) jeho práci kriticky zhodnotil L.-C. Richard a obilku nazval *caryopsis* (True 1893). Od té doby byla věnována obilce značná pozornost. Byla detailně studována její struktura a chemické složení. Zájem se soustředil na fyziologické procesy v průběhu jejího vývoje. A navíc je v poslední době více věnována pozornost expresi genů během tohoto vývoje.

O vývoji a struktuře obilky všeobecně, i obilky pšenice zvlášť, existuje v literatuře velké množství údajů. Pozornost je věnována především vývoji zárodku a endospermu. To je logické, protože zárodek je základ nové rostliny a endosperm je jedním z nejdůležitějších zdrojů výživy člověka. Obalovým vrstvám obilky byla věnována nepoměrně menší pozornost. Je zajímavé, že vývoji a struktuře obalových vrstev věnovali detailní pozornost především dřívější autoři. Přes velké množství údajů, které jsou shromážděny v základních učebnicích, vědeckých, odborných, populárně naučných i populárních článků v několika oborech – především botanice, zemědělství a potravinářství. Tato skutečnost zvětšuje množství údajů, ale zároveň vznikají i odlišné pohledy. Existují i různá pojetí např. původu jednotlivých struktur. K tomu se přidávají i terminologické problémy. Jedna a tatáž struktura může mít různé názvy. Nepřesnosti či chyby vznikají i nepřesnými překlady různých termínů do češtiny. Následující text je tedy kompilací údajů o obilce pšenice obecně známých i publikovaných ve vědecké a odborné literatuře. Z novějších byly za základ vzaty jako nejlepší práce týkající se přímo pšenice, které publikovala Batygina (1974, 1987). Ani u původních prací nebylo dostatečné množství údajů, které se detailně zabývají vývojem a strukturou obalových vrstev obilky. Zde se jako nejhodnotnější jevila práce, kterou publikoval True (1893). Při tvorbě textu bylo přihlédnuto i k vlastním výsledkům.

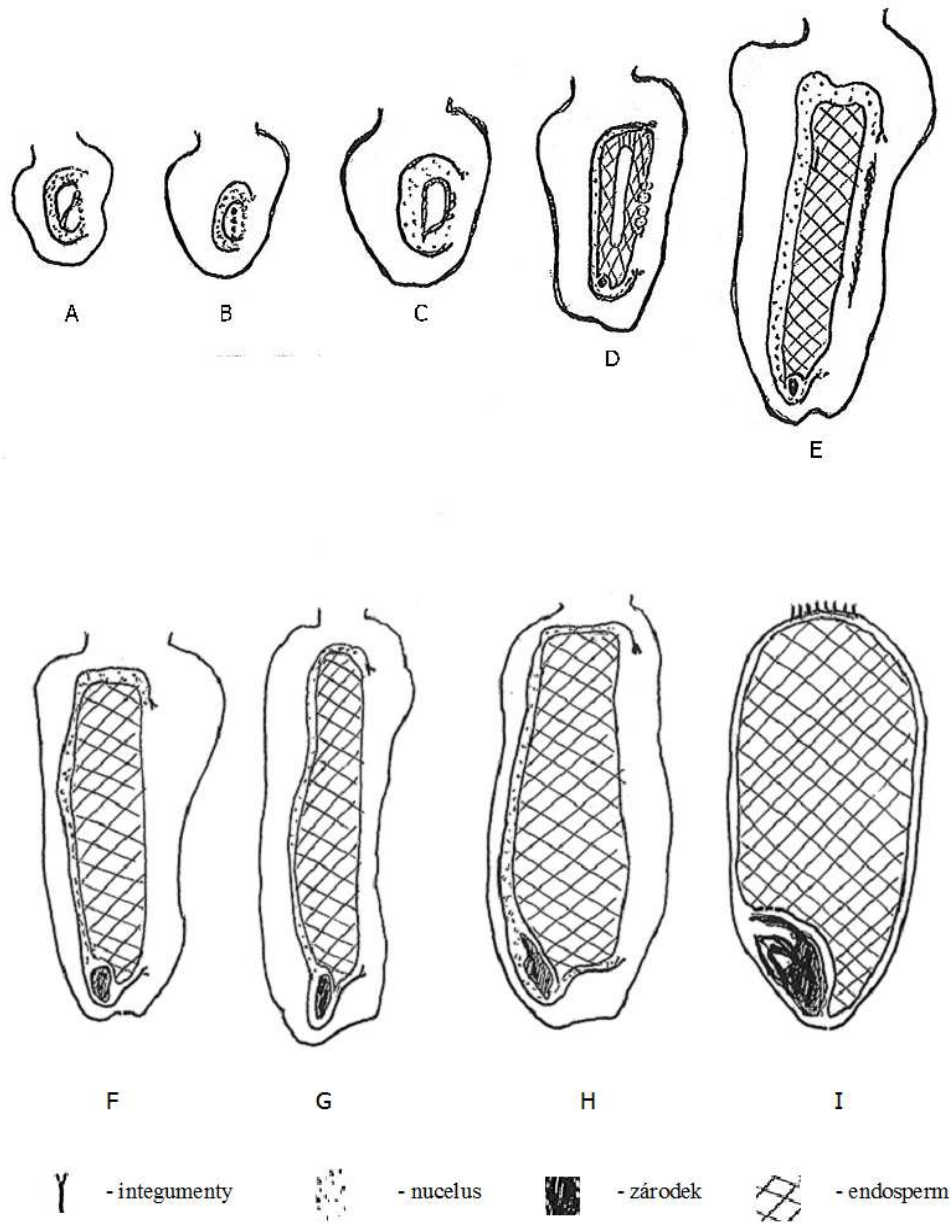
Obilka je řazena mezi plody pravé suché nepukavé. To znamená, že vzniká ze semeníku a skládá se z oplodí – perikarpu, v době zralosti suchého plodu. Má tři vrstvy exokarp, mezokarp a endokarp. Oplodí obklopuje semeno, v případě obilky jedno, které se v době zralosti neuvolňuje z oplodí. Do prostředí se tedy šíří celý plod. Semeno má na

povrchu osemení – testu. Obsahuje zárodek a zásobní pletivo endosperm. Obilka je charakteristická tím, že oplodí srůstá s osemením, endosperm zaujímá její největší část a relativně malý zárodek, ve srovnání s endospermem je značně modifikovaný.

Obilka se jako plod pravý vyvíjí ze semeníku. Ten u rodu pšenice vzniká srůstem tří plodolistů. Gyneceum je synkarpní. Plně vyvinutý semeník má široký kónický tvar. Apex je orientován směrem dolů. Na zadní straně (orientované dovnitř klásku) je téměř po celé délce rýha. Pod ní jsou umístěny vodivé svazky. Tato rýha také ukazuje, do jaké míry je vajíčko připojeno k placentě, místě na vnitřní straně semeníku. Vajíčko je k ní připojeno přímo, není zde poutko, kterým bývá semeno k placentě normálně připojeno. Jedná se o tzv. placentochalázu. Širší, apikální strana semeníku je pokryta jemnými trichomy. Stěna semeníku není všude stejně silná. Směrem k apexu se její tloušťka zvětšuje. Je tvořena vnější pokožkou. Pod pokožkou se nachází více vrstev kulovitých parenchymatických buněk. Směrem dovnitř se zvyšuje množství mezibuněčných prostorů. Následuje jedna vrstva buněk kubického tvaru, které obsahují chlorofyl, tzv. chlorofylové buňky. Vrstva, kterou tvoří, se někdy nazývá chlorofylová vrstva. V oblasti rýhy mohou být chlorofylové buňky ve dvou vrstvách (True 1893; Batygina 1974, 1978). V semeníku je jedno vajíčko, které dutinu semeníku zcela vyplňuje. Jedná se o kamylootropní typ vajíčka se dvěma integumenty. Oba jsou tvořeny dvěma vrstvami buněk s výrazně tenkými stěnami. Nucelus je tvořen několika vrstvami parenchymatických buněk opět s výrazně tenkými stěnami. Buňky nucelu přiléhající k vnitřnímu integumentu vytvářejí tzv. nucelární epidermis. Integumenty jsou v kontaktu s vnitřní pokožkou semeníku, samy mezi sebou a dále také s nucelární epidermis. V tomto stádiu spolu nejsou strukturálně spojeny s výjimkou placentochalázy (True 1893), (Batygina 1974, 1978). V nucelu je umístěn zárodečný vak typu *Polygonum*. U pšenice se skládá z oosféry, dvou synergid, centrální buňky, která je největší a obsahuje dvě polární jádra. Počet antipod je oproti číslu charakteristickému pro typ zárodečného vaku *Polygonum*, tj. tři, zmnožený, obvykle jich bývá více než deset. (Batygina 1974, 1987).

V důsledku nerovnoměrného růstu během vývoje ventrální a dorzální strany semeníku dochází k pozměněnému umístění vajíčka. Na tom se dále podílí i nesymetrický vývoj samotného vajíčka, ve kterém probíhá nesymetrický vývoj nucelu a vaječných obalů. Obilka se začne vyvíjet po proběhnutí dvojitého oplození. Začne docházet ke

strukturálním změnám a mění se velikost (obrázek 5). Blizna zaniká, stěny semeníku se mění v oplodí. Z vajíčka vzniká semeno. Řadou autorů byla definována jednotlivá vývojová stadia vývoje. Nejpropracovanější a často citovaný systém vypracovali Rogers & Quartano (1983). Všechny systémy jsou však založeny na typických stádiích vývoje zárodku a endospermu. Vývoji obalových vrstev není věnována větší pozornost.



Obrázek 5: Vývoj obilky po oplození (Batygina 1987)

**A – 5 až 6 hodin, B – 1 den, C – 2 dny, D – 3 až 4 dny, E – 7 až 8 dnů,
F – 9 až 10 dnů, G – 11 až 12 dnů, H – 13 až 15 dnů, I – 25 až 30 dnů**

Z oosféry oplozené jednou spermatickou buňkou (samčí gametou) se začne vyvíjet zárodek. Ten je u pšenice, stejně jako u všech druhů čeledi lipnicovitých, silně modifikovaný. Tato modifikace znamená absenci dělohy. Místo ní je vytvořen tzv. štítek

(*scutellum*), pomocí něhož jsou v době klíčení mobilizovány, nasávány a transportovány zásobní látky uložené v endospermu do částí zárodku, ze kterých se vyvíjí rostlina – plumuly (pírka) a radikuly (kořínku). Už v zárodku jsou vyvinuty základy adventivních kořenů. V případě pšenice bývají dva. Pírko je kryto koleoptylí. Kořínek je obklopen koleorhizou. Naproti štítku mezi plumulou a radikulou je drobný útvar – epiblast. Plně vyvinutý zárodek pšenice seté zaujímá menší část zralé obilky. Relativně malá velikost zárodku se dá vysvětlit tím, že neobsahuje žádné zásobní látky. Charakteristické je ukládání zásobních látek u obilky výhradně do endospermu.

Endosperm začne vznikat po splynutí druhé spermatické buňky s pólými jádry. Vzniklé triploidní jádro se dělí a postupně se poměrně složitě diferencuje v mnohobuněčné pletivo. U pšenice se jedná z vývojového hlediska o tzv. nukleární endosperm. V raných stádiích vývoje dochází pouze ke karyokinezi. Buněčné stěny se začínají vytvářet až po vzniku určitého počtu jader. V endospermu má dvě odlišné části – škrobnatý endosperm a aleuronovou vrstvu. Škrobnatý endosperm je v době zralosti tvořen buňkami zcela vyplněnými zásobními látkami (bílkovinami – gliadinem a gluteninem a především škrobem). Buňky škrobnatého endospermu jsou v době zralosti bez funkčního protoplastu. Aleuronová vrstva vzniká ke konci celularizace endospermu. U obilky pšenice je tvořena jednou vrstvou buněk na celé periférii endospermu. Buňky aleuronové vrstvy mají typický, více méně kubický, tvar odlišný od ostatních buněk endospermu. Výrazně se liší i svoji vnitřní strukturou. Především obsahují funkční protoplast, který obsahuje značné množství aleuronových zrn. Charakteristický je vysoký obsah lipidů a především hydrolytických enzymů. Aleuronová vrstva má významnou úlohu zejména při procesu klíčení. Méně často je zmiňována subaleuronová vrstva. Její buňky jsou v počátečních stádiích vývoje značně podobné buňkám aleuronové vrstvy, ale později je jejich struktura u pšenice shodná s ostatními buňkami endospermu (Batygina 1987). Zbývající struktury zárodečného vaku, synergidy i antipody jsou postupně u pšenice eliminovány.

S vývojem zárodku a endospermu je postupně rychle eliminován i nucelus. Jeho buňky jsou stlačovány a resorbovány. Přesná pozorování ukazují, že nucelární epidermis se stává součástí obalových vrstev obilky bez zřetelné buněčné struktury.

Pokud se týká integumentů, první zaznamatelnou změnou po oplození je zeslabování buněk vnějšího integumentu. Ztrácejí tvar a jsou postupně absorbovány,

až celý původní vnější integument vymizí. Obě vrstvy vnitřního integumentu přetrvávají, ale mění se jejich charakter. S postupným vývojem se buňky jeho vnější vrstvy stlačují, jejich zbývající lumen se vyplňuje, buněčné stěny se stávají hyalinními. Vzniká tzv. hyalinní vrstva. Buněčné stěny vnitřní vrstvy naopak tloustnou, takže tyto buňky nemění příliš svůj tvar. Ovšem ztrácejí protoplast. Vzniklý komplex představuje osemení – testu. U tzv. červených pšenic, ke kterým patří většina pěstovaných odrůd pšenice seté, se zde ukládají látky způsobující charakteristické zbarvení obilky. Jak uvádí Khlestina (2013) jedná se o proantokyanidiny. Směrem vně je tzv. kutikulární vrstva, která nebývá vždy uváděna. Vznikla v důsledku splnutí tenkých kutikul vnějšího vaječného obalu a vnitřní pokožky stěny semeníku.

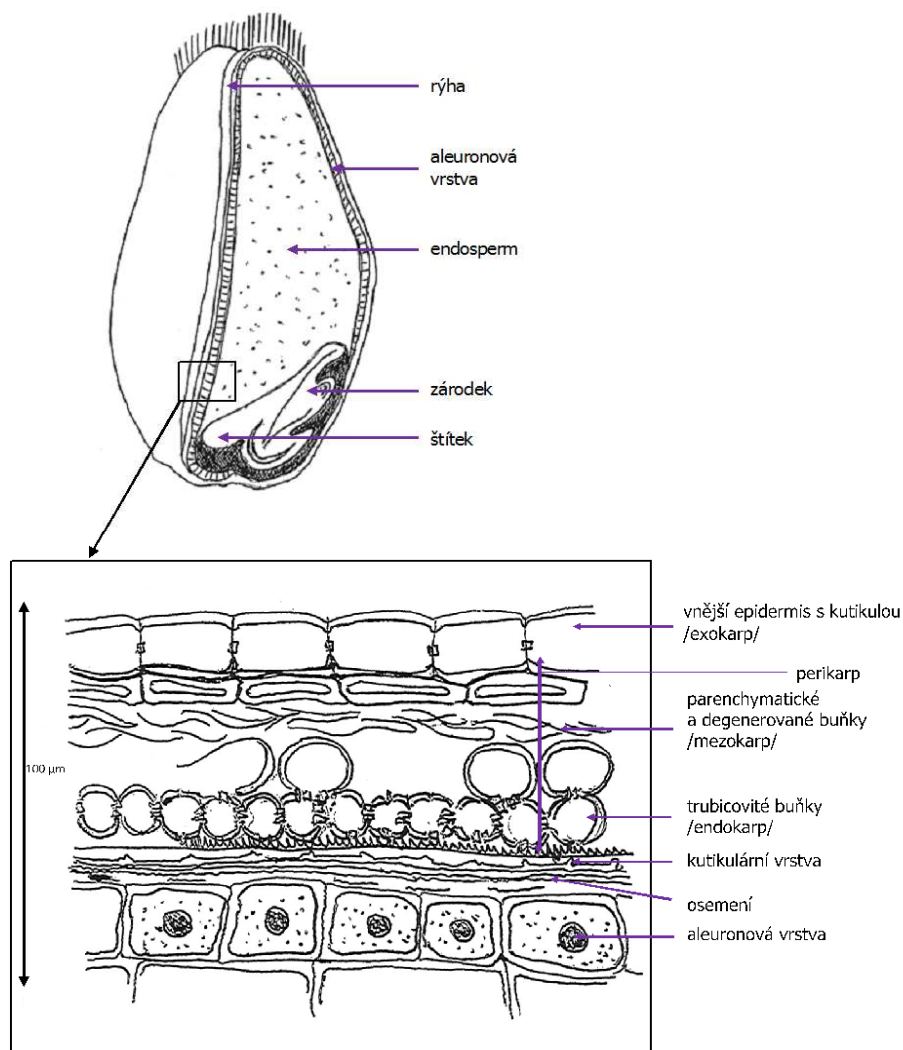
Ve stěně semeníku, ze kterého se vyvíjí oplodí – perikarp, dochází k první pozorovatelné změně v buňkách sousedících s chlorofylovou vrstvou směrem vně. Kromě vnější pokožky s kutikulou a dvou až čtyř vrstev parenchymatických buněk jsou ostatní parenchymatické vrstvy postupně absorbovány. Obdobně je absorbována, zcela nebo částečně, vnitřní pokožka semeníku. Buňky chlorofylové vrstvy se tangenciálně prodlužují. Nabývají protáhlý tvar, a proto se nazývají trubicovité buňky. Jejich stěna silně tloustne a je typická svými ztenčeninami. Dále tyto buňky ztrácejí chlorofyl a protoplast je resorbován. Protože je vnitřní pokožka buněk částečně nebo zcela eliminována, představují trubicovité buňky v klasickém schématu plodu endokarp. Vývoj postupuje dále i vně trubicovitých buněk. Zde je zachována pokožka, ale její buňky ztrácejí protoplasty a mají zmenšené vnitřní prostory. V klasickém schématu plodu se jedná o exokarp.

Zbývající parenchymatické buňky jsou dále částečně eliminovány. Buněčné stěny zbývajících dvou až tří řad parenchymatických buněk silně tloustnou, jejich protoplast je eliminován. Označují se jako tzv. příčné buňky. V klasickém schématu plodu se jedná o mezokarp. Stěny příčných buněk se postupně dostávají do bezprostředního kontaktu se stěnami trubicovitých buněk a spojují se s nimi. Buňky vnitřní pokožky semeníku, pokud jsou zachovány, se spojují s hyalinovou vrstvou. V místech, kde zachovány nejsou, se s hyalinovou vrstvou spojuje přímo vrstva trubicovitých buněk.

Zralá obilka obsahuje sice všechny části typické pro plod – perikarp (složený z exokarpu, mezokarpu a endokarpu) a semeno (skládající se z osemení, endospermu a zárodku), (obrázek 6). Všechny části jsou však vysoce modifikované. Všechny obalové

vrstvy, perikarp a osemení jsou spolu spojené. K tomuto spojení dochází v průběhu vývoje obilky. K tomu významně přispívá i oblast původní placentochalázy.

Obalové vrstvy jsou maternálního původu. Na jejich vzniku se nepodílely generativní procesy na rozdíl od zárodku a endospermu. Zárodek je diploidní s jednou sadou chromozomů maternálního původu a druhou sadou pocházející z pylu. Triploidní endosperm je tvořen dvěma sadami chromozomů maternálního původu a jednou sadou z pylu. Plně vyvinutá obilka pšenice má oválný tvar o délce 5–9 mm a šířce 2,5–4,5 mm. Je dorziventrálně zploštělá. Ventrální strana je hladká nebo mírně rýhovaná v závislosti na odrůdě. Na ventrální straně je rýha. Na apexu jsou četné trichomy. Zárodek se nachází na bázi obilky (obrázek 6). Největší část obilky zaujímá endosperm (80–85 %), následuje zárodek (2–3 %) a obaly obilky (13–17 %), (Šrámková et al. 2009). Obsah může být i odlišný od uváděných hodnot. Závisí na odrůdě i podmínkách pěstování. Na obojím závisí i konkrétní chemické složení obilky. Na toto téma existuje rozsáhlé množství literatury.



Obrázek 6: Podélný řez plně vyvinutou obilkou (Batygina 1987)

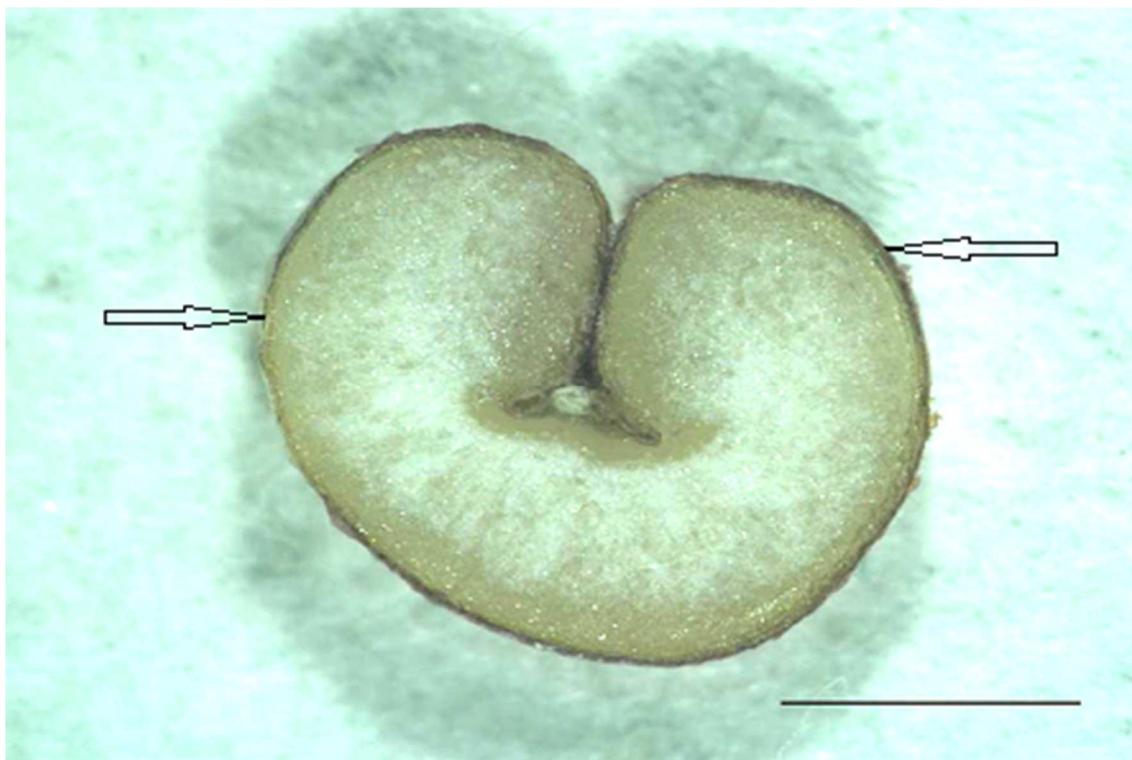
2.3 Zbarvení obilky pšenice

Obilky pšenice seté mohou mít různé zbarvení, to je způsobeno pigmenty různých skupin. Obilky většiny pěstovaných odrůd jsou zbarveny červeně. Pigment je tvořen deriváty katechinu a katechintaninu vznikajícími v procesu biosyntézy flavonoidů. Hlavním pigmentem je flobafen. Bílé obilky tato barviva neobsahují (Miyamoto & Everson 1958). Nyní je však známo, že flobafeny jsou deriváty flavan-4-olu, ale ne flavan-3-olu, které byly v původní práci detekovány v testu (Winkel-Shirley 2001). Na základě tohoto zjištění Khlestkina (2013) předpokládá, že červené zbarvení osemení je způsobeno nikoliv flobafeny, ale proantokyanidiny.

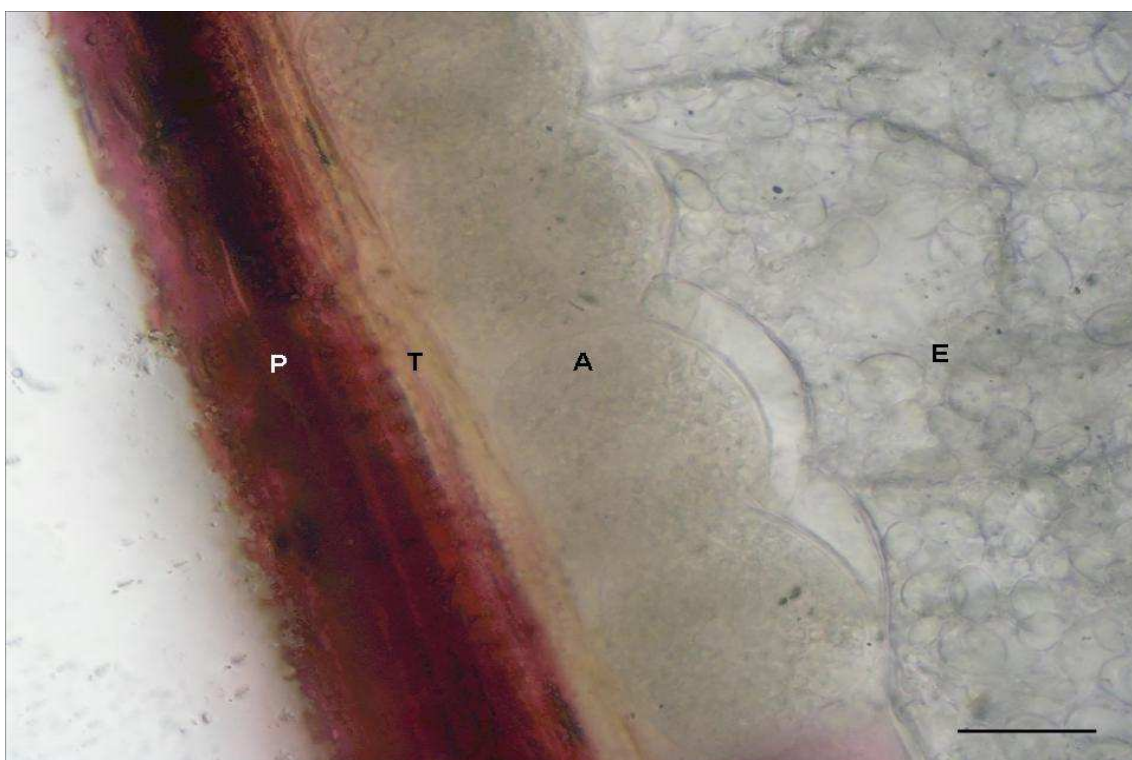
U některých odrůd nebo genotypů je zbarvení jiné – purpurové. Vyznačují se výskytem antokyanů v perikarpu obilek, kde jsou nejvíce zastoupeny kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid a kyanidinsukcinylglukosid (Abdel-Aal & Hucl 2003; Knievel et al. 2009). Další popisovanou barvou obilky je modrá. Modré obilky se liší od purpurových složením a zastoupením jednotlivých antokyanů a uložením jiných anatomických vrstvách (Abdel-Aal & Hucl 2003), což lze pozorovat zřetelně i na příčných řezech obilkou. Pigmenty jsou nejvíce zastoupeny delfinidin-3-glukosidem a delfinidin-3-rutinosidem a ukládají se do aleuronové vrstvy. Žluté zbarvení obilek je způsobené karotenoidy, především luteinem a zeaxantinem, které jsou ukládány ve škrobnatém endospermu. Obsah žlutého pigmentu je v současnosti nejvíce prostudován u *T. durum* (Zhang & Dubcovsky 2008; He et al. 2009). Lokalizaci a skupiny pigmentů ukazuje tabulka 2. Ukládání pigmentů není stejnoměrné, jak ukazuje příklad purpurového perikarpu (obrázky 7 a 8).

Tabulka 2: Zbarvení obilek a skupiny pigmentů, které je způsobují

zbarvení obilky	skupina pigmentů	lokalizace
červená	deriváty katechinu	perikarp, testa
purpurová	antokyaniny (kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid)	perikarp
modrá	antokyaniny (delfinidin-3-glukosid, delfinidin-3-rutinosid)	aleuronová vrstva
žlutá	karotenoidy (lutein, zeaxantin)	endosperm
bílá	bez pigmentu	



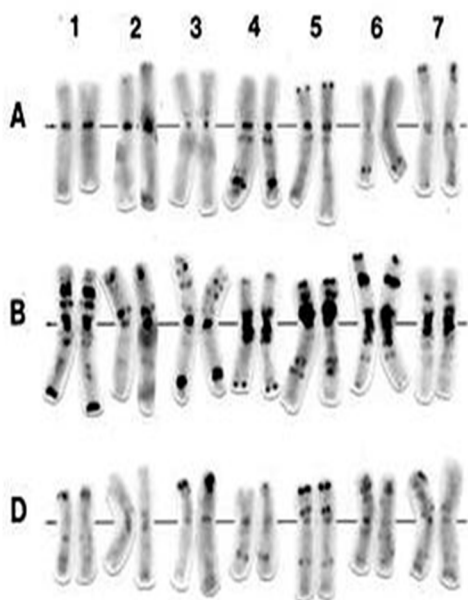
Obrázek 7: Příčný řez obilkou genotypu ANK-28B s purpurovým perikarpem. Ukládání pigmentů po obvodu obilky není stejnoměrné, rozdíly vyznačeny šipkami. (měřítko = 1 mm)



**Obrázek 8: Příčný řez obilkou genotypu ANK-28B s purpurovým perikarpem. Ukládání pigmentů v perikarpu není stejnoměrné. (měřítko = 200 μ m)
P – perikarp, T – testa, A – aleuronová vrstva, E – endosperm**

2.4 Lokalizace genů zodpovědných za zbarvení obilek

Tabulka 3: Geny odpovědné za zbarvení obilek a jejich umístění a aktuální značení



CHROMOZOM	OZNAČENÍ GENU
Červená barva	
3AL	<i>R-A1</i>
3BL	<i>R-B1</i>
3DL	<i>R-D1</i>
Purpurová barva	
2A	<i>Pp3a, Pp3b</i>
6A	<i>Pp2</i>
7D	<i>Pp-D1</i>
Modrá barva	
4A	<i>Ba2</i>
4BS	<i>Ba1</i>
Žlutá barva	
5A	<i>Psy2-A1</i>
5B	<i>Psy2-B2</i>
7AL	<i>Psy1-A1</i>
7BL	<i>Psy1-B1</i>
7DL	<i>Psy1-D1</i>

Obrázek 9: Chromozomy hexaploidní pšenice seté

2.4.1 Červené zbarvení

Červená barva obilek se vyskytuje u většiny běžných evropských odrůd pšenice, ovládána je jednou ze tří dominantních alel *R-A1* (na chromozomu 3AL), *R-B1* (3BL) a *R-D1* (3DL), (obrázek 9, tabulka 3). Bílá barva obilky je způsobena recesivními alelami *r-A1*, *r-B1* a *r-D1*.

2.4.2 Purpurové zbarvení

Purpurová barva obilek je způsobena antokyany. U pšenice seté se mohou antokyany objevovat u několika dalších orgánů – koleoptyle, stébla, listové čepele i pochvy, oušek i jazýčku, pluch, prašníků. Pomocí klasické genetické analýzy byly identifikovány

dominantní geny, které jsou zodpovědné za tento znak. Jsou označovány jako *Rc* (red coleoptile), *Pc* (purple culm), *Plb* (purple leaf blade), *Pls* (purple leaf sheath), *Pan* (purple anther), *Pp* (purple perikarp) a *Ba* (blue aleuron). Podrobně o celé nomenklatuře pojednává Katalog genových symbolů u pšenice (MacIntosh et al. 2013). Tyto geny pojmenované purple pericarp (*Pp*) se nacházejí v genomu A a B (obrázek 9, tabulka 3).

Celá tato problematika je pak shrnuta v práci, kterou publikoval Zeven (1991). Nejnovější zjištění naznačují, že geny *Pc*, *Plb*, *Pls*, a *Pp* jsou transkripčními regulátory genů biosyntetické dráhy antokyanů. Sekvence těchto genů nejsou dosud známy, a proto není možné studium jejich přímé úlohy (Tereshchenko et al. 2013). Z tohoto důvodu se práce, které věnují problematice vzniku antokyanů v různých orgánech, dosud soustřeďují na geny biosyntetické dráhy antokyanů, jejichž sekvence jsou známy. Poznatky týkající se uvedených genů byly získány klasickou genetickou analýzou, v poslední době kombinovanou s molekulárně biologickými metodami (srov. Khlestkina 2013).

V samotné obilce purpurových pšenice se tedy ukládají antokyaniny v perikarpu. Genetický zdroj purpurového zbarvení perikarpu pšenice seté pochází pravděpodobně z tetraploidních pšenice původem z Etiopie. Je známo, že první vzorky byly poslány z Etiopie do Německa německým botanikem G. W. Schimperem (1804–1878). Odtud se pak dostaly do dalších zemí (Austrálie, USA, Kanady, Ruska), kde posloužily k využití nejdříve především v praxi. Dodnes není zcela jasné, o jaký taxon nebo směs taxonů se jednalo. Ještě složitějším se problém stal tím, že docházelo ke složitým křížením s dalšími, často nepřesně definovanými taxony. K tomu ještě přispívá nejednotný pohled na taxonomii pšenice, jak je zmíněno výše. O celém poměrně složité otázce pojednává podrobně Zeven (1991). Celou problematiku dále komplikuje to, že purpurové zbarvení obilky pšenice seté může mít různou intenzitu od plně purpurové, která se může jevit až jako černá po světlejší hnědopurpurovou. Různou intenzitu zbarvení mohou ovlivňovat jak genetické faktory, tak faktory vnějšího prostředí, především teplota a světlo (Zeven 1991). Významný vliv světla prokázal už Sharman (1958). To mohlo mít významný vliv na interpretaci získaných výsledků. Popsané problémy zřejmě přispívají k tomu, že otázka původu genetické podmíněnosti purpurového zbarvení není zcela vyřešena přesto, že jí věnována pozornost s pomocí klasických genetických a v poslední době i molekulárně

biologických metod více jak 55 let. Zdá se, že je velmi důležitá přítomnost funkčních alel dvou komplementárních genů ze dvou různých genomů (A a D v případě pšenice seté A a B v případě pšenice tvrdé – *T. durum*), protože purpurové zbarvení perikarpu bylo zjištěno jen u alopolyploidních druhů (Khlestkina 2013).

U tetraploidní pšenice Sharman (1958) jako první zjistil jeden dominantní gen zodpovědný za purpurové zbarvení perikarpu. Copp (1965) doložil, že se tento gen dostal z pšenice tetraploidní do hexaploidní pšenice. Výsledky, které získali MacIntosh & Baker (1967), ukázaly, že za toto zbarvení jsou zodpovědné dva komplementární dominantní geny. Bolton (1968, 1970) provedl řadu velmi zajímavých křížení. Zjistil v genomu hexaploidní pšenice tři geny zodpovědné za purpurové zbarvení perikarpu. Označil je symbolem *P1*, *P2* a *P3* (purple). Je jen škoda, že je originální práce nedostupná. Z abstraktu, který je dostupný si nelze udělat úplnou představu o jeho pokusech. V dalších pracích byly popisovány jen dva geny. Piech & Evans (1979) potvrdili u hexaploidní pšenice existenci dvou komplementárních dominantních genů a pomocí monosomické analýzy je lokalizovali na chromosomech 3A a 7B. Griffin (1987) vyslovil předpoklad, že tyto dva dominantní geny vznikly duplikací. Už dříve zjistili Gilchrist & Sorrells (1982) u temně purpurově zbarvených obilek genotypu Charcoal, že je tento znak ovládaný duplikovanými geny, které jsou dominantní.

Arbuzova et al. (1998) odvodili dvě blízce isogenní linie nesoucí geny pro purpurové zbarvení obilky z australského genotypu Purple Feed a kanadského genotypu Purple na genetickém pozadí genotypu Saratovskaya 29, který má obilky červené. Arbuzova & Maystrenko (2000) využili získané linie pro monosomatickou analýzu a našli tři geny. Gen *Pp1* z genotypu Purple Feed lokalizovali na chromozomu 7B a gen *Pp2* na chromozomu 6A. Gen *Pp1* z genotypu Purple se nachází na chromozomu 7B a gen *Pp3* na chromozomu 2A. Je zajímavé, že už Bolton (1968) pozoroval nezávislou segregaci tří genů pro purpurové zbarvení obilky u zcela jiných genotypů.

Velký posun vnesly do této problematiky molekulárně biologické metody. Použití molekulárních markerů umožnilo zjištění, že se skutečně jedná o dva komplementární geny. Dva dříve uvažované geny (*Pp2* a *Pp3*) se ukázaly jako dvě alely stejného genu. Komplementární geny pro purpurový perikarp *Pp1*, *Pp2* a *Pp3* byly nově označeny jako *Pp1* a *Pp3*, kde gen *Pp3* představuje dvě různé alely pod označením *Pp3b* a *Pp3a*

(Dobrovolskaya et al. 2006). Ke stejnému závěru, že se jedná o dvě různé alely stejného genu, dospěli ve stejné době na základě křížení (Kniewel et al. 2009).

Zároveň bylo provedeno pomocí mikrosatelitních markerů i genetické mapování (Dobrovolskaya et al. 2006, Khlestkina et al. 2008). Uvedené novější označení je jednodušší, ale není poslední. Tereshchenko et al. (2012) potvrdili starý předpoklad s pomocí mikrosatelitních markerů, že gen pro purpurové zbarvení obilky se dostal do genomu pšenice seté z genomu pšenice tvrdé. Uvedení autoři předpokládají, že se jedná o ortologní geny. U pšenice tvrdé se však nachází na chromozomu 7B, zatímco u pšenice seté je umístěn tento gen na chromozomu 7D. Aby autoři tyto geny od sebe odlišili, označili gen *Pp1* pšenice seté jako *Pp-D1*. Zdá se, že se bude označování genů dále komplikovat (srov. Khlestkina 2013).

2.4.3 Modré zbarvení

Modrá barva obilek je způsobena ukládáním antokyanů do aleuronové vrstvy. Je kódována geny *Ba*. Modrá barva aleuronové vrstvy je řízena kodominantně působícím genem *Ba1*. Do pšenice se tento gen dostal přenesením celého ramena chromosomu z *Thinopyrum ponticum* Podp., které bylo zabudováno do chromozomu 4BS (Qualset et al. 2005). Genotyp Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen obsahuje odlišný gen *Ba2*, který byl přenesen disomickou substitucí chromozomu 4A z *Triticum monococcum* ssp. *aegilopoides* (Dubcovsky et al. 1996, Singh et al. 2007). Odchytky ve způsobu dědičnosti ukazují, že *Ba1* a *Ba2* jsou odlišné geny (Mettin et al. 1991). Katalog genetických symbolů pšenice uvádí kromě výše uvedených dvou genů ještě geny se slabší expresí modré barvy 'half-blue', které se vyskytly ve vzorku *T. monococcum* spp. *aegilopoides*. Další možný gen pro modrou aleuronovou vrstvu by mohl být na místě chromozomu 4D, který byl substituován chromozomovým párem z *Agropyron elongatum* u genotypu Xiao Yian pocházející z Číny (Zeller et al. 1991). Výsledky zobrazení chromozomů pomocí metody FISH a GISH provedené u části genotypů s modrou aleuronovou vrstvou s přenesenými chromozomy nebo jejich segmenty z *Thinopyrum ponticum* prokázaly, že genové zdroje s modrou obilkou lze rozdělit podle velikosti přenesených segmentů, jejich umístění na chromozomech a počet chromozomů lze rozdělit do šesti rozdílných skupin (Burešová et al. 2013). Tato skutečnost ukazuje na velkou genetickou různorodost mezi jednotlivými genovými zdroji vyznačujícími

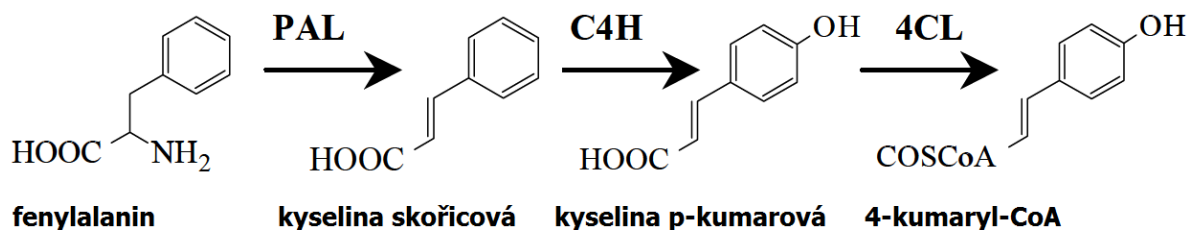
se modrým aleuronem obilky a je potřeba uvažovat, že *Agropyron elongatum* a *Thinopyrum ponticum* jsou jedny z mnoha synonym vzhledem k používané nomenklatuře rodu pšenice.

2.4.4 Žluté zbarvení

Žlutá barva obilky je podmíněna ukládáním karotenoidů do endospermu obilky. Geneticky se jedná o dva geny *Psy1* a *Psy2*, které se nacházejí v 7. a 5. skupině homeologických chromozomů (Pozniak et al. 2007). Ty ovlivňují biosyntetickou dráhu karotenoidů, konkrétně enzym fytoensyntázu. Nejvíce jsou prozkoumány *Psy1-A1* (na 7AL), *Psy1-B1* (7BL), *Psy1-D1* (7DL), *Psy2-A1* (5A), *Psy2-B1* (5B), *Psy1-A1* (7AL), *Psy1-B1* (7BL), *Psy1-D1* (7DL), *Psy2-A1* (5A), *Psy2-B2* (5B), (Howitt et al. 2009, Catalogue of Genetic Symbols for wheat). V České republice byly registrovány německé odrůdy Citrus a Luteus, které obsahují karotenoid lutein a zeaxantin.

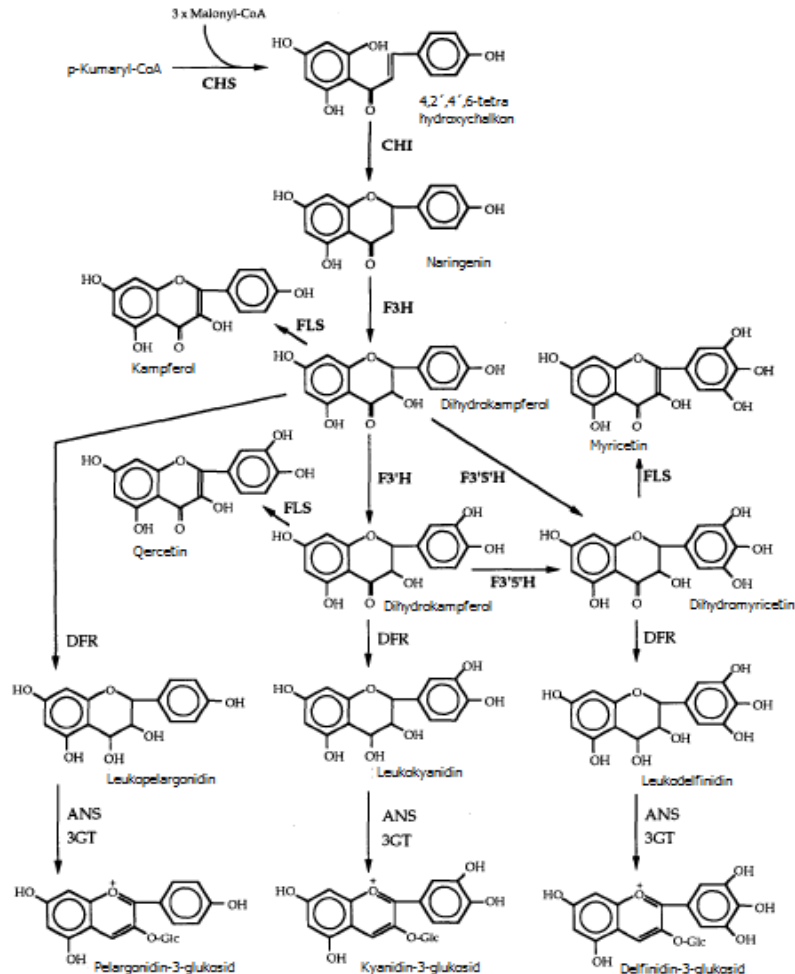
2.5 Biosyntetické dráhy a geny zodpovědné za produkci antokyanů

Antokyaniny jsou řazeny mezi fenolické látky. Tyto látky vytvářené v rostlinách vznikají po většinou fenylypropanoidovou a fenylypropanoidacetátovou cestou. Klíčovými enzymy jsou při fenylypropanoidové cestě fenylyalaninamoniolyáza (PAL) a tyrosinamoniolyáza (TAL), (obrázek 10). Jejich posláním je konverze fenylyalaninu na kyselinu skořicovou a tyrosin na kyselinu p-kumarovou. Velký význam mezi fenolickými látkami zaujímají právě flavonoidy, kterých je dnes známo více než 4500 sloučenin (Klejdus 2004). Antokyaniny jsou na světle nestabilní a ve vodě nerozpustné, tudíž se obvykle přirozeně nenachází ve volném stavu. Místo toho se ve vakuolách buňky vyskytují sloučené s cukry, které jim poskytují stabilitu a rozpustnost ve vodě. V tomto případě je aglykonová (necukerná) část označována jako antokyanidin (De Pascual-Teresa et al. 2010).



Obrázek 10: Počátek biochemické dráhy syntézy antokyanů
(PAL fenylalaninamoniumlyáza, C4H – cinamát 4-hydroxyláza, 4CL
4-kumaryl-CoA-ligáza)

Biochemická dráha syntézy antokyanů je velmi dobře propracována a patří k metabolickým systémům rostlin, které jsou v současnosti dále intenzivně studovány (Winkler-Shirley 2001, obrázek 11). Velké množství enzymů se podílí na regulaci těchto drah. Hlavním enzymem je zde chalkonsyntáza (CHS). Dále do této dráhy patří chalkonisomeráza (CHI), flavanon 3-hydroxyláza (F3H), dihydroflavonol 4-reduktáza (DFR), antokyanidinsyntáza (ANS), UDPG-flavonoidglukosyltransferáza (UFGT).



Obrázek 11: Biochemická dráha vedoucí k syntéze antokyanů (Holton & Cornish 1995)

(**CHS** – chalkonsyntáza, **CHI** – chalkonizomeráza, **F3H** – flavanon-3-hydroxyláza, **FLS** – flavonolsyntáza, **F3'H** – flavonoid-3'-hydroxyláza, **F3',5'H** – flavonoid-3',5'-hydroxyláza, **DFR** – dihydroflavonol-4-reduktáza, **ANS** – antokyanidinsyntáza, **3GT** – flavonoid-3-O-glukosyltransferáza)

Strukturní geny, které jsou zodpovědné za produkci enzymů, jsou v současnosti intenzivně studovány. Vznik každého enzymu je podmíněn nejméně jedním genem. Základním kritériem rozdělení genů jsou období, kdy se projevují jejich produkty (enzymy). Geny kódující enzymy působící v rané fázi se označují jako Early Biosynthesis Genes (EBGs) a geny působící v pozdní fázi patří do skupiny Late Biosynthesis Genes (LBGs) (Nesi et al. 2001). Do skupiny genů působící v rané fázi jsou řazeny *CHS*, *CHI* a *F3H*. Do druhé skupiny uplatňující se v pozdní fázi jsou zařazeny geny *DFR*, *ANS* a

UFGT. Každá z těchto skupin je regulována jiným sledem transkripčních faktorů (Martin et al. 1991).

Geny pro enzymy mohou být v genomu ve více kopiích. Velké množství rostlin nese více kopií genu pro chalkonsyntázu (*CHS*), jejichž exprese může být jak konstitutivní, tak ovlivněná časově, místně anebo v závislosti na vějších podmínkách, jako je UV záření či interakce s patogeny (Koes et al. 1986). *CHS* byl detekován na homeologické skupině 1 (na krátkém raménku 1B a 1D) a 2 (Li et al. 1999). Při provedení experimentu s bílými obilkami, *Thinopyrum ponticum* a s pšenicí s modrými obilkami, která vznikla pravděpodobně zkřížením pšenice s planým druhem *Thinopyrum ponticum*. Díky sekvenaci DNA byly získány 2 odlišné kopie cDNA *CHS*, které byly velmi podobné. Nukleotidové sekvence se vyznačovaly více než 96% podobností a shoda na úrovni aminokyselin byla vyšší (98,9 %), což je dáno degenerovaností genetického kódu. Tento rozdíl odpovídá rozdílu ve čtyřech aminokyselinových zbytcích. Dvě kopie cDNA *CHS* byly izolovány z jedinců s modrými obilkami, ale pouze jedna z pšenice s bílými obilkami a stejně tak jedna z *Thinopyrum ponticum*. Sekvence těchto genů obsahuje pouze jeden intron a jsou evolučně velmi konzervované. Southernův blotting ukázal, že genom pšenice s modrými obilkami obsahuje nejméně čtyři kopie *CHS* (Yang et al. 2004).

Řada dalších genů již byla také popsána. U některých byla sledována i jejich exprese. Liu et al. (2005) izolovali nejdříve 3 geny kódující dihydroflavonol-4-reduktázu u pšenice s purpurovými obilkami. Pomocí *in situ* hybridizace zjistili, že jejich transkripty jsou lokalizovány pouze v testě. Avšak antokyanové pigmenty byly lokalizovány i v perikarpu. To ukazuje, že do jeho buněk musí být transportována buď mRNA, nebo příslušné enzymy anebo dokonce samotné pigmenty. Celá problematika je pak o mnoho složitější, protože musí existovat mechanismy tohoto transportu. Ty musí být regulovány dalšími geny a ovládány transkripčními faktory. Produkce antokyanů je z genetického hlediska ovládána geny, které jsou zodpovědné za tvorbu enzymů pro syntézu a degradaci daných pigmentů a genů, které mají regulační funkci, tzv. regulační faktory (Ficco et al. 2014). Už Himi a Noda (2005) naznačili, že geny popisované klasicky jako strukturní geny řídící barvu obilek (*Pp*) jsou ve skutečnosti transkripčními faktory. Khlestkina (2013) vyslovila předpoklad, že geny určující zbarvení všech orgánů pšenice mohou patřit do rodin *Myb*- a *Myc*-like genů, které kódují transkripční faktory strukturních genů v rostlinách.

Ahmed et al. (2006) se věnovali zbarvení koleoptyle u různých druhů pšenice ve vztahu k osvětlení rostliny. Výsledky studie ukazují, že působení světla vyvolává expresi genů Early Biosynthesis Genes (*EBGs*) a Late Biosynthesis Genes (*LBGs*) pro syntézu antokyanů (Ahmed et al. 2006). Tyto výsledky naznačují, že gen *Rc* reguluje pouze expresi LBG. Dalším závěrem studie Ahmed et al. (2006) bylo, že pigmentace antokyanů koleoptyle pšenice je vyvolána pouze světelnou aktivací. Hartmann et al. (2005) provedli pokus s huseníčkem rolním (*Arabidopsis thaliana*), které byly na 70 hodin uzavřeny do prostoru bez UV záření. U sledovaných genů *CHS*, *CHI*, *F3H* a *FLS* byla míra transkripce výrazně snížena. Po přesunu rostlin do prostředí s bílým světlem obsahující také UV, byl z listů první přepis těchto genů detekován už po šesti hodinách ozařování (Hartmann et al. 2005). V testovaných orgánech huseníčku (květy, listy, plody) byly přepisy genů detekovány buď všechny anebo žádný z nich. Pro biosyntézu flavonoidů jsou tedy potřebné přepisy všech čtyř genů, i když ne ve stejné míře (Hartmann et al. 2005). Biosyntetická dráha různých skupin flavonoidů je regulována transkripčními faktory při transkripci genů v závislosti na různých podnětech, v různých orgánech a v různých vývojových stádiích. Tato oblast je dalším námětem pro detailnější studium.

2.6 Regulační geny biosyntézy flavonoidů

Regulace genové exprese je nezbytná pro všechny organizmy. Jedná se o kontrolní mechanismus, díky kterému rostlina reaguje na biotické nebo abiotické procesy a řídí vlastní vývojové procesy (Feller et al. 2011). Regulace genové exprese biosyntetické dráhy flavonoidů je druhově odlišná. Vědecké studie prozatím odhalily výrazné rozdíly mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Nejpodrobněji je regulace genové exprese popsána u kukuřice, huseníčku a petúnie, u kterých jsou známy transkripční faktory (TFs), podílející se na regulaci exprese a jejich vzájemné interakci (Dubos et al. 2010). Funkce transkripčních faktorů je aktivace či inhibice transkripce, popřípadě interakce protein-protein, kde mohou zastávat roli aktivátora či represora (Feller et al. 2011). Mezi transkripční faktory patří MYB, basic helix-loop-helix proteiny (bHLH) a WDR (tryptofan-aspartam repeats).

2.6.1 MYB faktory

Faktory MYB jsou obecně největší skupinou TFs známou v říši rostlin (Qu & Zhu 2006). Klempnauer et al. (1982) jako první popsali obecnou strukturu transkripčního faktoru a nazvali ho „MYB“ podle genomu viru ptačí myeloblastózy (AMV), ze kterého byl izolován. Další studie ukázaly, že MYB proteiny jsou obsaženy ve všech eukaryotických organizmech (Lipsick 1996, Kranz et al. 2000, Feller et al. 2011).

Kukuřice setá (*Zea mays*) obsahuje regulační *C1* gen (Colorless1), který je zodpovědný za biosyntézu fialového pigmentu antokyaninu v aleuronové vrstvě (Paz-Ares et al. 1987, Feller et al. 2011). U huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) mezi MYB faktory patří Production of Anthocyanin Pigment 1 a 2 a u petúnie zahradní (*Petunia x atkinsiana*) Anthocyanin2 (AN2).

MYB protein sestává z jednoho až čtyř opakování (R). Všechna R obsahují 52 aminokyselinových zbytků, z nichž každý vytváří strukturu helix-turn-helix (HTH) se třemi tryptofanovými (nebo hydrofobními) zbytky, formující hydrofobní jádro v 3D HTH struktuře (Kanei-Ishii et al. 1990, Ogata et al. 1996, Dubos et al. 2010). Jak bylo zmíněno výše, MYB proteiny se rozdělují do skupin v závislosti na počtu opakování (R). Opakování MYB proteinu jsou popisována jako R1, R2 a R3. U rostlin se rozdělují MYB faktory do tří základních skupin: R3-MYB, R2R3-MYB, a R-MYB (Qu & Zhu 2006).

Skupina faktorů R3-MYB (R1R2R3 MYB) má tak tři opakování a v genomu vyšších rostlin jsou kódované pět genů (Dubos et al. 2010). Jejich funkce je řízení transkripce cyklinů v pozdní G₂ fázi a M fázi buněčného cyklu (Ito et al. 1998).

Skupina faktorů R2R3-MYB disponuje transkripční aktivační, resp. inhibiční doménou (Paz-Ares et al. 1987). Jejich funkcí je kontrola buněčného vývoje, regulace primárního a sekundárního metabolismu v rostlině, reakce na biotické nebo abiotické vlivy vyvolané hormony nebo patogeny a rozhodují také o pozici jednotlivých orgánů rostliny (Stracke et al. 2001, Dubos et al. 2010).

Poslední skupina proteinů MYB je označována jako R-MYB (MYB-related). Je to nejvíce heterogenní skupina faktorů, která zahrnuje proteiny s jedním nebo částečným opakováním (Rosinski & Atchley 1998, Dubos et al. 2010). Funkcí proteinů R-MYB jsou například: řízení genové exprese přímo nebo nepřímo pomocí modifikace histonů

a přestavby chromatinu (Marian & Bass 2005), ovlivnění tvorby trichomů a kořenových vlásků a řízení cirkadiální periody (Lu et al. 2009). Některé R-MYB faktory soutěží s R2R3-MYB faktory o vazebná místa kofaktorů typu bHLH a to v případě, pokud R-MYB má doménu podobnou jako R3 (laterální inhibice), (Schellmann et al. 2002; Kirik et al. 2004; Wester et al. 2009).

2.6.2 bHLH faktory

Základní helix-loop-helix proteiny (bHLHs) jsou součástí eukaryotických organizmů a zauímají jednu z největších rodin transkripčních faktorů (Riechmann et al. 2000; Carretero-Paulet et al. 2010). Je známo asi 638 *bHLH* genů, které jsou rozříděny do 32 skupin (Carretero-Paulet et al. 2010). Toto číslo není konečné, stále dochází k objevování nových genů. Tyto proteiny ovládají mnoho regulačních procesů.

Současné studie odhalují množství biologických procesů v rostlině, které bHLHs proteiny regulují: podílí se na světelné signalizaci rostlině, hormonální signalizaci, poškození rostliny, stresové zátěži z důvodu nadměrného sucha, regulují tvorbu prýtlů, plodů, květů, stomat, trichomů i kořenů (Carretero-Paulet et al. 2010). Byly popsány i funkce u zvířat, kde se bHLHs podílí na regulaci buněčného cyklu, cirkadiálních rytmech a v neposlední řadě regulují některé základní procesy, například neurogenezi, myogenezi, proliferaci či diferenciaci buněk (Atchley & Fitch 1997; Ledent & Vervoort 2001, Carretero-Paulet et al. 2010).

Doména bHLH se skládá z 60 aminokyselin uspořádaných do dvou odlišných oblastí. Bazická oblast na N-konci proteinu obsahuje asi 15 až 20 zbytků obsahujících bazické aminokyseliny vázající šestinukleotidový E-box (CANNTG) DNA (Carretero-Paulet et al. 2010). Vazba na DNA je možná v případě, že protein bHLH obsahuje alespoň 5 bazických aminokyselin a vysoce konzervovaný motiv HER (His5-Glu9-Arg13), na vazbě aminokyselin se podílí také doprovodné nukleotidy mimo jádro (Atchley & Fitch 1997, Ledent & Vervoort 2001, Carretero-Paulet et al. 2010). HLH oblast je tvořena dvěma antipatickými α -helixy složených zejména z hydrofobních zbytků aminokyselin (Carretero-Paulet et al. 2010). HLH komplex umožňuje tvorbu komplexu protein-protein a vytváří tak homodimerní, resp. heterodimerní komplexy (Massari & Murre 2000, Carretero-Paulet et al. 2010).

Studie Ludwig et al. (1989) se věnovala kukuřičnému lokusu *R*, který je odpovědný za vzor antokyanové pigmentace na rostlině, zároveň v této studii popsali členy skupiny *R* genu: *P*, *S* a *Lc*. U kukuřice jsou regulační faktory MYB a bHLH kódovány dvěma multigenními skupinami: P/C1 a Booster (B)/R. Obě skupiny jsou specificky časově a místně exprimovány. Kao et al. (1996) popsali strukturu C1 genu. Promotorová oblast obsahuje minimálně tři *cis*-regulační elementy. Gen C1 obsahuje několik důležitých segmentů: oblasti regulující kyselinu abscisovou a zvýšení exprese VIVIPAROUS1 jsou v blízkém sousedství, region pro indukci exprese světlem je uložen blíže k počátku genu. Analýza sekvence regulačního genu B (Booster) ukázala na 2 konzervované regiony. První je složen z kyselých aminokyselinových zbytků sloužící jako transkripční aktivační doména, druhý bHLH je schopen vázat se na DNA nebo spojovat podjednotky do dimerů. Doména bHLH není potřebná pro funkci proteinu. Pro aktivaci transkripce je nutná nejprve vazba C1 proteinu na B protein, samostatný C1 protein není aktivace transkripce schopen. Ukazuje se, že tvorba B/C1 komplexu může zvyšovat specifitu i afinitu některých DNA domén dodávaných každým proteinem (Goff et al. 1992). Spelt et al. (2000) našli u petúnie dva bHLH proteiny: Anthocyanin1 (AN1) a JAF13. Tyto proteiny reagují s AN2 (R2R3-MYB protein).

2.6.3 WDR proteiny

U petúnie zahradní (*Petunia × atkinsiana*) byly objeveny malé proteiny WDR, rovněž ovlivňující biosyntetickou dráhu flavonoidů. Tyto proteiny interagují s bHLH faktory a některými faktory ze skupiny MYB proteinů, konkrétně R2R3-MYB. Jedním z WDR proteinů je Anthocyanin11 (AN11), který obsahuje 5–6 konzervovaných WDR. Mutace genu pro expresi tohoto proteinu způsobuje ztrátu zbarvení květu. Gen s podobnou funkcí byl nalezen také u kukuřice seté (*Zea mays*) nazvaný *pale aleurone color1 (PAC1)* i u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) Transparent tesla glabra1 (*TTG1*), (Selinger & Chandler 1999). Carey et al. (2004) zjistili, že u *TTG1* mutantních linií může *PAC1* gen nahradit *TTG1*.

2.6.4 Negativní regulace

Aktivita genů syntetizujících antokyaniny, resp. flavonoidy je regulována i negativně na transkripční úrovni. Burr et al. (1996) popsali faktor *intensifier1* (INT1) u kukuřice,

jehož recesivní mutace zvyšovala zbarvení obilky produkcí flavonoidů v aleuronové vrstvě. Zmnožení DNA pomocí PCR ukázalo, že méně než 0,2 % z transkriptu *Int1* je stříženo správně. Toto zjištění může znamenat, že chybné štěpení přirozeně vyrovnává silný aktivátor genů v antokyanové dráze (Burr et al. 1996).

Posunutím rámce na konci domény aktivující transkripci u C1 lze vytvořit dominantní inhibitor (C1-I) antokyanových strukturních genů (Goff et al. 1992; Burr et al. 1996, Chen et al. 2004). Touto změnou aktivační domény a vazebné domény DNA lze zablokovat trans-aktivační funkci C1. Inhibiční vlastnosti nejsou lokalizované v rámci jedné funkční domény, ale projevují se na základě adičního efektu vícenásobných změn. Goff et al. (1992) použili spojení standardního typu proteinu C1 a dominantního inhibitoru C1-I pro analýzu změn v počtu aminokyselinových zbytků v proteinu C1-I. Změny v N-koncových a C-koncových doménách mohou snížit či úplně odebrat proteinu *trans*-aktivační funkci.

Z uvedených poznatků v literárním přehledu je zřejmé, že se jedná o komplikovanou problematiku. Další studium je nutné a zabere ještě mnoho let. Postup může zefektivnit skutečnost, že již bylo dokončeno čtení genomu pšenice (Mayer et al. 2014).

3. CÍLE

Pro dosažení cílů při vyhledávání a charakteristice genů zodpovědných za purpurové zbarvení obilek pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) bylo použito několik dílčích strategií:

- výběr genetického materiálu a sestavení souboru a podrobení dílčím genetickým analýzám příbuznosti s využitím mikrosatelitních markerů
- porovnání souboru s možným donorem genů pro purpurové zbarvení obilky
- sledování ukládání pigmentů v průběhu vývoje ve vztahu anatomické stavby obilky
- stanovení množství obsahu hlavních složek pigmentů během zrání obilky
- charakteristika kandidátní sekvence genu a její bioinformatická analýza
- průběh exprese genu zodpovědného za produkci klíčového enzymu biosyntetické dráhy antokyanů v průběhu vývoje obilky.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Experimentální materiál

Pro úvodní experimenty byly použity genotypy jarní formy pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), (tabulka 4) s různě zbarvenou obilkou a planě se v přírodě vyskytující druh *Thinopyrum ponticum*.

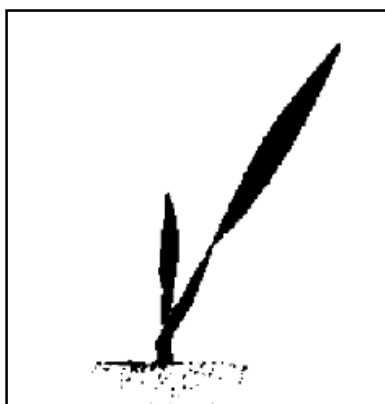
Tabulka 4: Charakteristika experimentálního materiálu

<i>označení genotypu</i>	<i>barva obilky</i>	<i>forma</i>	<i>země původu</i>
Novosibirskaya 67 (N67)	bílá	jarní	RUS
ANK-1A, ANK-1B, ANK-1C, ANK-1D, ANK-1E	červená	jarní	
ANK-28A, ANK-28B	purpurová	jarní	
Abyssinskaya Arraseita		jarní	CZE
Konini		jarní	NZL
Purple		jarní	USA
Purple feed		jarní	USA
Indigo		ozim	ENG
Citrus, Luteus		žlutá	ozim
Bona Dea	ozim		SVK
<i>Thinopyrum ponticum</i>	možný donor pur. zbarvení	ozim	TUR

CZE – Česká republika, ENG – Velká Británie, GER – Německo, NZL – Nový Zéland, POL – Polsko, RUS – Rusko, SVK – Slovensko, TUR – Turecko, USA – Spojené státy americké

Materiál pro studium genetické příbuznosti uvedených genotypů byl připraven v laboratoři Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Obilky byly naklíčeny na Petriho miskách na filtračním papíře s použitím destilované vody při laboratorní teplotě. Matricí pro izolace sloužily listy rostlin pšenice. Tyto rostliny se při odběrech nacházely ve vývojové fázi prvního listu, což odpovídá

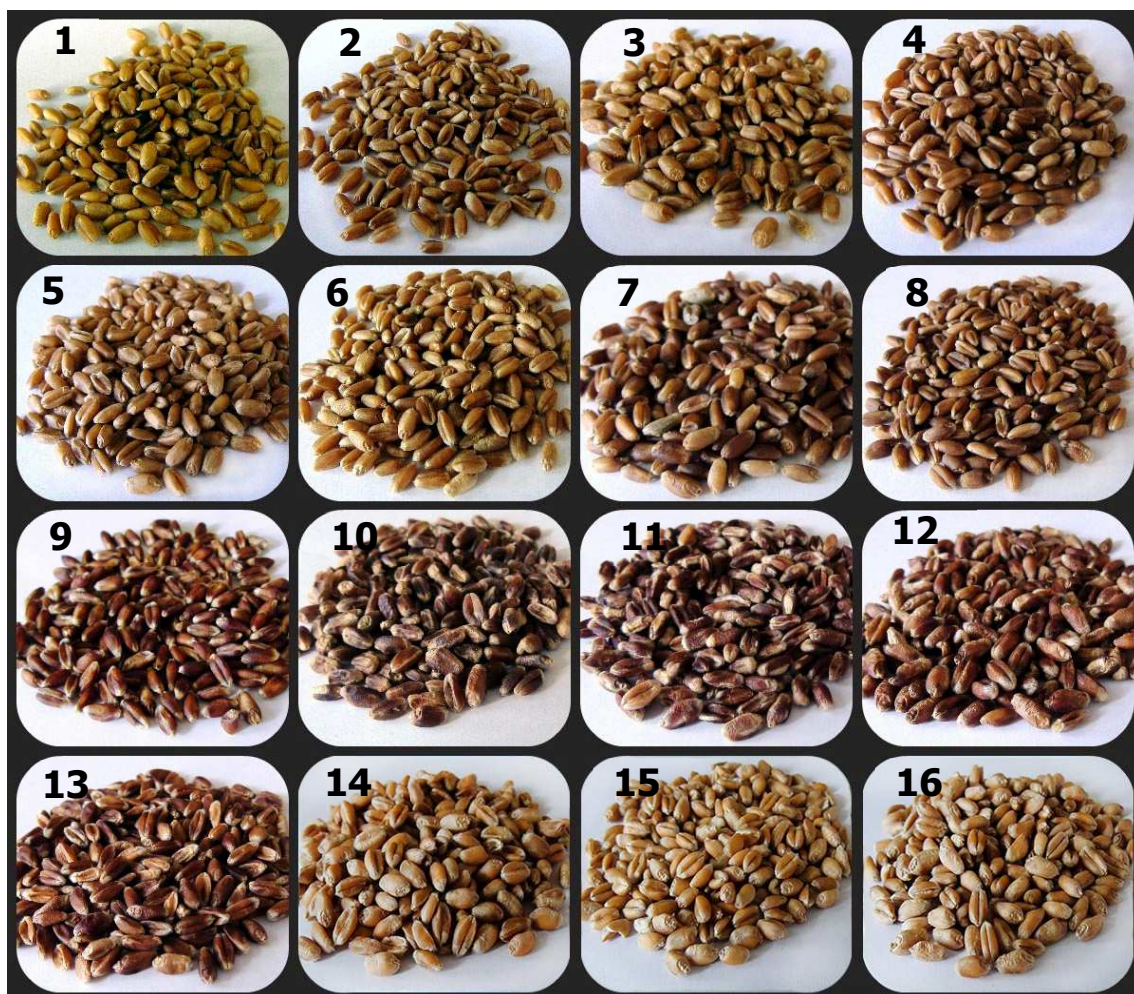
základnímu stádiu 1 a stupni 11 ve škále Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH), (obrázek 12).



Obrázek 12: Základní růstové stádium 1, stupeň 11 dle stupnice BBCH

Genotyp s bílou obilkou Novosibirskaya 67 (N67), který sloužil jako kontrola, a genotypy s purpurovým perikarpem ANK-28B (ANK) a Abyssinskaya Arraseita (AA) byly využity v dalších pokusech: mikroskopická studie, stanovení obsahu hlavních antokyanů a genová exprese. Genotypy pocházely ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. (správce genetických zdrojů toho času: Ing. Petr Martinek, CSc.). Soubor byl dále rozšířen o možného donora genů pro purpurové zbarvení, planě se v přírodě vyskytující druh, *Thinopyrum ponticum* Podp.; Z.-W. Liu & R.-C. Wang. Tento materiál pocházel z Genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně. Evidence genetických zdrojů rostlin v ČR (EVIGEZ) vede tento materiál pod označením ECN 01C3200011. V případě *Thinopyrum ponticum* není jednotná taxonomická klasifikace v literárních zdrojích. Lze se setkat s označením *Agropyron elongatum* (Host) P. B., *Lophopyrum ponticum* (Podp.) Á. Löve $2n = 10 \times = 70$ anebo *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub. (Qualset et al. 2005, obrázek 13).

Materiál byl vyset 23. 3. 2011 v Botanické zahradě a arboretu Mendelovy univerzity v Brně, kde také byly prováděny následné odběry. A to od stanoveného dne 0, kterým byl zvolen den anthesy, doba, kdy 50 % klásků v lichoklase má viditelné prašníky. Termínově se jednalo o období mezi 13. a 16. červnem 2011. Stejným způsobem byl vyset materiál v roce 2013, který byl použit pro ověření poznatků anatomických studií. Jednalo se o genotyp ANK, termín kvetení 24. 6. daného roku. Anthese odpovídá základnímu stádiu 6 a stupni 65 ve škále BBCH (obrázek 14).



17

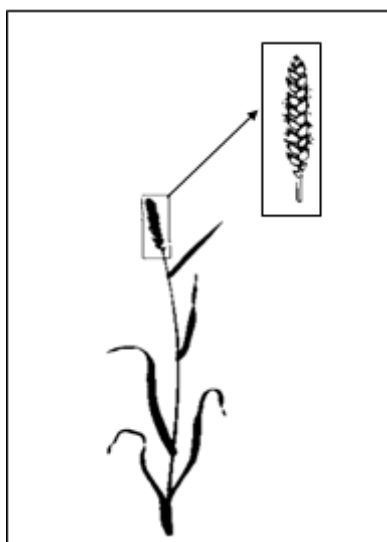


Obrázek 13: Grafické zobrazení použitých materiálů pro experimenty

Tabulka 5: Názvy použitých materiálů pro experimenty

1	Novosibirskaya 67	2	Abyssinskaya Arraseita
3	ANK-1A	4	Konini
5	ANK-1B	6	Purple
7	ANK-1C	8	Purple feed
9	ANK-1D	10	Indigo
11	ANK-1E	12	Citrus
13	ANK-28A	14	Luteus
15	ANK-28B	16	Bona Dea
17	<i>Thinopyrum ponticum</i>		

Anthese nastala v těchto dnech: 15. června u genotypu ANK, dále 16. června AA a N67. Vyvíjející se obilky byly odebírány ve dnech 10; 15; 20; 25; 30; 35 a 40 *post anthesis* (dpa) obdobných způsobem, který popisují Knieval et al. (2009). Při každém odběru bylo z centrální části lichoklasu odejmuto alespoň 100 mg obilek pro následné analýzy. Vzorky k rozborům, které následovaly po odběru veškerého materiálu z pokusných parcel, byly uloženy do hlubokomrazicího boxu při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Každý odběr byl fotograficky zdokumentován pro sledování vývoje zbarvení obilek a lichoklasu pšenice. Takto byl připraven materiál pro anatomicko-morfologické zkoumání ukládání pigmentů, pro pokusy stanovení obsahů základních dvou antokyanů v průběhu zrání obilky a analýzy genové exprese biosyntetické dráhy.



Obrázek 14: Základní růstové stádium 6, stupeň 65 dle stupnice BBCH

4.2 Genetická příbuznost

Genetická příbuznost zkoumaných genotypů pšenice seté s bíle (v počtu 1), červeně (5), žlutě (3) a purpurově (7) zbarvenou obilkou (tabulka 4) byla zkoumána společně s planým druhem trávy *Thinopyrum ponticum* pomocí 27 mikrosatelitních markerů SSR (Simple Sequence Repeat). *Thinopyrum ponticum* bylo zařazeno do souboru s cílem ověřit jako možného nositele genetické informace purpurové barvy obilky. Markery byly vybrány na základě znalosti jejich lokalizace na chromozomech, kde se zároveň vyskytují geny zodpovědné za červené (Roder et al. 1998) a purpurové zbarvení obilek (Somers & Isaac 2004). Krokem získání DNA byla její izolace kitem DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen. Tento kit slouží k izolaci celkové genomové DNA (jaderné, mitochondriální

i chloroplastové). Využití komerčního kitu bylo zvoleno po vyzkoušení i dalších metod (chloroformová extrakce), při kterých ale bylo dosahováno nižších výtěžností DNA. Další výhodou zvolené extrakce DNA je vynechání použití fenolu a chloroformu. Postup pro izolaci je detailně uveden v příručce DNeasy Plant Handbook. Matricí pro izolaci byly listy rostlin pšenice. Úspěšnost izolace DNA byla ověřena využitím horizontální agarózové elektroforézy. 1,5% agarózový gel byl obohacen ethidium bromidem pro vizualizaci DNA. Protokoly PCR a elektroforetických metod laboratoře vlastního ústavu byly uplatněny při analýzách (Vyhnánek et al. 2009). Přítomnost nebo absence fragmentů byla vyjádřena maticí s kódováním 0 a 1. Počítačová aplikace FreeTree verze 9.1 (Hampl et al. 2001), konstrukční metoda UPGMA (Unweight pair Group Method with Arithmetic Mean) a koeficient podobnosti dle Jaccarda (Jaccard 1908) byly základními nástroji pro statistické zpracování. Následně počítačovou aplikací TreeView verze 1.6 (Page 1996) byla graficky znázorněna genetická příbuznost experimentálního materiálu a vytvořeny dendrogramy. Index diverzity (DI) určující míru rozdílnosti mezi genotypy v daném SSR (Weir 1990), pravděpodobnost identity (PI) hodnotící míru identity genotypů v daném SSR (Paetkau 1995) a polymorfní informační index (PIC) podle vzorce Nei (1973) a se zahrnutím rozmanitosti alel v daném lokusu také i jejich frekvenci (Weber 1990, obrázek 15).

Z frekvencí 1 až n alel detekovaných pro každý SSR byl určen:

index diverzity (DI) (Weir, 1990):

$$DI = 1 - \sum p_i^2$$

pravděpodobnost identity (PI) (Paetkau et al., 1995):

$$PI = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

polymorfický informační obsah (PIC) (Weber, 1990):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 \cdot p_j^2$$

kde p_i a p_j jsou frekvence i -té a j -é alely v daném celku.

Obrázek 15: Vzorce pro výpočet: index diverzity (DI), pravděpodobnost identity (PI) a polymorfní informační index (PIC)

4.3 Anatomická studie

Celé obilky získané v průběhu vývoje a ukládání antokyanů ve vegetační sezóně 2011 byly pozorovány stereomikroskopem Olympus SZH 10, dokumentovány kamerou Olympus E-450 a výsledky zpracovány aplikací QuickPHOTO Micro 2.3 (PROMICRA, Česká republika). K další dokumentaci pozorování, která následovala v roce 2013, bylo využito zapůjčené zařízení světelný digitální 3D mikroskop VHX-2000 (Keyence, Japonsko).

Při pozorování depozice anthokyanů v jednotlivých vrstvách obilky v průběhu vývoje byly připraveny příčné řezy obilkami s purpurovým perikarpem genotypu ANK. Řezy o tloušťce 40 μm byly připravovány pomocí kryotomu CRYO-CUT (American optical corporation, USA) při teplotě -18°C . Řezy byly pozorovány ve světelném mikroskopu Olympus Provis a zaznamenány kamerou Olympus SP-350. Počítačová aplikace QuickPHOTO Micro 2.3 (PROMICRA, Česká republika) sloužila k popisu a setřídění snímků, stejně jako při pozorování celých obilek.

4.4 Identifikace a kvantifikace antokyanů – kyanidin-3-glukosid a delphinidin-3-glukosid v průběhu vývoje obiliek

Genotypy ANK, AA a N67 byly použity pro analýzu obsahu antokyanů ve zrajících obilkách pšenice, které byly pěstovány v maloparcelkových pokusech vegetační sezóny 2011 v Botanické zahradě a arboretu Mendelovy univerzity v Brně. Kyanidin-3-glukosid a delphinidin-3-glukosid byly zvoleny jako majoritní antokyaniny na základě prací Abdel-Aal et al. (1999, 2006). Izolace antokyanů probíhala podle postupu, který popsali Chabinová et al. (2011a, b): Homogenizace probíhala v tekutém dusíku pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax® Tube Drive (Ika, Německo). Extrakce trvala 2 × 29 min. Jako rozpouštědlo byl použit methanol a 1,0M HCl (85:15 v/v) při celkovém objemu solventu 10 ml. Navážka vzorků činila 20 mg ve třech opakováních. Dalším krokem bylo přefiltrování homogenátu a odpaření rozpouštědla ze získaného filtrátu v proudě přehřátého (50 °C) dusíku za pomoci bezkontaktního systému. Odpařené vzorky byly do chromatografické analýzy skladovány ve tmě při teplotě 4 °C. Přístroj Agilent 1200 Series Rapid Resolution (Agilent Technologies, Německo) sloužil k izolaci a identifikaci anthokyanů. Kolona Zorbax SB-C18 (30 × 2,0 mm; 1,8 μm velikost částic; Agilent Technologies, Německo) byla použita pro separaci s rychlostí průtoku 0,7 ml. min⁻¹ při teplotě 40 °C. Gradientová eluce byla v čase 0 min 98 % vodné fáze, 0,5 min 95 % vodné fáze, 0,8 min 50 % vodné fáze, 1,8 min 98 % vodné fáze. Složení mobilní fáze bylo A: acetonitril, B: vodná fáze (0,3% kyselina mravenčí). Objem nástřiku byl 1–5 μl (ředění 1:100), 1 a 2 μl (ředění 1:10) pro standardní roztok. Jako standard byly použity standardní roztoky anthokyanů (Extrasynthese, Francie). Nástřik reálného vzorku byl v rozsahu 0,5–5 μl. Detekce separovaných látek probíhala pomocí UV-VIS detektoru s fotodiodovým polem a MS detektoru MSD 1100 Single-quad LC/MS (Agilent Technologies, Německo). Pro identifikaci a kvantifikaci látek je MS detektor vybaven elektrosprejovou ionizací. Specifické fragmenty jsou následně analyzovány pomocí kvadrupólového analyzátoru, přístroj pracoval v negativním modu. Parametry hmotnostního spektrometru byly: teplota plynu 350 °C, průtok plynu 13 l.min⁻¹, tlak nebulizéru 50 psi, napětí na kapiláře 4000 V. Signál byl snímán v SIM modu při m/z → 463 pro delphinidin-3-glukosid a m/z → 447 pro kyanidin-3-glukosid. Výsledky byly přepočteny na sušinu a statisticky zpracovány pomocí počítačové aplikace MS Excel. Přímou bylo využito směrodatné odchylky a grafického znázornění.

4.5 Sledování genové exprese metodou qPCR

Genotypy s purpurovým perikarpem AA a ANK byly použity pro analýzy a jako kontrola byl zvolen genotyp N 67 s bíle zbarvenou obilkou. Celková RNA byla izolována: (i) z celých obilek; (ii) odděleně z osemení spolu s oplodím (osemení a oplodí společně srůstají, pro zjednodušení používáme termín obalové vrstvy) a (iii) z endospermu a aleuronové vrstvy využitím fenol-chloroformové metody RNA Blue (Top Bio, Česká republika). Pro udržení nízké teploty po celou dobu homogenizace byly třecí misky předem ponechány 24 hodin v mrazícím boxu při -18 C.

Koncentrace a čistota izolované RNA byla měřena pomocí spektrofotometru Picopet (Picodrop, UK). Vzorky RNA byly čištěny sadou Turbo DNA free (Ambion, USA). Dvoustupňová reverzní transkripce RNA do cDNA byla provedena za použití Enhanced Avian HS RT PCR kit (Sigma Aldrich, USA). Úspěšnost transkripce do cDNA byla potvrzována pomocí PCR s provozním genem (GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza (Wang et al. 2003).

Z databáze Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI), byly vybrány a porovnány sekvence TaCHS_I 434 bp (AB187025.1), TaCHS_II 1279 bp (AY286095.1) a HvCHS 1509 bp (EU921436.1) pomocí aplikace Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Vybrané sekvence byly použity pro návrh primerů softwarem Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000).

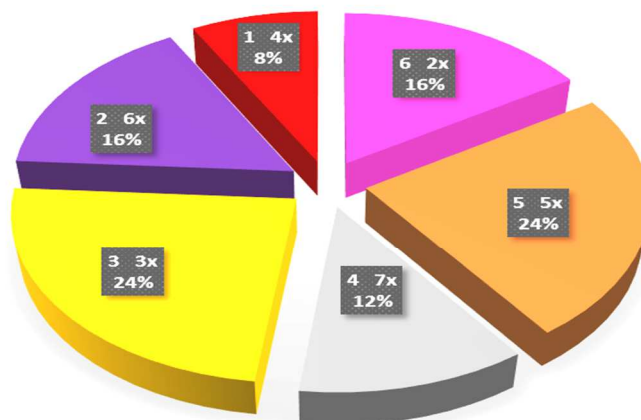
cDNA sloužila jako templát pro gradientovou PCR, otestování optimální teploty nasedání primerů, klonování, sekvenační analýzy a optimalizace metody qPCR. Reakční podmínky byly následující: 95°C/30s; 57°C/30s; 72°C/60s (35 cyklů). Finální extenze při 72 °C trvala po dobu 10 minut. PCR produkty byly klonovány za použití pGEM®-T Vector System (Promega, USA). Rekombinantní plasmidy pGEM-T (po ligaci s purifikovanými PCR produkty) byly převedeny do kompetentních buněk bakterie *E. coli* prostřednictvím elektroporace. Petriho misky s pevným LB (lysogeny broth) médiem, selektivní antibiotikum karbenicilin (100 mg/l) a komponenty pro modrá/bílá selekce (X-gal – 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid a IPTG isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid) byly použity pro výběr buněk *E. coli*. Po modro-bílé selekci, klony s rekombinantními plasmidy byly převedeny do 1,5 ml tekutého LB média a kultivovány přes noc při 37 °C. Plazmidová DNA byla izolována

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) a sekvenční analýzy (čtyři kolonie každého genotypu ve třech opakováních) byly provedeny společností Macrogen (Jižní Korea). Podobnost získaných sekvencí byla hodnocena pomocí aplikace BLAST a ClustalW2 verze 2. Sekvence podobná HvCHS byla použita pro studium genové exprese biosyntetické dráhy anthokyanů. Protokol qPCR byl optimalizován pro přístroj CFX96 Real Time Systems (Bio – Rad, USA) s LightCyclerR 480 SYBR Green I Master kit (Roche, Francie). Konečná reakční směs pro qPCR obsahovala 10 μ l SYBR Green Mix; 0,4 μ l přímé a zpětné primery (25 pmol/l); 4,2 μ l SYBR Green H₂O a 5 μ l cDNA templátu. Podmínky qPCR byly následující: 95°C/10s; 57°C/20s; 72°C/10s po 40 cyklů. Genová exprese byla vypočtena relativní kvantifikací $\Delta\Delta C_t$ (DDCt) (Livak & Schmittgen, 2001), která byla založena na srovnání rozdílů mezi hodnotami C_t sledovaného a provozního genu *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza. Aplikace MS Excel byla použita pro výpočty standardní odchylky a grafické znázornění závěrečných grafů.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 SSR markery při zjištění genetické příbuznosti experimentálního materiálu

Použitím 27 SSR markerů lokalizovaných na chromozomech 2A, 3A, 3B, 3D, 6A, 6B, 7A a 7B byl prokázán výskyt 90 alel na souboru 16 genotypů pšenice a planého druhu *Thinopyrum ponticum*. Počet alel na jeden lokus se pohyboval v rozmezí 1 až 6. Na jednom lokusu se průměrně vyskytovalo 3,3 alely a souhrnně bylo podrobena analýzám 16 genotypů pšenice s různým zbarvením obilky a *Thinopyrum ponticum* (tabulka 4). Obdobné počty alel mezi 1 až 5 (v průměru 2,86) zjistili Casassola et al (2012) ve vybraném souboru 30 genotypů pšenice s použitím 24 SSR markerů. Stejně tak vyšší hodnoty v rozmezí 2 až 10 publikovali Španić et al. (2012). Podobné výsledky uvádí Liu et al. (2007), kde v souboru o rozsahu 30 genotypů a použití 24 mikrosatelitů získali celkově 114 alel v rozmezí 2 až 9 na lokus. Průměrně se vyskytovalo 4,6 alely na lokus. Největší zastoupení počtu alel, což je v naší práci 6, jsme zaznamenali u markerů *Xgwm122* a *Xbarc077*, což je nižší hodnota než uvádí Liu et al. (2007), srovnatelná s Börner et al. (2000) a Salema et al. (2008). Velikost celkově hodnoceného souboru, genetický původ a zvolené mikrosatelity jsou faktory, které hrají hlavní roli při ovlivnění výsledků analýz. S čímž mohou souviset vyšší hodnoty průměrného počtu 4,8 alely na lokus, které získali Börner et al. (2000) při použití nižšího počtu sledovaných genotypů (8) a nižšího počtu mikrosatelitů (9). Vyjádření zastoupení počtu alel ve vztahu k jednomu mikrosatelitu v sledovaném souboru zobrazuje obrázek 16. V práci největší rozpětí variability bylo zachyceno u mikrosatelitu *Xbarc176* (od 160 bp do 200 bp). Toto rozpětí je nižší ve srovnání s prací Islam et al. (2012).



Obrázek 16: Graf zobrazující procentickou četnost alel v souboru 27 použitých SSR markerů

Dále přítomnost nulových alel může být jedním z důležitých vlivů, které se mohou uplatnit při zpracování dat mikrosatelitů. Výskyt byl nalezen v širokém rozpětí taxonů (Dakin & Avise 2004). Nulová alela je libovolná alela na lokusu mikrosatelitu, která se neamplifikuje (nebo velmi slabě) během PCR. Možnou příčinou vzniku nulové alely je mutace DNA tam, kde je oblast homologní primeru, též nazývaná tzv. flanking region. Zde je zamezeno proběhnutí PCR (Chapuis & Estoup 2007). Rozdílná účinnost amplifikace mezi krátkou a dlouhou alelou je dalším možným způsobem vzniku nulové alely, která se může amplifikovat méně účinně než krátká. Zde se nakonec podaří detekovat pouze menší z alel heterozygotního jedince (Wattier et al. 1998). Zdrojem nulových alel může být také selhání PCR v důsledku proměnlivosti kvality templátu nebo jeho nízkého množství (Gagneux et al. 1997). V současnosti se pro odhad výskytu nulové alely používají různé počítačové programy. Toto vše jsou pouze nepřímé přístupy k detekci nulové alely. Přímý důkaz o její přítomnosti se získá nasekvenováním PCR produktu studovaného lokusu (Dakin & Avise 2004). Aby reakce proběhla i na nulové alele, musí se upravit sekvence nenasedajícího primeru tak, že se posune o několik nukleotidů vedle mutace. Vyhnánek et al. (2009) uvádějí přítomnost nulových alel při analýze tritikale 6 SSR markerů a z toho 2 SSR na chromozomech pšenice (*Xwmc216* – 1A a 1B; *Xwmc961* – 1R, resp. 7A a 7B).

V prováděných experimentech byly nulové alely detekovány v případě dvou mikrosatelitů *Xbarc077*, *Xgwm340* na chromozomu 3B. Také výskyt nulových alel

u mikrosatelitů *Xgwm538* a *Xgwm6* popisují Singh et al. (2012). Výskyt nulových alel byl detekován i u planého druhu *Thinopyrum ponticum*, možným vysvětlením je nízká podobnost s genomem pšenice, jak zobrazuje celkový dendrogram (obrázek 17).

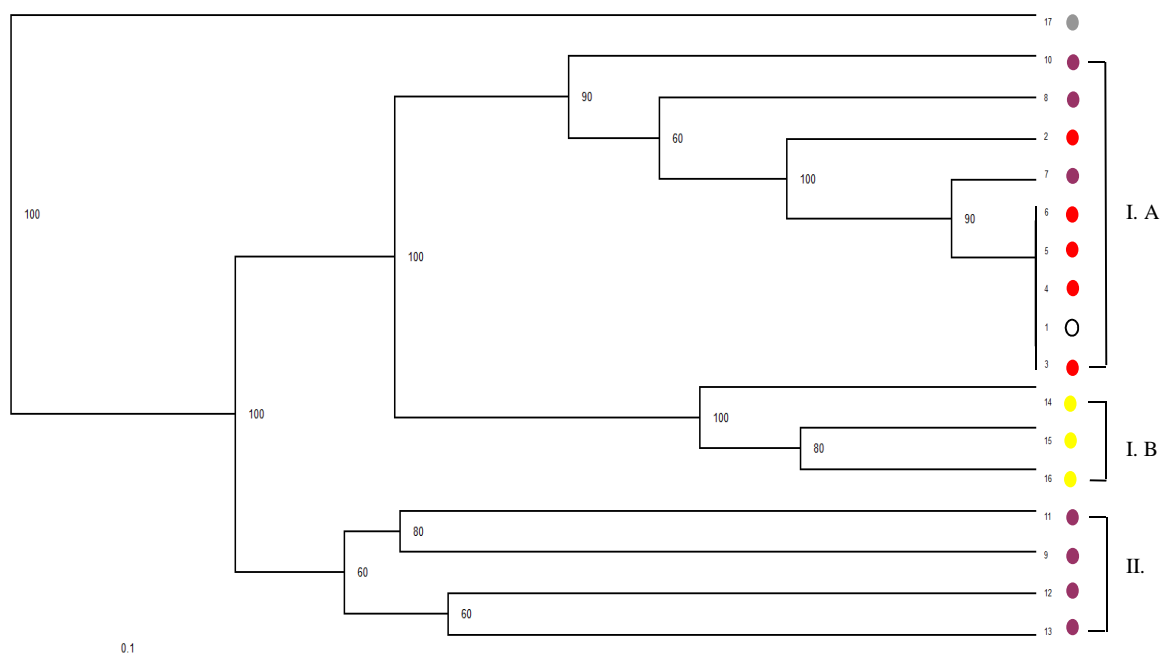
Průměrná hodnota indexu diverzity (DI) byla 0,38 a pohybovala se v rozpětí 0,00 až 0,69. Průměrná hodnota pravděpodobnosti identity (PI) byla v analyzovaném souboru 0,45 (0,06–1,00). V souboru 24 genotypů při použití 44 SSR markerů uvádějí Musilová et al. (2013) průměrné hodnoty DI 0,40 a PI 0,43, což jsou velmi podobné výsledky. Pro ukazatel polymorfni informační obsah (PIC) byla vypočítána průměrná hodnota 0,36 s celkovým rozmezím hodnot od 0,00 do 0,69 (tabulka 6). Průměrná hodnota PIC je velmi podobná hodnotám, které uvádějí ve svých experimentech práce Casassola et al. (2012), kde se pohybovalo rozpětí od 0,06 do 0,73, a průměr byl 0,49. Vyšší hodnoty rozmezí PIC uvádí mezi 0,07 a 0,90 Španiác et al. (2012).

Tabulka 6: Použité SSR markery pšenice a jejich statistické parametry

<i>SSR marker</i>	<i>Lokalizace</i>	<i>Počet alel</i>	<i>DI</i>	<i>PI</i>	<i>PIC</i>
Xgwm122*	2A	6	0,55	0,20	0,54
Xgwm294	2A	4	0,63	0,15	0,60
Xgwm445	2A	4	0,52	0,27	0,47
Xgwm328 ^U	2A	1	0,00	1,00	0,00 ^U
Xgwm356 ^U	2A	1	0,00	1,00	0,00
Xgwm666b	2A	2	0,11	0,80	0,10
Xgwm636*	2A	5	0,69	0,06	0,68 *
Xwmc428	3A	5	0,54	0,23	0,51
Xcfa2134	3A	2	0,11	0,80	0,10
Xgwm674	3A	3	0,38	0,42	0,34
Xgwm155	3A	5	0,60	0,16	0,58
Xgwm480	3A	4	0,39	0,35	0,39
Xbarc077*	3B	6	0,67	0,10	0,66 *
Xgwm181	3B	4	0,59	0,10	0,58
Xgwm340	3B	4	0,59	0,10	0,58
Xgwm4a	3B	3	0,51	0,20	0,50
Xgwm314	3D	2	0,11	0,80	0,10
Xgwm664	3D	2	0,11	0,80	0,10
Xgwm456	3D	2	0,21	0,65	0,19
Xbarc195	6A	4	0,59	0,24	0,52
Xbarc003	6A	5	0,64	0,07	0,64 *

SSR marker	Lokalizace	Počet alel	DI	PI	PIC
Xgwm427	6A	2	0,11	0,80	0,10
Xgwm570 ^U	6A,6B	1	0.00	1.00	0.00 ^U
Xgwm60 ^U	7A	1	0.00	1.00	0.00 ^U
Xgwm861	7A,7B	4	0,66	0,11	0,64 *
Xbarc176	7B	5	0,48	0,28	0,46
Xgwm276	7B	3	0,38	0,42	0,34
Průměr		3,3	0,38	0,45	0,36

DI (index diverzity /diversity index/), PI (pravděpodobnost identity /probability of identity/) a PIC (polymorfní informační obsah /information content/), * SSR marker s nejvyšší hodnotou polymorfismu, ^U uniformní SSR marker



Obrázek 17: Dendrogram vyjadřující variabilitu a rozdělení 16 genotypů pšenice a planého druhu *Th. ponticum* použitých v práci, I. A, I. B a II. subklastery

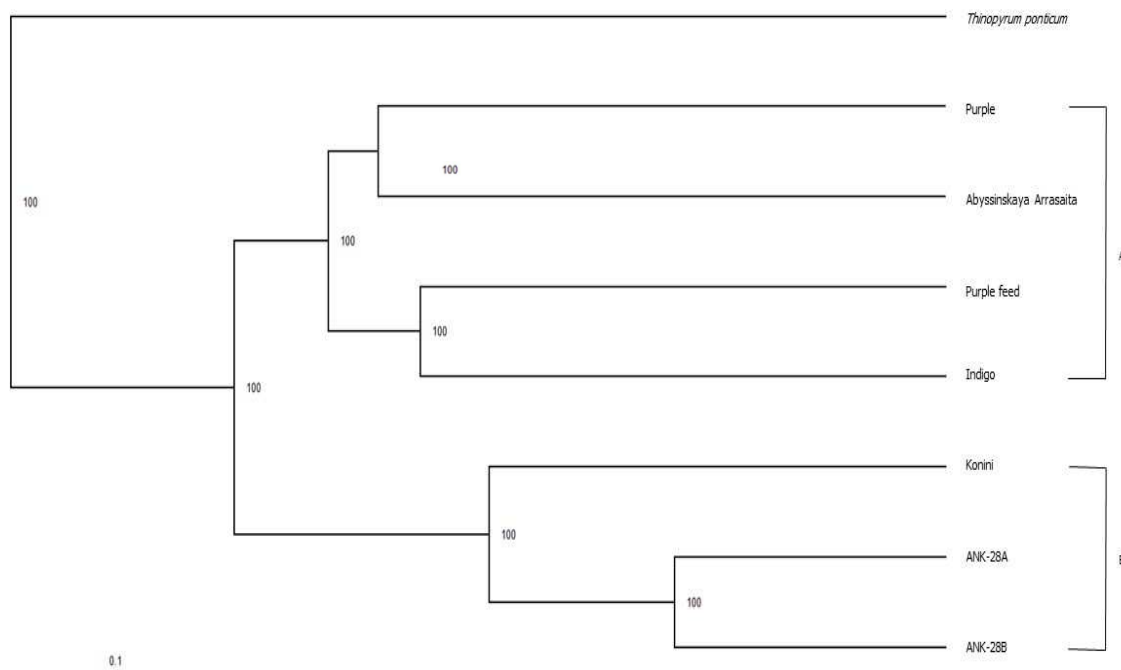
1 – Novosibirskaya 67	5 – ANK-1D	9 – A. Arraseita	13 – Indigo
2 – ANK-1A	6 – ANK-1E	10 – Konini	14 – Citrus
3 – ANK-1B	7 – ANK-28A	11 – Purple	15 – Luteus
4 – ANK-1C	8 – ANK-28B	12 – Purple feed	16 – Bona Dea
			17 – <i>Th. ponticum</i>

Obrázek 17 zobrazuje dendrogram pšenice s červeným, bílým, žlutým a purpurovým zbarvením obilky na základě 27 mikrosatelitů. Z dendrogramu se jasně se vyčleňuje planý druh *Thinopyrum ponticum*. Byla potvrzena hypotéza, že tento planý druh není donorem genů pro purpurové zbarvení obilek pšenice, resp. můžeme ho považovat za donora genů pro modře zbarvený aleuron, jak dokládají v publikaci Musilová et al. (2013).

Genotypy pšenice vytvářejí dva klastery, kde menší klaster (II.) obsahuje 4 genotypy s purpurovým zbarvením A. Arraseita, Indigo, Purple a Purple feed. Druhý klaster se dále dělí na dva subklastery.

Ve větším ze dvou subklasterů (I. A) jsou zařazeny zbývající genotypy červeného zbarvení ANK-1A, ANK-1B, ANK-1C, ANK-1D, ANK-1E a purpurového zbarvení ANK-28A a ANK 28B. Byl zde potvrzen izogenní charakter genotypů s označením ANK, jak uvádí databáze Catalogue of Gene Symbols for Wheat u izogenních linií odvozených od genotypu Novosibirskaja 67 (Mcintosh et al. 2008).

Do menšího subklasteru (I. B) náleží uznané odrůdy se žlutým zbarvením obilky, Citrus, Luteus a Bona Dea. Odrůdy Citrus a Luteus mají společné předky v rodokmenu. Obě odrůdy pochází od prof. dr. Wilhelma Jahn-Deesbacha z Německa a mají následující rodokmen: Citrus / (Sunnan × Monopol) × Stamm GI 912/ a Luteus / (Sunnan × Monopol) × Giessener Stamm/, dle (Musilová et al. 2013).



Obrázek 18: Příbuznost genotypů s purpurovým perikarpem a planého druhu *Thinopyrum ponticum* vyjádřená dendrogramem analýz SSR mikrosatelitů, A a B – subklastery.

Na základě SSR markerů lokalizovaných na chromozomech 2A, 2B a 7B, kde se vyskytují *Pp* geny zodpovědné za purpurový perikarp, byl sestaven dendrogram pro pšenice s purpurovým perikarpem a *Thinopyrum ponticum* (obrázek 18). Geny *Pp1* se vyskytují na chromozomu 7B, *Pp2* na 7A (Arbuzova & Maystrenko 2000), *Pp3a* a *Pp3b* na centromerické oblasti chromozomu 2A, byl také popsán jejich komplementární účinek (Dobrovolskaya et al. 2006).

Pšenice s purpurovým perikarpem vytvořily 2 klastery. Větší klaster A obsahuje genotypy Purple a Purple feed, které pocházejí z USA, dále jsou zde zastoupeny genotypy Abyssinskaya Arrasaita z České republiky a Indigo z Velké Británie. Purple Feed obsahuje podle nové nomenklatury geny *Pp1* a *Pp3b* a genotyp Purple *Pp1* a *Pp3a* (Dobrovolskaya et al. 2006).

V klasteru B se nacházely izogenní linie odrůdy Novosibirskaya 67 (ANK-28A a ANK-28B) společně s novozélandskou odrůdou Konini. Izogenní linie ANK-28A a ANK-28B se liší od N67 pouze v genech pro purpurový perikarp. ANK-28A obsahuje genovou sestavu *Pp1* a *Pp2*, ANK-28B má zastoupeny geny *Pp1* a *Pp3*. Novosibirskaya 67 obsahuje *Pp1* a *pp3* (Dobrovolskaya et al. 2006).

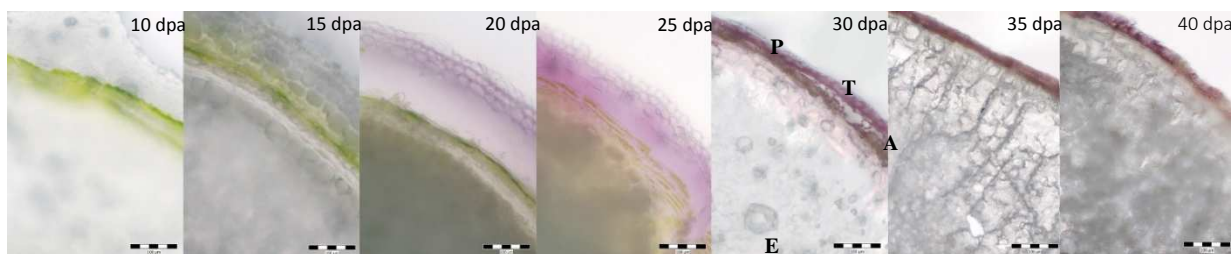
5.2 Anatomická studie, makro- a mikroskopické analýzy

Ukládání barviv v obilce bylo sledováno jednak makroskopicky (v roce 2011), (obrázek 19) a pomocí 3D mikroskopu (v roce 2013) (obrázky 21–30) na povrchu vyvíjejících se obilek a následně mikroskopicky na příčných řezech obilkami (obrázek 20). Tato pozorování byla prováděna ve stejných časových intervalech ve shodě s ostatními experimenty (10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 dpa). Údaj, ve kterém roce bylo pozorování prováděno, je důležitý, protože i na zbarvení obilky mají vliv klimatické faktory (Knievel et al. 2009).

Při makroskopickém pozorování bylo první ukládání pigmentů zaznamenáno ve formě malých okrsků na apexu a po stranách na dorzální straně obilky 20 dpa (obrázek 19). Počátek ukládání barviv ve stejné části obilky zaznamenali i Knievel et al. (2009). Tyto oblasti se následně zvětšovaly a spojovaly, až se postupně zbarvila celá obilka. Toto postupné vybarvování může vysvětlit pozorování v pokusech s *T. boeoticum*, kdy Joppa & Mann (1982) mylně dospěli k závěru, že se jedná o xenii, která se ovšem v perikarpu nemůže projevit.



Obrázek 19: Celé obilky v průběhu zrání genotypu ANK s purpurovým perikarpem, dpa (dny *post anthesis*)



Obrázek 20: Příčné řezy obilkou v průběhu zrání genotypu ANK s purpurovým perikarpem, dpa (dny *post anthesis*)
P – perikarp, T – testa, A – aleuronová vrstva, E – endosperm

Průběh nebyl u všech obilek zcela synchronní přesto, že obilky byly izolovány ze střední části lichoklasu, kde jsou ve stejné vývojové fázi. I 25 dpa byly zjištěny vedle téměř zbarvených obilek obilky téměř bez patrného zbarvení (obrázky 25, 26), až se postupně zbarvila celá obilka. V době, kdy obilka začala vysychat, byla vždy celá zbarvená (obrázky 27, 28). K ukládání pigmentů na ventrální straně obilky (strana s rýhou) nedocházelo dříve než na opačné straně, na straně bez rýhy. Ukládání pigmentů není zřejmě bezprostředně spojeno s procesy spojenými s vývojem celé obilky. Např. už Batygina (1987) uvádí, že raná stadia vývoje endospermu probíhají v obilkách pšenice nejintenzivněji na ventrální straně obilky a i v pozdějších stadiích jsou zde buňky metabolicky aktivnější.

K obdobným výsledkům dospěla další pozorování pomocí 3D mikroskopu, i když byla prováděna v jiné vegetační sezoně. I zde docházelo 20 dpa k prvnímu pozorovatelnému ukládání pigmentů ve formě malých okrsků na apexu a po stranách na dorzální straně obilky. (obrázky 23, 24). Nová detailnější pozorovací technika ukázala, že po 25 dpa se antokyanany nejintenzivněji tvoří v oblasti zárodku resp. na okrajích štítku (obrázky 25, 26). Po dalších 5 dnech už byly obilky zbarveny po celém povrchu (obrázky 27, 28). S dozráváním bylo zbarvení stále intenzivnější. Tento jev, který popsali i Knieval et al. (2009), logicky souvisí se ztrátou vody a z toho vyplývající koncentrací barviv (obrázky 29, 30). Roli hraje i ztenčení celé obalové vrstvy, jak je uvedeno níže.

Následně bylo prováděno pozorování tvorby antokyanů na příčných řezech obilkami, které byly pořízeny na zmrazovacím mikrotomu. Jiné techniky by způsobily vyplavení barviv. I tak bylo pořízení řezů obilkami (o tloušťce 40 μm) v raných stadiích zralosti obtížné. Po pořízení těchto řezů muselo být pozorování prováděno bezprostředně a dokumentace pořizována velmi rychle, protože barviva difundovala do vody, která byla uzavíracím médiem preparátu.

Na příčných řezech obilkami se v testě a k ní přiléhající oblasti perikarpu začalo objevovat zelené zbarvení chlorofylu, v době 10–15 dpa (obrázek 20). S postupnou tvorbou antokyanů v pletivech perikarpu v době 25–30 dpa zelené barvivo vymizelo. Pozorování ukázala, že k tomu dochází směrem od vnitřní části k okraji obilky (obrázky 19, 23–26). Přítomnost antokyanových barviv omezovala přístup světla, takže přítomnost chlorofylů ztrácela význam přesto, že obilky nedosahovaly ještě zralosti. Tuto domněnku podporuje pozorování modře zbarvených obilek, kde se antokyanany ukládají v aleuronové

vrstvě, tedy pod testou a perikarpem. Zde dochází k vymizení chlorofylů později (Trojan et al. 2014). Přístup světla k nim není nějak omezen, a tak mohou plnit svoji funkci až do dozrání obilky. V žádném případě nebylo pozorováno, že by se antokyany objevovaly nejdříve v testě a pak teprve v pletivech perikarpu, jak uvádějí Li et al. (2005).

V průběhu vývoje obilky se měnila i tloušťka obalových vrstev především perikarpu. Maximální tloušťka perikarpu byla zaznamenána 25 dpa. S následujícím vývojem obilky se perikarp stával tenčím, což bylo zapříčiněno ztrátou vody a modifikacemi jeho částí.



Obrázek 21: Vzhled obilky 15dpa, dpa (dny *post anthesis*)
obilky jsou zcela zelené



Obrázek 22: Vzhled obilky 15dpa – detail, dpa (dny *post anthesis*)
obilky jsou zcela zelené



Obrázek 23: Vzhled obilky 20 dpa, dpa (dny *post anthesis*), ukládání barviv v oblasti apexu



Obrázek 24: Vzhled obilky 20 dpa – detail, dpa (dny *post anthesis*), ukládání barviv v oblasti apexu a na bocích



Obrázek 25: Vzhled obilky 25 dpa, dpa (dny *post anthesis*), rozšiřování zbarvení na boky a dorzální stranu obilky (bez rýhy)



Obrázek 26: Vzhled obilky 25 dpa – detail, dpa (dny *post anthesis*), rozšiřování zbarvení na boky a dorzální stranu obilky (bez rýhy)



Obrázek 27: Vzhled obilky 30 dpa, dpa (dny *post anthesis*), úplné zbarvení obilky



Obrázek 28: Vzhled obilky 30 dpa – detail, dpa (dny *post anthesis*), úplné zbarvení obilky



Obrázek 29: Vzhled obilky 40 dpa, plná zralost, dpa (dny *post anthesis*), vysychání obilky



Obrázek 30: Vzhled obilky 40 dpa, plná zralost – detail, dpa (dny *post anthesis*), vysychání obilky

5.3 Analýza antokyanů

U pšeníc s netradičně zbarvenými obilkami se vyskytují nejčastěji obilky purpurového zbarvení (např. genotypy *Abyssinskaya Arraseita* (AA), ANK-28A (ANK)), u kterých se ukládají antokyanany do perikarpu, a obilky modrého zbarvení (např. genotypy UC66049 (UC), *Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen* (TBS)), u kterých se ukládají antokyanany do aleuronové vrstvy.

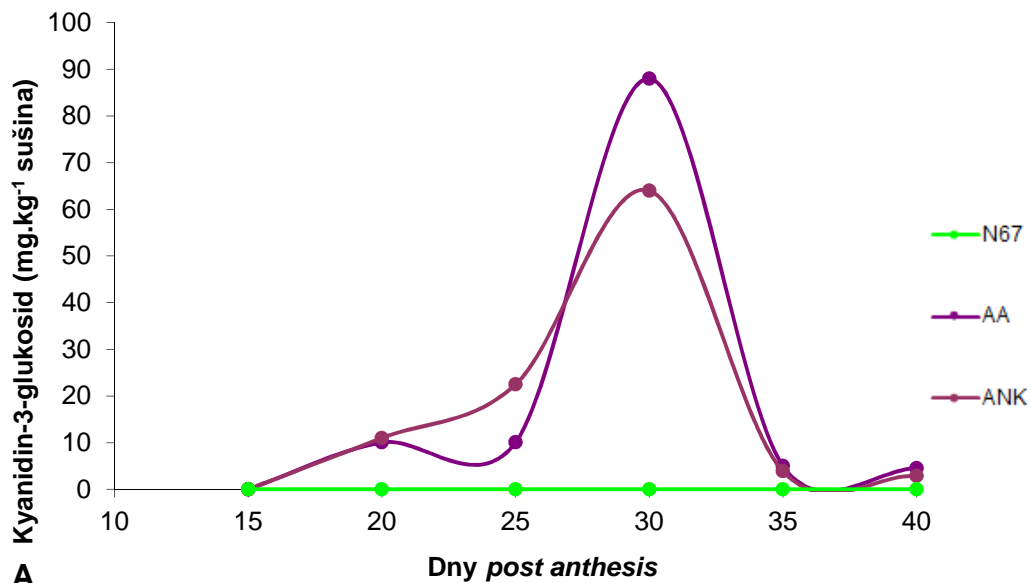
Purpurově zbarvené obilky obsahují několik látek typu antokyanů – převládá kyanidin-3-glukosid. Dále se vyskytuje v menším množství peonidin-3-glukosid, acetylovaný kyanidin-3-glukosid a acetylovaný peonidin-3-glukosid. Ve stopových množstvích byly zaznamenány kyanidin-3-rutinosid a peonidin-3-rutinosid. (Hosseinian et al. 2007). U modře zbarvených obilek převládá delfinidin-3-glukosid (Abdel-Aal et al. 2006).

V průběhu vývoje obilky byla provedena identifikace a kvantifikace dvou hlavních antokyanů kyanidin-3-glukosid a delfinidin-3-glukosid, které jsou nejvýznamnějšími látkami ovlivňujícími zbarvení obilek (Abdel-Aal & Hucl 2003, obrázek 31).

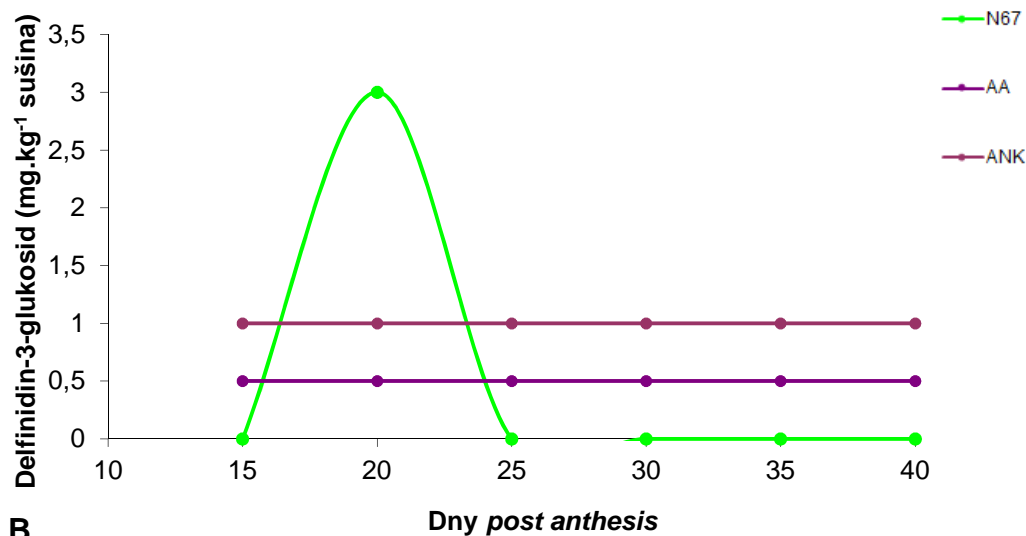
Analýzy byly prováděny až od druhého odběrového termínu, tj. 15 dpa, protože, jak uvádí Knievel et al. (2009), na počátku vývoje obilek je obsah barviv velmi nízký. To bylo potvrzeno v předpokusu. Protože obsah antokyanů je závislý na pozici obilky v lichoklasu (Bustos et al. 2012), byly při odběrech pečlivě vybírány obilky ze střední části lichoklasu, aby mohlo být prováděno vzájemné srovnávání. Nejvyšší obsah kyanidin-3-glukosidu byl zaznamenán 30 dpa u genotypu AA (88mg/kg sušiny). Obdobně byla maxima zjištěna i u genotypů ANK (65 mg/kg sušiny), tedy při srovnání s hodnotami zjištěnými u genotypu AA byl obsah kyanidin-3-glukosidu nižší. Maximálního obsahu bylo však dosaženo u sledovaných genotypů za stejnou dobu *post anthesis*. Prudký pokles obsahu kyanidin-3-glukosidu nastal 35 dpa, a to na hodnotu 5 mg/kg sušiny u ANK i AA. U sledovaných genotypů byl stanoven i obsah delfinidin-3-glukosidu. Pro ANK i AA bylo jeho stanovené množství zanedbatelné AA 0,5 a ANK 1 mg/kg sušiny. Potvrdily se tak výsledky, které publikovali Knievel et al. (2009), že obsah delfinidin-3-glukosidu je u obilek s purpurovým perikarpem velmi nízký. Tento antokyan je majoritně zastoupen u skupiny pšeníc s modrou barvou obilky, kde je obsažen v aleuronové vrstvě (Abdel-Aal et al. 2006).

To potvrdily výsledky získané u genotypu UC, kde delphinidin-3-glukosid dosahoval v maximu až 140 mg/kg sušiny (Trojan et al. 2014). U kontrolního genotypu N 67, s bílou barvou obilky, ani jeden z obou sledovaných antokyanů nebyl zachycen ve vyšších koncentracích. Je však zajímavé, že zatímco v purpurových obilkách byl obsah delphinidin-3-glukosidu stejně nízký po celou dobu sledování. U kontrolního genotypu N67 byl 15 dpa 3–6 násobně vyšší než u obou sledovaných genotypů s purpurovými obilkami. Později ovšem jeho obsah klesl pod detekovatelnou koncentraci.

Pokles sledovaných antokyanů byl zřetelně pozorován v pozdních fázích vývoje obilek. Stejně poznatky popsali pro celkový obsah antokyanů u purpurového genotypu pšenice ANK (Žofajová et al. 2012) a u genotypu PIG03008 (Knievel et al. 2009). Knievel et al. (2009) zaznamenali, že snížení jednotlivých antokyanů může být výsledkem vysychání endospermu, které je rychlejší než ukládání antokyanů do aleuronové vrstvy a perikarpu. Tento jev může být i jinak vysvětlován jako efekt kopigmentace (Boulton 2001). Během kopigmentace se antokyaniny formují v molekulární komplexy anebo shluky, kde dochází ke změně nebo zvýšení intenzity barvy. Dojde-li k tomuto efektu, užité metody ke zjišťování obsahu antokyanů jsou neúčinné, a proto se na konci vývoje obilek jejich obsah zdánlivě snižuje. Intenzita zbarvení obilky se však nemění, spíše naopak. Mazza & Miniati (1993) předpokládají, že tento jev kopigmentace stabilizuje barvu rostlin.



A



B

Obrázek 31: Změny obsahu hlavních antokyanů v průběhu zrání u genotypů N67, AA a ANK, A – kyanidin-3-glukosid, B – delphinidin-3-glukosid

5.4 Genomická analýza

V průběhu analýz byly získány pomocí navržených primerů produkty, které byly následně sekvenovány. Výsledná délka sekvence pro *CHS* DNA fragment obsahovala 196 bp (obrázek 32). Získané sekvence byly zapsány do databáze NCBI a byla jim byla přiřazena

systemová označení GenBank accession number. Po získání informací ze sekvenování genotypu N67 ukázal obsah pouze jediné sekvence. Obsah pouze jediné sekvence u genotypu s modrým zbarvením aleuronové vrstvy UC a sekvenci v počtu pouze 131 bp u genotypu TBS získali Trojan et al. (2014).

U genotypů AA a ANK byl u tří kandidátních sekvencí zachycen jednonukleotidový polymorfismus. Právě identifikace a lokalizace jednonukleotidových polymorfismů je nezbytnou součástí správného výběru sekvence. Vznik jednonukleotidových polymorfismů ovlivňuje řada biologických faktorů. Patří sem složitost genové rodiny, způsob reprodukce (autogamie nebo alogamie) a úroveň znalostí o diploidních druzích, ze kterých alopolyploid vznikl. Dále mají vliv pokroky v metodách sekvenování DNA a její analýzy (Kaur et al. 2012).

Podobnosti u analyzovaných sekvencí se pohybovaly v rozmezí 92,5–100 % (tabulka 7). Podobnost k referenční sekvenci (HvCHS – EU921436.1) vybrané z databáze NCBI byla mezi 94,5–96 %. Variabilita u těchto sekvencí byla ovlivněna právě jednonukleotidovými polymorfismy.

Nejvyšší výskyt jednonukleotidových polymorfismů byl detekován mezi sekvencemi u genotypu AA (podobnost 94,7%). U genotypu N67 byly získané identické sekvence. Při porovnání genotypů s purpurovým perikarpem (AA a ANK) byla frekvence jednonukleotidových polymorfismů 7,3 %. (podobnost 92,7 %). Zjištěné hodnoty jsou velmi podobné jako u skupiny genotypů s modrým aleuronem (Trojan et al. 2014).

Tabulka 7: Matice podobnosti sekvence pro chalkonsyntázu (%)

	HVCHS	N67	AA	ANK
N67	96	100	92,5	94
AA	94,5	92,5	94,7	92,7
ANK	95,7	94	92,7	97,2

Klon	GenBank accession number	Sekvence 5'-3'
CHS	AK354067	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
N67_1	KF681271	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
AA_1	KF681272	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
AA_2	KF681273	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
AA_3	KF681274	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
ANK_1	KF681275	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
ANK_2	KF681276	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
ANK_3	KF681277	TGAGGTTGGACTCACCTTCCACCTCCTCAAGGATGTGCCCTGGGCTCATCTCCAAGAACAT 60
CHS	AK354067	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
N67_1	KF681271	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
AA_1	KF681272	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
AA_2	KF681273	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
AA_3	KF681274	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
ANK_1	KF681275	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
ANK_2	KF681276	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
ANK_3	KF681277	CGAGCGCGCCCTAGAGGACGCCCTTCAAGCCATTGGGCATCGATGACTGGAACCTCCGTCTT 120
CHS	AK354067	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
N67_1	KF681271	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
AA_1	KF681272	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
AA_2	KF681273	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
AA_3	KF681274	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
ANK_1	KF681275	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
ANK_2	KF681276	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
ANK_3	KF681277	TTGGATAGCGCACCCCGGGCCAGCAATCCTTGACATGGTGGAGGCCAAGGTAAACCT 180
CHS	AK354067	GAACAAGGAACGGATG 196
N67_1	KF681271	GAACAAGGAACGGATG 196
AA_1	KF681272	GAACAAGGAACGGATG 196
AA_2	KF681273	GAACAAGGAACGGATG 196
AA_3	KF681274	GAACAAGGAACGGATG 196
ANK_1	KF681275	GAACAAGGAACGGATG 196
ANK_2	KF681276	GAACAAGGAACGGATG 196
ANK_3	KF681277	GAACAAGGAACGGATG 196

Obrázek 32: Kandidátní sekvence chalkosyntázy analyzovaných genotypů

žlutá – genotyp s bílým perikarpem, Novosibirskaya 67 (N67)

purpurová – genotypy s purpurovým perikarpem, ANK-28B (ANK) a A. Arraseita (AA)

červená – referenční sekvence EU921436.1 chalkosyntáza (CHS) *Hordeum vulgare*

Jsou prezentovány pouze unikátní sekvence pro každý genotyp

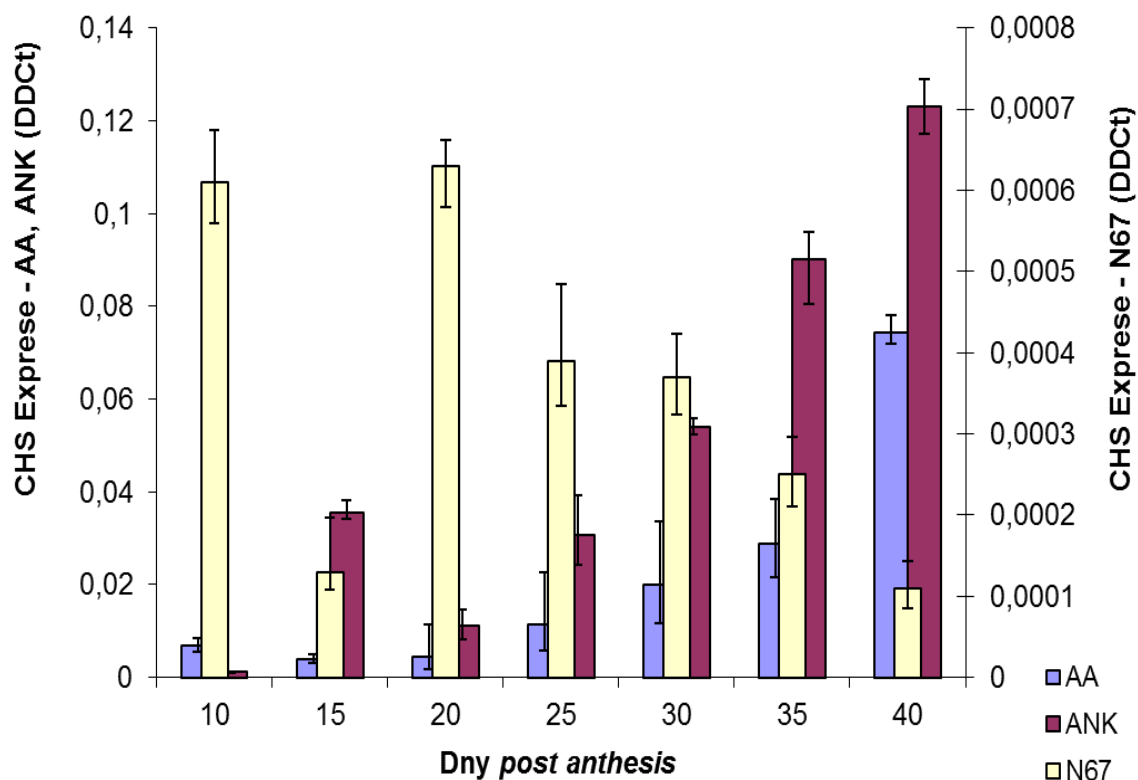
5.5 Sledování exprese genu

U celých obilek analýzy relativní genové exprese *CHS* ukázaly nižší hodnoty u genotypu s bílým perikarpem N67 ($1,1 \times 10^{-4}$ – $6,3 \times 10^{-4}$). Stejně byly naměřeny výsledky u genotypů s purpurovým perikarpem (obrázek 33). V případě celých obilek u genotypů s purpurovým perikarpem byla u genotypu ANK relativní exprese ($1,2 \times 10^{-3}$ – $1,2 \times 10^{-1}$), což je vyšší než u genotypu AA ($3,9 \times 10^{-3}$ – $7,4 \times 10^{-2}$). Histogram ukazuje viditelné

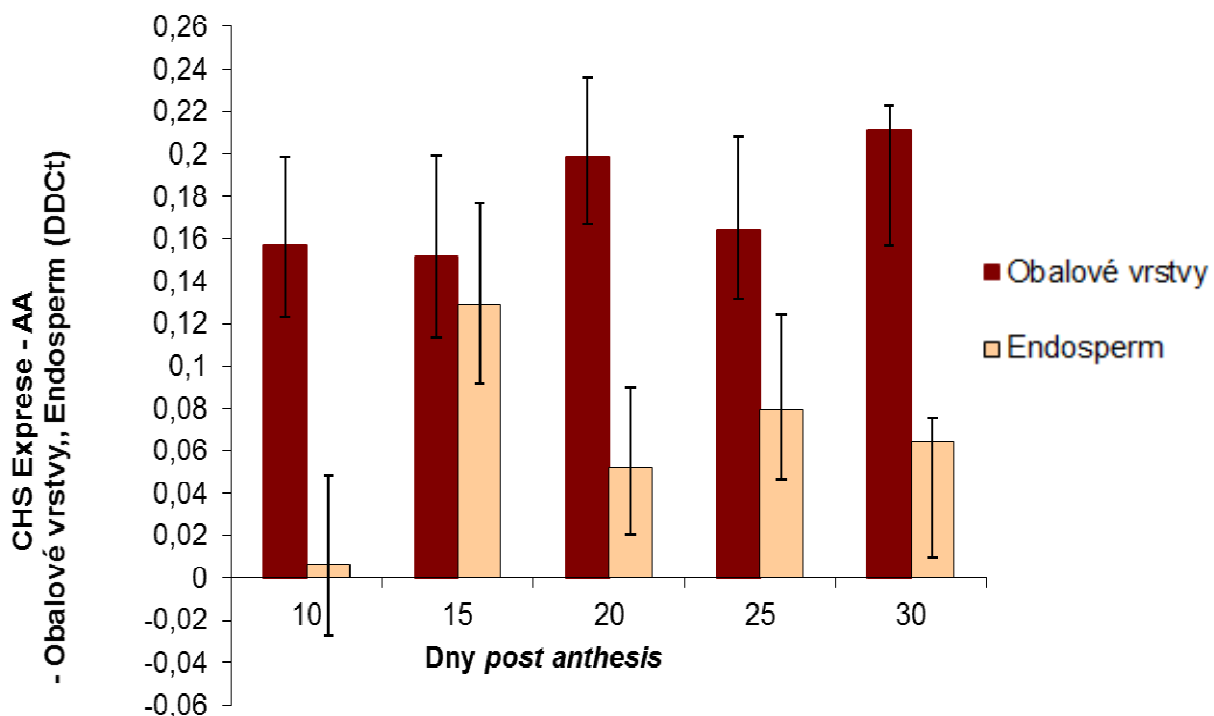
rozdíly v trendech úrovně relativní exprese. V průběhu vývoje v případě celých obilek ukazuje exprese *CHS* u genotypu N-67 spíše klesající trend. V porovnání s genotypy s purpurovou barvou obilky byly trendy opačné, rostoucí. Nejvyšších hodnot dosáhla relativní exprese 40 dpa.

U rozdělení vzorků na obalové vrstvy a endosperm byly hodnoty relativní exprese rozdílné jak u genotypu s purpurovým perikarpem ANK, tak i AA (obrázky 34, 35). Míra exprese byla samostatně hodnocena v endospermu a obalových vrstvách v rozmezí 10–30 dpa. Rozdělení na jednotlivé části v pozdějších stádiích vývoje už nebylo možné, protože se ztrátou vody byly vrstvy neoddělitelně spojené. Byly pozorovány opačné trendy mezi porovnáním hodnot obalových vrstev a endospermu. U genotypu AA vzorků endospermu byla nejvyšší míra exprese 15 dpa ($1,30 \times 10^{-1}$), potom následoval pokles do 30 dpa na hodnotu ($6,43 \times 10^{-2}$). Tyto hodnoty se lišily od obalových vrstev, kde byl pozorován jen velmi pomalý růst relativní exprese *CHS*. Stejně trendy byly pozorovány u genotypu ANK, kde exprese v endospermu byla ještě nižší.

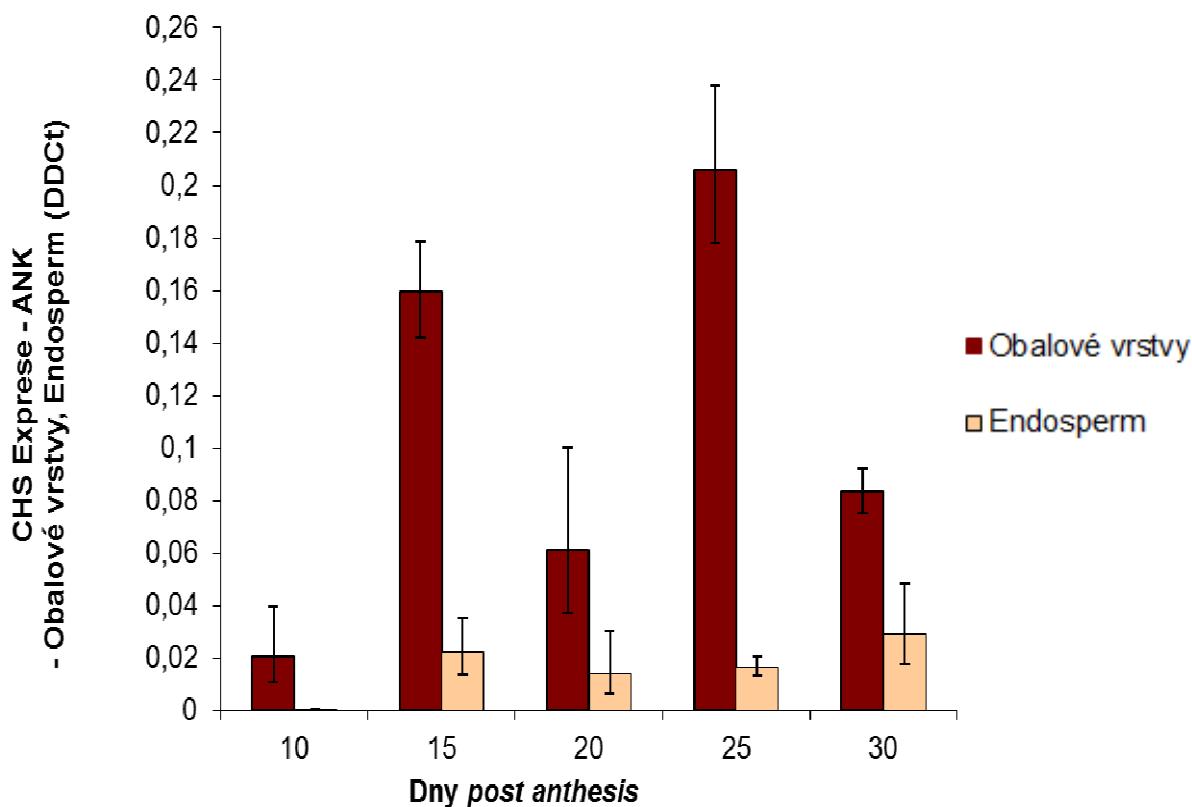
Trojan et al. (2014) prováděli analýzy exprese genu *CHS* u genotypů s modrým aleuronem UC a TBS. V případě výsledků pro celou obilku byla nejvyšší hodnota 25 dpa, což je o 15 dnů dříve než u popisovaného pozorování. V rámci skupiny genotypů s modrou aleuronovou vrstvou, míra exprese u genotypu UC (1.3×10^{-2} – 2.3×10^{-1}) byla vyšší než u genotypu TBS (3.3×10^{-4} – 1.3×10^{-2}). Pokles exprese genotypu UC byl jak u obalových vrstev, tak u endospermu pozorován 10 dpa. U genotypu TBS to bylo 15 dpa. Při porovnání TBS a UC vykazuje v některých vybraných částech dvojnásobných hodnot míry exprese.



Obrázek 33: Míra exprese chalkonsyntázy v celé obilce u genotypů AA, ANK, N67



Obrázek 34: Míra exprese chalkonsyntázy v obalových vrstvách a endospermu u genotypu AA



Obrázek 35: Míra exprese chalkonsyntázy v obalových vrstvách a endospermu u genotypu ANK

5.6 Výsledky a diskuze – souhrn

Při celkovém pohledu na expresi *CHS* a ukládání sledovaných antokyanů je třeba podtrhnout tyto skutečnosti. U genotypu N67, v průběhu vývoje obilky, byla exprese *CHS* ve srovnání s genotypy s purpurovým perikarpem velmi nízká. Toto zjištění odpovídá výsledkům, které publikovali Tereshchenko et al. (2013). Získali významně nižší exprese u Saratovskaya 29 ve srovnání s blízce izogenními liniemi s purpurovým perikarpem. Saratovskaya 29 tak jako N67 jsou genotypy s bílým perikarpem. Himi & Noda (2005) publikovali stejná zjištění u genotypu N67 pro geny zodpovědné za chalkonisomerázu, flavonon-3-hydroxylázu a dihydroflavonol-4-reduktázu.

Úroveň relativní exprese v případě N67 odpovídá minimu, resp. nedetekovatelné hodnotě obsahu antokyanů kyanidin-3-glukosidu a delphinidin-3-glukosidu, stanovených v průběhu zrání obilky.

Genotypy s purpurovým perikarpem byly charakteristické stoupajícími trendy relativní exprese *CHS* v celém průběhu dozrávání. Rozdílem u celých obilek s modrou aleuronovou vrstvou bylo dosažení maxima 25 dpa, potom začalo docházet k plynulému poklesu (Trojan et al. 2014).

Srovnání výsledků analýz exprese genu *CHS* a obsahu kyanidin-3-glukosidu u celých obilek s purpurovým perikarpem ukazuje, že maximum exprese nastává 40 dpa ve srovnání s maximem obsahu kyanidin-3-glukosidu, kterého je dosaženo 30 dpa (obrázek 33), tedy maximum exprese nastává 10 dnů později. Obdobně popisují Trojan et al. (2014) u genotypu UC s modrým aleuronem maximum obsahu kyanidin-3-glukosidu 25 dpa a maximum exprese genu *CHS* o 10 dnů později, tj. 35 dpa.

Získané výsledky jsou v souladu s výsledky, které publikovali Abdel-Aal & Hucl (2003), Abdel-Aal et al. (2006) a Hosseinian et al. (2008). V pozdních fázích vývoje obilky byl pozorován pokles obsahu sledovaných antokyanů. Stejně poznatky byly popsány u stanovení celkového obsahu antokyanů u genotypů s purpurovým perikarpem ANK (Žofajová et al. 2012) a PIG03008 (Knievel et al. 2009). Knievel et al. (2009) uvedli, že snížení antokyanů může být výsledkem akumulace sušiny v endospermu, kde je mnohem rychlejší než ukládání antokyanů v aleuronové vrstvě nebo perikarpu. Tento fenomén může být také vysvětlen efektem kopigmentace, jak uvádí Boulton (2001). Je to jev, při kterém se antokyaniny formují v molekulární komplexy anebo shluky, vytvářející změnu anebo zvýšení barevné intenzity. Mazza and Miniati (1993) předpokládají, že tento mechanismus stabilizuje barviva v rostlinách. Vyšší hladina exprese u obalových vrstev pšenice s purpurovým perikarpem odpovídá tvorbě a následnému ukládání antokyanů v perikarpu.

Výsledky exprese *CHS* v jednotlivých strukturách obilky dokládá zjištění, že *CHS* je klíčovým enzymem v biosyntetické dráze antokyanů, jak popisují Moore et al. (2002). Je zřejmé, že transkripce genu, kódující klíčový enzym biosyntetické dráhy antokyanů, je ovládána endogenními procesy. V prováděných pokusech se jednalo především o pozici pletiv. Vliv však má i okolní prostředí.

Vyvstává ještě otázka, jak vysvětlit zjištěnou vysokou expresi *CHS* v pozdních fázích vývoje obilky (35–40 dpa). Možné důvody snižování obsahu sledovaných antokyanů jsou uvedeny v předcházejícím odstavci. Obdobně by bylo možno vysvětlit i zvýšenou expresi *CHS* tak, že vzniklý kyanidin-3-glukosid i delphinidin-3-glukosid jsou v této fázi okamžitě

převáděny na komplexnější sloučeniny. Je však známo, že obalové vrstvy postupně odumírají a jsou v době zralosti zcela tvořeny odumřelými buňkami (což je ostatně základní charakteristika suchých plodů). Young & Gallie (1999) studovali programovanou buněčnou smrt ve vývoji endospermu v obilkách pšenice. Jejich výsledky naznačují, že tento proces probíhá i v obalových vrstvách – perikarpu i testě. Tento proces je poměrně rychlý. Dlouho je známo, že suchá semena obsahují funkční mRNA (Marcus & Feeley 1964, Dure & Waters 1965). Tato mRNA je vytvářena v průběhu vývoje semene, zachovává si svou funkci v průběhu skladování a začíná se uplatňovat opět v raných fázích bobtnání (Comai et al. 1989; Kimura & Nambara 2010). Je tedy možné, jak naznačují získané výsledky, že v průběhu odumírání buněk se hromadí mRNA, konkrétním případě pro CHS, nejen v částech obilky, které se přímo uplatňují při klíčení, ale i buňkách odumřelých pletiv, která se na klíčení nepodílejí. Zde vyvstává i občas diskutovaná otázka, že není zcela správné uvažovat při použití běžně zavedených metod o expresi genů, ale o momentálním obsahu RNA ve sledovaných vzorcích.

6. ZÁVĚR

V experimentech genetické příbuznosti byly studovány genotypy jarní formy pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) s různě zbarvenou obilkou a planě se v přírodě vyskytující druh *Thinopyrum ponticum* pomocí 27 mikrosatelitních markerů SSR (Simple Sequence Repeat). Z výsledných dendrogramů se jasně se vyčlenil planý druh *Thinopyrum ponticum*. Byla potvrzena hypotéza, že tento planý druh není donorem genů pro purpurové zbarvení. Byl ovšem potvrzen izogenní charakter genotypů s označením ANK, kam také spadají genotypy s purpurovým zbarvením obilky ANK-28A a ANK-28B. Izogenní linie ANK-28A a ANK-28B se liší od N67 pouze v genech pro purpurový perikarp. N67 byla v práci použita jako kontrola, obilky pšenice bez purpurových pigmentů. Toto zjištění dokazuje u izogenní linie ANK-28A obsah genové sestavy *Pp1 a Pp2*. ANK-28B má zastoupeny geny *Pp1 a Pp3*. N67 obsahuje *Pp1 a pp3*. Výsledky studia příbuznosti genotypů pšenice seté, které byly k dispozici, umožnily vybrat pro další experimenty vzdálené genotypy s purpurovou obilkou.

Anatomická studie sledovala ukládání barviv v obilce makroskopicky a pomocí 3D mikroskopu na povrchu vyvíjejících se obilek a následně mikroskopicky na příčných řezech obilkami. Tato pozorování byla prováděna ve stejných časových intervalech ve shodě s dalšími experimenty (10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 dpa). Makroskopicky bylo první ukládání pigmentů zaznamenáno ve formě malých okrsků na apexu a po stranách na dorzální straně obilky 20 dpa. Tyto oblasti se následně zvětšovaly a spojovaly, až se postupně zbarvila celá obilka. Průběh nebyl u všech obilek zcela synchronní přesto, že obilky byly izolovány ze střední části klasu, kde jsou ve stejné vývojové fázi. I 25 dpa byly zjištěny vedle téměř zbarvených obilek obilky téměř bez patrného zbarvení. V době, kdy obilka začala vysychat, byla už celá zbarvená. K ukládání pigmentů na ventrální straně obilky nedocházelo dříve než na opačné straně, na straně bez rýhy. Na příčných řezech obilkami se v testě a k ní přiléhající oblasti perikarpu začalo objevovat zelené zbarvení chlorofylu, v době 10–15 dpa. Maximální tloušťka perikarpu byla zaznamenána 25 dpa. S následujícím vývojem obilky se perikarp stával tenčím, což bylo zapříčiněno ztrátou vody a modifikacemi jeho částí.

Purpurově zbarvené obilky obsahují několik látek typu antokyanů. V průběhu vývoje obilky byla provedena identifikace a kvantifikace dvou hlavních antokyanů kyanidin-3-glukosid a delfinidin-3-glukosid. Obsah antokyanů je závislý na pozici obilky

v lichoklasu, a proto byly při odběrech pečlivě vybírány obilky ze střední části klasu. Nejvyšší obsah kyanidin-3-glukosidu byl zaznamenán 30 dpa u genotypu AA (88mg/kg sušiny). Obdobně byla maxima zjištěna i u genotypů ANK (65 mg/kg sušiny), tedy při srovnání s hodnotami zjištěnými u genotypu AA byl obsah kyanidin-3-glukosidu nižší. Maximálního obsahu bylo však dosaženo u sledovaných genotypů za stejnou dobu *post anthesis*. Prudký pokles obsahu kyanidin-3-glukosidu nastal 35 dpa, a to na hodnotu 5 mg/kg sušiny u ANK i AA. U sledovaných genotypů byl stanoven i obsah delphinidin-3-glukosidu. Pro ANK i AA bylo jeho stanovené množství zanedbatelné AA 0,5 a ANK 1 mg/kg sušiny. U kontrolního genotypu N 67, s bílou barvou obilky, ani jeden z obou sledovaných antokyanů nebyl zachycen ve vyšších koncentracích. Je však zajímavé, že zatímco v purpurových obilkách byl obsah delphinidin-3-glukosidu stejně nízký po celou dobu sledování. U kontrolního genotypu N67 byl 15 dpa 3–6 násobně vyšší než u obou sledovaných genotypů s purpurovými obilkami. Pokles sledovaných antokyanů byl zřetelně pozorován v pozdních fázích vývoje obilek. Tento jev může být vysvětlen jako efekt kopigmentace. Během kopigmentace se antokyaniny formují v molekulární komplexy anebo shluky, kde dochází ke změně nebo zvýšení intenzity barvy. V tomto případě užití metody ke zjišťování obsahu antokyanů jsou neúčinné, a proto se na konci vývoje obilek jejich obsah zdánlivě snižuje.

Hlavním enzymem uplatňujícím se v biosyntetické dráze antokyanů je chalkonsyntáza (CHS). U genotypů AA a ANK byl u tří kandidátních sekvencí chalkonsyntázy (*CHS*) zachycen jednonukleotidový polymorfismus. Podobnosti u analyzovaných sekvencí se pohybovaly v rozmezí 92,5–100 %. Nejvyšší výskyt jednonukleotidových polymorfismů byl detekován mezi sekvencemi u genotypu AA (podobnost 94,7%). U genotypu N 67 byly získané identické sekvence. Při porovnání genotypů s purpurovým perikarpem (AA a ANK) byla frekvence jednonukleotidových polymorfismů 7,3 %, (podobnost 92,7 %).

Byla sledována relativní genová exprese v celých obilkách a při separaci obalových vrstev a endospermu. U celých obilek analýzy ukázaly nižší hodnoty u genotypu s bílým perikarpem N67 ($1,1 \times 10^{-4}$ – $6,3 \times 10^{-4}$). Stejně byly naměřeny výsledky u genotypů s purpurovým perikarpem. V případě celých obilek u genotypů s purpurovým perikarpem byla u genotypu ANK relativní exprese vyšší ($1,2 \times 10^{-3}$ až $1,2 \times 10^{-1}$) než u genotypu AA ($3,9 \times 10^{-3}$ – $7,4 \times 10^{-2}$). U vzorků rozdělených na obalové vrstvy a endosperm byly

hodnoty relativní exprese rozdílné jak u genotypu ANK, tak i AA. V tomto případě byla míra relativní exprese samostatně hodnocena jen v rozmezí 10–30 dpa. V pozdějších stádiích vývoje obilky nebylo už rozdělení na jednotlivé části možné, protože se ztrátou vody byly vrstvy neoddělitelně spojené. Byly pozorovány opačné trendy mezi porovnáním hodnot obalových vrstev a endospermu. U genotypu AA byla u vzorků endospermu nejvyšší míra relativní exprese 15 dpa ($1,30 \times 10^{-1}$), potom následoval pokles do 30 dpa ($6,43 \times 10^{-2}$). Tyto hodnoty se lišily od obalových vrstev, kde byl pozorován jen velmi pomalý růst relativní exprese *CHS*. Stejně trendy byly pozorovány u genotypu ANK, kde exprese v endospermu byla ještě nižší.

Expresí genu *CHS* vede k postupné tvorbě pigmentů a následně k zabarvování obilky. Tato exprese je podmíněná nejen časově, ale i lokalizačně. Postupné pochopení těchto procesů by mohlo umožnit expresi antokyanů v dalších částech obilky. Nejvhodnější by tento proces byl v celém endospermu a nejen pouze v obalových vrstvách, jak je tomu dnes. Kdy se stále pro většinu potravinářských výrobků používá pouze endosperm a mouky, resp. šroty využívané především pro celozrnné výrobky tvoří stále minoritní zastoupení.

Tyto pigmenty mají vysokou hodnotu především díky svým antioxidačním vlastnostem, a tak mohou pozitivně ovlivňovat zdraví člověka, ale i zvířat při využití v krmivářství. Pšenice setá představuje 20 % příjmu energie pro světovou populaci lidstva. Minimální produkce antokyanů v endospermu, ze kterého se vyrábí většina mouky, by tak vytvořila z pšenice seté nejen významný zdroj energie, ale i významnou surovinu pro výrobu funkčních potravin. Tzn. potravin, vyrobených z přirozeně se vyskytujících složek tak, aby měly kromě prosté nutriční hodnoty i pozitivní účinek na zdraví konzumenta.

7. SUMMARY

Spring form genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with nonstandard pigmented caryopsis and wildy growing species *Thinopyrum ponticum* were studied with a tool of 27 SSR (Simple Sequence Repeat) in genetic relationship experiments. The wild species of *Thinopyrum ponticum* was clearly allocated from the final dendrogram. The hypothesis that this wild species is not donor of purple pigmentation genes, was confirmed. The isogenic character of ANK genotypes with purple pigmented caryopsis as ANK-28A and ANK 28B was also confirmed. Isogenic lines ANK-28A and ANK 28B differentiate from N67 only genes responsible for purple pericarp. N67 was used as control material, wheat caryopsis without pigments. This fact confirms ANK-28A with genes *Pp1* and *Pp2*, ANK-28B has presented genes *Pp1* and *Pp3*. Novosibirskaya 67 contains *Pp1* and *Pp3* genes.

Anatomical study observed pigment deposition in caryopsis via macroscopic observation and 3D microscope on the developing caryopses surface and microscopic observation was used for caryopsis crosscuts. Observation time schedule was set up in compliance with other experiments (10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 dpa). Pigment deposition was visually observed on the surface of intact caryopses during their development on the apex and on the sites. The purple coloring was visible 20 dpa. Pigment distribution was not homogeneous on the surface of the caryopsis. At the beginning, small spots of color were visible. These spots enlarged and gradually fused into homogeneous pigmentation of the whole caryopsis between 20–30 dpa. Once the caryopsis started drying, it was already fully pigmented. The pigment deposition started first on the ventral site with line. Green chlorophyll pigments 10–15 dpa could be observed on the crosscuts in testa and closed pericarp areas. Maximal pericarp thickness was detected 25 dpa. With continuing development pericarp started to get thinner which was caused by desiccation and pericarp modifications. Purple pigmented caryopses contain a few anthocyanin compounds. During caryopses development two major anthocyanins cyanide-3-glycoside and delphinidine-3-glycoside were identified and quantified. Anthocyanin content corresponds with caryopsis spike position. Caryopses were properly selected from middle part of the spikes. The highest cyanidin-3-glucoside content 30 dpa was detected in AA genotype (88mg/kg DW). Maximum were similarly ascertained in ANK genotype (65 mg/kg DW), i.e. compared to AA genotype, the content was lower. Maximum were reached in both genotypes in the same *post anthesis*.

There were also significant differences in the trends of cyanidin-3-glucoside content. At the same time, significant differences in trends of the content of this anthocyanin (i.e. cyanidin-3-glucoside) were observed also in wheat with purple pericarp where a steep decrease to levels of about 5 mg/kg DW took place 35 dpa. For wheat with white pericarp (N67), neither delphinidin-3-glucoside nor cyanidin-3-glucoside were detected. In purple wheat, only negligible quantities were found in the course of maturation (AA 0.5 and ANK 1 mg/kg DW).

It is interesting that the delphinidine-3-glycoside content in purple pericarp caryopsis was on the same low level during whole experiment. In case of N67 (control genotype) was on 15 dpa 6 times higher content than in purple pigmented genotypes. Decline was clearly observed also in late development stages. This phenomenon could be explained as copigmentation effect. It is a phenomenon in which the anthocyanins form molecular complexes or clumps producing a change or an increase in color intensity. In this case, methods of detection are not effective, because the anthocyanin content artificially decreases at the end of caryopsis development due to fact the caryopsis is deep dark and almost black.

Key enzyme contributing on biosynthetic pathway is chalcone synthase (CHS). AA and ANK in three chalcone synthase candidate sequences (CHS) single nucleotide polymorphism was detected. The level of similarity varied within the range of 92.5 % - 100 %. The highest occurrence of single nucleotide polymorphisms was detected among genotype sequences of AA (similarity 94.7 %). For N67 identical sequences were detected. Comparing AA and ANK the single nucleotide polymorphism frequency was 7.3 %, (similarity 92.7 %).

Relative gene expression of CHS was observed in whole caryopses and in pericarp and endosperm separately. In whole caryopses values revealed a lower relative gene expression of the genotype white caryopsis N67 ($1.1 \times 10^{-4} - 6.3 \times 10^{-4}$). Same data were measured in purple pigmented genotypes. Data of relative gene expression detected in case of whole purple pigmented caryopses ANK ($1.2 \times 10^{-3} - 1.2 \times 10^{-1}$). It is higher value than in genotype AA ($3.9 \times 10^{-3} - 7.4 \times 10^{-2}$).

Sample separation into pericarp and endosperm showed different levels of relative gene expression in ANK and also AA. Intervals were 10–30 dpa because in later stadium

separation was not possible. Pericarp and endosperm are strongly joined together after water loss. Opposite trends were observed between endosperm and pericarp. In AA, the maximum relative *CHS* expression in the endosperm was observed 15 dpa (1.30×10^{-1}), thereafter a decrease to 6.43×10^{-2} followed 30 dpa. This observation differed from seed coats where only a very slow increase in relative *CHS* expression was observed. A similar trend was observed in ANK but relative gene expression in the endosperm was lower.

CHS gene expression leads into progressive pigment development caryopsis pigmentation. This relative gene expression is subjected not only with time period but also in localization. The gradual understanding of these processes could allow the relative gene expression in other caryopsis parts. The best would be this process throughout the endosperm and not only in the pericarp like today. When there are still used for most food products only the endosperm and flour, respectively. Meals used primarily for whole grain products which create only a minority representation.

Anthocyanins have a high value mainly due to antioxidant properties, and thus may positively affect human health. It can be also used in animal feeding. Wheat represents about 20 % of energy intake for a world population of mankind. Minimum production of anthocyanins in the endosperm (flour source) could form wheat not only significant source of energy, but also an important raw material for functional foods. It means foods which is a made from naturally occurring ingredients with basic nutritional value bringing new positive effect on the consumer health.

8. LITERATURA

A-AAL M. E. & HUCL P., 1999: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76: 350–354.

ABDEL-AAL E. S. & HUCL P., 2003: Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2174–2180.

ABDEL-AAL M. E., YOUNG CH. J. & RABALSKI I., 2006: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 4696–4704.

AHMED N., MAEKAWA M., UTSUGI S. & RIKIISHI K., 2006: The wheat Rc gene for red coleoptile colour codes for a transcriptional activator of late anthocyanin biosynthesis genes. *Journal of Cereal Science*, 44: 54–58.

AL-BABILI S. & BEYER P., 2005: Golden Rice – five years on the road – five years to go? *Trends in Plant Science*, 10: 565–573.

ARBUZOVA V. S. & MAYSTRENKO O. I., 2000: Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Research Communications*, 28: 235–237.

ARBUZOVA V. S., MAYSTRENKO O. I. & POPOVA O. M., 1998: Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar ‘Saratovskaya 29’. *Cereal Research Communications*, 26: 39–46.

ATCHLEY W. R. & FITCH W. M., 1997: A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 5172–5176.

BATYGINA T. B., 1974: *Embryologia pšenici*. Kolos, Leningrad, 206 s. a přílohy (v ruštině).

BATYGINA T. B., 1987: *Chlebnoje zerno*. Nauka, Lenigradskoje otdelenije, Leningrad, 102 s. a přílohy (v ruštině).

BOLTON E. F., 1968, 1970: Inheritance of blue aleurone and pyrole pericarp in hexaploid wheat, Dissertation Abstracts, 19: no. 68_13089, p. 844B, *Plant Breeding*. Abstr., vol. 40, no. 2684.

BÖRNER A., CHEBOTAR S. & KORZUN V., 2000: Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Theoretical Applied Genetics*: 100, 494–497.

BOULTON R., 2001: The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 67–87.

BUREŠOVÁ V., KOPECKÝ D., ŠAFÁŘ J., VYHNÁNEK T., MARTINEK P. & DOLEŽEL J., 2013: Genomic constitution of cereals with blue aleurone trait. Olomouc BIOTECH, *Plant Biotechnology: Green for Good II*, 54.

BURR F. A., BURR B., SCHEER B. E., BLEWITT M., WIENAND U. & MATZ E. C., 1996: The maize repressorlike gene intensier1 shares homology with the r1 /b1 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell*, 8: 1249–1259.

BUSTOS D. V., RIEGEL R. & CALDERIN D. F., 2012: Anthocyanin content of grains in purple wheat is affected by grain position, assimilate availability and agronomic management. *Journal of Cereal Science*, 55: 257–264.

CAREY C. C., STRAHLE J. T., SELINGER D. A. & CHANDLER V. L., 2004: Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar TRANSPARENT TESTA GLABRA1 gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 450–464.

CARRETERO-PAULET L., GALSTYAN A., ROIG-VILLANOVA I., MARTINOU-GARCÍA J., BILBAO-CASTRO J. R. & ROBERTSON D. L., 2010:

Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss and Algae. *Plant Physiology*, 153: 1398–1412.

CASASSOLA A., BRAMMER P. S., CHAVES S. M., WIETHÖLTER P. & CAIERÃO E., 2012: Parental selection of wheat lines based on phenotypic characterization and genetic diversity. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13: 49–58.

COPP L. G. L., 1965: Purple grain in hexaploid wheat. *Wheat Information Service*, 18: 19–20.

DAKIN E. E. & AVISE J. C., 2004: Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504–509.

DE PASCUAL-TERESA S., MORENO A. D. & GARCÍA-VIGUERA C., 2010: Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 1679–1703.

DEDIO W., HILL R. D. & EVANS L. E., 1972: Anthocyanins in the pericarp and coleoptiles of purple wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 52: 977–980.

DOBROVOLSKAYA O. B., ARBUZOVA V. S., LOHWASSER U., RÖDER M. S. & BÖRNER A., 2006: Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 150: 355–364.

DUBCOVSKY J., LUO M.-C., ZHONG G.-Y., BRANSTEITTER R., DESAI A., KILIAN A., KLEINHOF S. A. & DVOŘÁK J., 1996: Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143: 983–999.

DUBOS CH., STRACKE R., GROTEWOLD E., WEISSHAAR B., MARTIN C. & LEPINIEC L., 2010: MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15: 573–581.

DUCHOŇOVÁ L., VARGOVIČOVÁ M. & ŠTURDÍK E., 2012: Nutritional profile of untraditional colored wheat grains and their bread making utilisation. *Journal of Life Sciences*, 6: 1008–1015.

DURE L. & WATERS L., 1965: Long-lived messenger RNA – Evidence from cotton germination. *Science*, 147: 410–412.

FELLER A., MACHEMER K., BRAUN E. L. & GROTEWOLD E., 2011: Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66: 94–116.

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.

GILCHRIST J. A., SORRELLS M. E., 1982: Inheritance of kernel colour in 'Charcoal' wheat. *Journal of Heredity*, 73: 457–460.

GILL B. S., APPELS R., BOTHA-OBERHOLSTER A. M., BUELL C. R., BENNETZEN J. L., CHALHOUB B, CHUMLEY F., DVOŘÁK J., IWANAGA M., KELLER B., LI W., MCCOMBIE W. R., OGIHARA Y., QUETIER F. & SASAKI T., 2004: A Workshop report on wheat genome sequencing. *International genome research on wheat consortium genetics*, 168: 1087–1096.

GOFF S. A., CONE K. C. & CHANDLER V. L., 1992: Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development*, 6: 864–875.

GONCHAROV N. P., 2011: Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Systematics and Evolution*, 295: 1–11.

GRIFFIN W. B., 1987: Out-crossing in New Zealand wheat measured by occurrence of purple grain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30: 287–290.

HAMPL V., PAVLÍČEK A. & FLEGR J., 2001: Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 731–735.

HANÁČEK P., VYHNÁNEK T., ROHRER M., CIESLAROVÁ J. & STAVĚLÍKOVÁ H., 2009: DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. *Horticultural Science*, 36: 127–132.

HARTMANN U., SAGASSER M., MEHRTENS F., STRACKE R. & WEISSHAAR B., 2005: Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology*, 57: 155–171.

HE X. Y., ZHANG Y. L., HE Z. H., WU Y. P., XIAO Y. G., MA C. X. & XIAO X. C., 2008: Characterization of phytoene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 213–221.

HIMI E. & NODA K., 2005: Red grain colour gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor. *Euphytica*, 143: 239–242.

HOLTON T. A. & CORNISH E. C., 1995: Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 1071–1083.

HOSSEINIAN F. S., LI W. & BETA T., 2008: Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*, 109: 916–924.

HOWITT C. A., CAVANAGH C. R., BOWERMAN A. F., CAZZONELLI C., RAMPLING L., MIMICA J. L. & POGSON B. J., 2009: Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Functional & Integrative Genomics*, 9: 363–376.

HUANG, S., SIRIKHACHORNKIT, A., SU, X., FARIS, J., GILL, B., HASELKORN R. & GORNICKI, P., 2002: Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phospho glycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 8133–8138.

CHABINOVÁ J., ZÍTKA O., HÚSKA D., KLEJDUS B. & KIZEK R., 2011: Optimalization chromatographic isolation of anthocyanins, s. 1003–1010. In: Petr ŠKARPA P. et al. (eds.): *MendelNet 2011. Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Mendelova univerzita, Brno, 1064 s.

CHABINOVÁ J., ZÍTKA O., HÚSKA D., KLEJDUS B., KIZEK R., 2011: Stanovení antokyanu ve vzorcích barevné pšenice v průběhu zrání zrna, s. 119–121. In: ŠUDYOVÁ V. (ed.): *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 18. medzinárodnej vedeckej konferencie*. Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany, 199 s.

CHAPUIS M. P. & ESTOUP A., 2007: Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621–631.

CHEN B., WANG X., HU Y., WANG Y. & LIN Z., 2004: Ectopic expression of a c1-I allele from maize inhibits pigment formation in the ower of transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology*, 26: 187–192.

ISLAM M. R., GREGORIO G. B., SALAM M. A., COLLARD B. C. Y., SINGH R. K. & HASSAN L., 2012: Validation of SalTol linked markers and haplotype diversity on chromosome 1 of rice. *Molecular Plant Breeding*, 3: 103–114.

ITO M., IWASE M., KODAMA H., LAVISSE P., KOMAMINE A., NISHIHAMA R., MACHIDA Y. & WATANABE A., 1998: A Novel cis-Acting Element in Promoters of Plant B-Type Cyclin Genes Activates M Phase-Specic Transcription. *The Plant Cell*, 10: 331–341.

JACCARD P., 1908: Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles*, 44: 223–270.

JOPPA R. L. & MAAN S. S., 1982: A durum wheat disomic-substitution line having a pair of chromosomes from *Triticum boeoticum*: Effect on germination. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 24: 549–557.

KANEI-ISHII C., SARAI A., SAWAZAKI T., NAKAGOSHI H., HE D. N., OGATA K., NISHIMURA Y. & ISHII S., 1990: The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 19990–19995.

KAO C. Y., COCCIOLONE S. M., VASIL I. K. & MCCARTY D. R., 1996: Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell*, 8: 1171–1179.

KAUR S., FRANCKI M. G. & FORSTER, J. W., 2012: Identification, characterization and interpretation of single-nucleotide sequence variation in allopolyploid crop species. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 125–138.

KHLESTKINA E. K., RÖDER M. S., PSHENICHNIKOVA T. A., SIMONOV A. V., SALINA E. A. & BÖRNER A., 2008: Genes for anthocyanin pigmentation in wheat: Review and microsatellite-based mapping, s. 155–175. In: VERITY J. F., ABBINGTON L. E. (eds.), *Chromosome Mapping Research Developments*. Nova Publisher, New York, 226 s.

KHLESTKINA E. K., 2013: Genes determining the coloration of different organs in wheat, Russian Journal of Genetics. *Applied Research*, 3: 54–65.

KIRIK V., SIMON M., WESTER K., SCHIEFELBEIN J. & HUELSKAMP M., 2004: ENHANCER of TRY and CPC2 (ETC2) reveals redundancy in the regionspecific control of trichome development of Arabidopsis. *Plant of Molecular Biology*, 55: 389–398.

KLEJDUS B., 2004: *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu*. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 51 s.

KLEMPNAUER K., GONDA T. & BISHOP J., 1982: Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 31: 453–463.

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.

KOES R. E., SPELT C. E., REIF H. J., VAN DEN ELZEN P. J., VELTKAMPE E. & MOL J. N., 1986: Floral tissue of *Petunia hybrida* (V30) expresses only one member of the chalconesynthase multigene family. *Nucleic Acids Research*, 14: 5229–5239.

KRANZ H. D., SCHOLZ K. & WEISSHAAR B., 2000: c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant Journal*, 21: 231–235.

LEDENT V. & VERVOORT M., 2001: The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Research*, 11: 754–770.

LI W. L., FARIS J. D., CHITTOOR J. M., LEACH J. E., HULBERT S. H., LIU D. J., CHEN P. D. & GILL B. S., 1999: Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 226–233.

LI X. P., HOU H. J., LIU Y. P., LAN S. Q. & ZHU Y. Y., 2002: Studies of grain nutritional quality on wheat with blue or purple kernels. *Acta Agriculturae Boreali – Sinica*, 17: 21–24.

LI W., SHAN F., SUN S., CORKE H. & BETA T., 2005. Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8533–8536.

LIPSICK J., 1996: One billion years of Myb. *Oncogene*, 13: 223–225.

- LIU J., LIU L., HOU N., ZHANG A. & LIU C., 2007: Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica*, 155: 249–258.
- LIU M.-S., WANG F., DONG Y.-X. & ZHANG X.-S. 2005: Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes involved in anthocyanin biosynthesis in purple grains of wheat. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47: 1107–1114.
- LIVAK K. J. & SCHMITTGEN T. D., 2001: Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2DDCT method. *Methods*, 25: 402–408.
- LUDWIG S. R., HABERA L. F., DELLAPORTA S. L. & WESSLER S. R., 1989: Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86: 7092–7096.
- MAC KEY J., 1988: A plant breeder's perspective on taxonomy of cultivated plants. *Biologisches Zentralblatt*, 107: 369–379.
- MACINTOSH R. A., YAMAZAKI Y., DUBCOVSKY J., ROGERS J., MORRIS C., APPELS R. & XIA X. C., 2013: *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*, 12th International Wheat Genetics Symposium, 8–13 September 2013, Yokohama, Japan, 31 s.
- MARCUS A. & FEELEY J., 1964: Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 51: 1075–1079.
- MARIAN C. O. & BASS H. W., 2005: The Terminal acidic SANT 1 (Tacs1) gene of maize is expressed in tissues containing meristems and encodes an acidic SANT domain similar to some chromatin-remodeling complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1727: 81–86.

MARTIN C., PRESCOTT A., MACKAY S., BARLETT J. & VRIJLANDT E., 1991: Control of anthocyanin biosynthesis in owners of *Antirrhinum majus*. *Plant Journal*, 1: 37–49.

MARTINEK P., JIRSA O., VACULOVÁ K., CHRPOVÁ J., WATANABE N., BUREŠOVÁ V., KOPECKÝ D., ŠTIASNA K. & TROJAN V., 2014: Use of wheat gene resources with different grain colour in breeding, s. 75–78. In: BRANDSTETTER A., GEPPNER M., GRAUSGRUBER H. & BUCHGRABER K. (eds.): *Tagungsband der 64. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 25.–26. November 2013, Raumberg-Gumpenstein*. Lehr und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Raumberg-Gumpenstein, Austria: 86 s.

MASSARI M. E. & MURRE C., 2000: Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organism. *Molecular Cellular Biology*, 20: 429–440.

MATSUOKA Z., 2011: Evolution of polyploid Triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant Cell Physiology*, 52: 750–764.

MAYER K. F. X. et al., 2014: A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194): 1251788.

MAZZA G. & MINIATI E., 1993: *Anthocyanins in fruits, vegetables and grain*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

MCINTOSH R. A. & BAKER, E. P., 1967: Inheritance of purple pericarp in wheat. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 92: 204–208.

METTIN D., SCHLEGEL G. & LEHMANN C., 1991: Instability of the blue grain colour in a strain of *Triticum aestivum* L. *Geonome*, 34: 745–750.

MIYAMOTO T. & EVERSON E. H., 1958: Biochemical and physiological studies of wheat seed pigmentation. *Agronomy Journal*, 50: 733–734.

MOORE S., VREBALOV J., PAYTON P. & GIOVANNONI J., 2002: Use of genomics tools to isolate key development genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2023–2030.

MUSILOVÁ M., TROJAN V., VYHNÁNEK T. & HAVEL L., 2013: Genetic variability for coloured caryopses in common wheat varieties determined by microsatellite markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49: 116–122.

NEI M., 1973: Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 70: 3321–3323.

NEI M. & LI W. H., 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5269–5273.

NESI N., JOND C., DEBEAUJO I., CABOCHE M. & LEPINEIC L., 2001: The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Biologia Plantarum*, 53: 223–228.

OGATA K., KANEI-ISHII C., SASAKI M., HATANAKA H., NAGADOI A., ENARI M., NAKAMURA H., NISHIMURA Y, ISHII S. & SARAI A., 1996: The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature Structural Biology*, 3: 178–187.

PAETKAU D., CALVERT W., STIRLING I. & STROBECK C., 1995: Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347–354.

PAGE R. D. M., 1996: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.

PAZ-ARES J., GHOSAL D., WIENAND U., PETERSONT P. A. & SAEDLER H., 1987: The regulatory cl locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-

oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal*, 2: 3553–3558.

PETERSEN G., SEBERG O., YDE M. & BERTHELSEN K., 2006: Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 70–82.

PIECH J. & EVANS L. E., 1979: Monosomic analysis of purple grain colour in hexaploid wheat. *Plant Breeding*, 82: 212–217.

POZNIAK C. J., KNOX R. E., CLARKE F. R. & CLARKE J. M., 2007: Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 525–537.

QU L. J. & ZHU Y. X., 2006: Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Plant Biology*, 9: 544–549.

QUALSET C. O., SOLIMAN K. M., JAN C. C., DVOŘÁK J., MCGUIRE P. E. & VOGT H. E., 2005: Registration of UC66049 *Triticum aestivum* blue aleurone genetic stock. *Journal of Crop Science*, 45: 432.

RIECHMANN J. L., HERD J., MARTIN C., NEUBER L., JUANY C., KEDDIE J., ADAM L., PINEDA O., RATCLIFFE O. J., SAMAHA R. R., CREELMAN R., PILGRIM M., BROUN P., ZHANG J. Z., GHANDEHARI D., SHERMAN B. K. & YU C. L., 2000: Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105–2110.

RÖDER M. S., KORZUN V., WENDEHAKE K., PLASCHKE J., TIXIER M.-H., LEROY P. & GANAL M. W., 1998: A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007–2023.

ROGERS S. O. & QUARTANO R. S., 1983: Morphological staging of wheat development. *American Journal of Botany*, 70: 308–311.

ROSINSKI J. A. & ATCHLEY W. R., 1998: Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *Journal of Molecular Evolution*, 46: 74–83.

ROZEN S. & SKALETSKY H., 2000: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Molecular Biology*, 132: 365–386.

SALEM K. F. M., EL-ZANATY A. M. & ESMAIL R. M., 2008: Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5: 538–544.

SELINGER D. & CHANDLER V., 1999: A mutation in the pale aleurone color1 gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *Plant Cell*, 11: 5–14.

SHARMAN B. C., 1958: 'Purple Pericarp': a Monofactorial Dominant in Tetraploid Wheats. *Nature*, 181: 929.

SCHELLMANN S., SCHNITTGER A., KIRIK V., WADA T., OKADA K., BEERMANN A., THUMFAHRT J., JURGENS G. & HULSKAMP M., 2002: TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 21: 5036–5046.

SINGH A., PALLAVI J. K. & PRABHU K. V., 2012: Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene Lr25 in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 53: 19–25.

SINGH K., GHAI M., GARG M., CHHUNEJA P., KAUR P., SCHNURBUSCH T., KELLER B. & DHALIWAL H. S., 2007: An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* x *T. monococcum* RIL population. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 301–312.

SPELT C., QUATTROCCHIO F., MOL J. N. & KOES R., 2000: Anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell*, 12: 1619–1632.

STRACKE R., WEBER M. & WEISSHAAR B., 2001: The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 4: 447–456.

ŠPANIĆ V., BUERSTMAYR H. & DREZNER G., 2012: Assessment of genetic diversity of wheat genotypes using microsatellite markers. *Periodicum Biologorum*, 114: 37–42.

ŠRÁMKOVÁ Z., TREFOVÁ E. & ŠTURDÍK E., 2009: Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2: 115–138.

TERESHCHENKO O. Y., ARBUZOVA V. S. & KHLESTKINA E. K., 2013: Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes. *Journal of Cereal Science*, 57: 10–13.

TERESHCHENKO O. Y., GORDEEVA E. I., ARBUZOVA V. S., BÖRNER A. & KHLESTKINA E. K., 2012: The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Research Communications*, 40: 334–341.

THAIN S. C., MURTAS G., LYNN J. R., MCGRATH R. B. & MILLAR A. J., 2002: The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiology*, 130: 102–110.

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: 48–55.

TRUE R. H., 1893: On the Development of the Caryopsis. *The Botanical Gazette*, 18: 212–226.

VAN SLAGEREN M. W., 1994: *In Wild Wheats: A Monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae)*. Wageningen Agricultural University papers, Wageningen, The Netherlands. 512 s.

- VYHNÁNEK T., NEVRTALOVÁ E. & SLEZÁKOVÁ K., 2009: Detection of the genetic variability of triticale using wheat and rye SSR markers. *Cereal Research Communications*, 37 (1): 23–29.
- WANG A., XIA Q., XIE W., DATLA R. & SELVARAJ G., 2003: The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 14487–14492.
- WATTIER R., ENGEL R. C., SAUMITOU-LAPRADE P. & VALERO M., 1998: Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7: 1569–1573.
- WEBER J. L., 1990: Informativeness of human (dC-dA)_n x (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics*, 7: 524–530.
- WEIR B. S., 1990: *Genetic data analysis*. Sinauer Associated, Sunderland, Mass., USA.
- WESTER K., DIGIUNI S., GEIER F., TIMMER J., FLECK C. & HUELSKAMP M., 2009: Functional diversity of R3 single repeat genes in trichome development. *Development*, 136: 1487–1496.
- WINKEL-SHIRLEY B., 2001: Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485–493.
- YANG G., LI B., GAO J., LIU J., ZHAO X., ZHENG Q., TONG Y. & LI Z., 2004: Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway. *Journal of Integrative Plant Biology (Acta Botanica Sinica)*, 46: 588–594.

YOUNG T. E. & GALLIE D. R., 1999: Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology*, 39: 915–926.

ZELLER E. J., CERMEFIO M. C. & MILLER T. E., 1991: Cytological analysis on the distribution and origin of the alien chromosome pair conferring blue aleurone color in several European common wheat (*Triticum aestivum* L.) strains. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 551–558.

ZEVEN A. C., 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56: 243–258.

ZHANG P., 2002: *Analysis of the wheat genome by BAC-FISH*. Ph.D. Thesis, Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, KS.

ZHANG W. & DUBCOVSKY J., 2008: Association between allelic variation at the phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 635–645.

ŽOFAJOVÁ A., PŠENÁKOVÁ I., HAVRLETOVÁ M. & PILIAROVÁ M., 2012: Accumulation of anthocyanins in wheat grain. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 58: 50–60.

Internetové zdroje:

Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry. [cit. 2014-04-13].

Dostupné na:

<http://www.jki.bund.de/en/startseite/veroeffentlichungen/bbch-codes.html>

GrainGenes – A Database for Triticum and Avena. [cit. 2014-03-07].

Dostupné na: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>

McINTOSH R. A., YAMAZAKI Y., DUBCOVSKY J., ROGERS J., MORRIS C., SOMERS D. J., APPELS R. & DEVOS K. M., 2008: *Catalogue of Gene Symbols for*

Wheat. [cit. 2014-08-23]. 11th International Wheat Genetics Symposium 24–29 August 2008, Brisbane Qld Australia. US Department of Agriculture, Washington, D.C., 59 s.
Dostupné na: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/Catalogue2008.pdf>

SOMERS D. J. & ISAAC P., 2004: *SSRs from the wheat microsatellite consortium*.
[cit. 2010-04-10]. Dostupné na: wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSR/WMC

Statistiky Světové zdravotní organizace. [cit. 2014-02-22]. Dostupné na: www.fao.org

Classification of Triticum according to Dorofeev et al. 1979, with nomenclatural corrections. *Wheat taxonomy* [cit. 2014-09-05].

Dostupné na: <http://www.k-state.edu/wgrc/Taxonomy/taxdor.html>

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Časové schéma vývoje polyploidních druhů rodu pšenice	11
Obrázek 2: Klasifikace rodu <i>Triticum</i> podle Mac Key z roku 1988.....	13
Obrázek 3: Klasifikace rodu <i>Triticum</i> podle Dorofeev et al., z roku 1979.....	14
Obrázek 4: Chromozomální konstituce druhů podílejících se na vzniku hexaploidní pšenice.....	16
Obrázek 5: Vývoj obilky po oplození (Batygina 1987).....	19
Obrázek 6: Podélný řez plně vyvinutou obilkou	23
Obrázek 7: Příčný řez obilkou genotypu ANK-28B s purpurovým perikarpem.	25
Obrázek 8: Příčný řez obilkou genotypu ANK-28B s purpurovým perikarpem. Ukládání pigmentů v perikarpu není stejnoměrné. (měřítko = 200 μ m).....	25
Obrázek 9: Chromozomy hexaploidní pšenice seté.....	26
Obrázek 10: Počátek biochemické dráhy syntézy antokyanů.....	31
Obrázek 11: Biochemická dráha vedoucí k syntéze antokyanů	32
Obrázek 12: Základní růstové stádium 1, stupeň 11 dle stupnice BBCH.....	41
Obrázek 13: Grafické zobrazení použitých materiálů pro experimenty	42
Obrázek 14: Základní růstové stádium 6, stupeň 65 dle stupnice BBCH.....	43
Obrázek 15: Vzorce pro výpočet: index diverzity (DI), pravděpodobnost identity (PI) a polymorfní informační index (PIC).....	45
Obrázek 16: Graf zobrazující procentickou četnost alel v souboru 27 použitých SSR markerů	50
Obrázek 17: Dendrogram vyjadřující variabilitu a rozdělení 16 genotypů pšenice a planého druhu <i>Th. ponticum</i> použitých v práci, I. A, I. B a II. subklastery	52
Obrázek 18: Příbuznost genotypů s purpurovým perikarpem a planého druhu <i>Thinopyrum ponticum</i> vyjádřená dendrogramem analýz SSR mikrosatelitů, A a B – subklastery.	54
Obrázek 19: Celé obilky v průběhu zrání genotypu ANK s purpurovým perikarpem, dpa (dny <i>post anthesis</i>)	55
Obrázek 20: Příčné řezy obilkou v průběhu zrání genotypu ANK s purpurovým perikarpem, dpa (dny <i>post anthesis</i>)	55
Obrázek 21: Vzhled obilky 15dpa, dpa (dny <i>post anthesis</i>).....	58
Obrázek 22: Vzhled obilky 15dpa – detail, dpa (dny <i>post anthesis</i>)	58

Obrázek 23: Vzhled obilky 20 dpa, dpa (dny <i>post anthesis</i>), ukládání barviv v oblasti apexu	59
Obrázek 24: Vzhled obilky 20 dpa – detail, dpa (dny <i>post anthesis</i>), ukládání barviv v oblasti apexu a na bocích	59
Obrázek 25: Vzhled obilky 25 dpa, dpa (dny <i>post anthesis</i>), rozšiřování zbarvení na boky a dorzální stranu obilky (bez rýhy)	60
Obrázek 26: Vzhled obilky 25 dpa – detail, dpa (dny <i>post anthesis</i>), rozšiřování zbarvení na boky a dorzální stranu obilky (bez rýhy).....	60
Obrázek 27: Vzhled obilky 30 dpa, dpa (dny <i>post anthesis</i>), úplné zbarvení obilky	61
Obrázek 28: Vzhled obilky 30 dpa – detail, dpa (dny <i>post anthesis</i>), úplné zbarvení obilky	61
Obrázek 29: Vzhled obilky 40 dpa, plná zralost, dpa (dny <i>post anthesis</i>), vysychání obilky	62
Obrázek 30: Vzhled obilky 40 dpa, plná zralost – detail, dpa (dny <i>post anthesis</i>), vysychání obilky	62
Obrázek 31: Změny obsahu hlavních antokyanů v průběhu zrání u genotypů N67, AA a ANK	65
Obrázek 32: Kandidátní sekvence chalkonsyntázy analyzovaných genotypů.....	67
Obrázek 33: Míra exprese chalkonsyntázy v celé obilce u genotypů AA, ANK, N67 ..	69
Obrázek 34: Míra exprese chalkonsyntázy v obalových vrstvách a endospermu u genotypu AA	69
Obrázek 35: Míra exprese chalkonsyntázy v obalových vrstvách a endospermu u genotypu ANK	70

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nomenklatura rodu <i>Triticum</i>	15
Tabulka 2: Zbarvení obilek a skupiny pigmentů, které je způsobují.....	24
Tabulka 3: Geny odpovědné za zbarvení obilek a jejich umístění a aktuální značení ...	26
Tabulka 4: Charakteristika experimentálního materiálu.....	40
Tabulka 5: Názvy použitých materiálů pro experimenty.....	42
Tabulka 6: Použité SSR markery pšenice a jejich statistické parametry	51
Tabulka 7: Matice podobnosti sekvence pro chalkonsyntázu (%)	66

11. SEZNAM ZKRATEK

AA = Abyssinskaya Arraseita

AN2 = Anthocyanin2

ANK = genotypy s purpurovým perikarpem ANK-28B

ANS = antokyanidinsyntáza

Ba = gen pro blue aleuron

bHLH basic helix-loop-helix proteiny

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

Cl = gen pro Colorless1

C1-I = Colorless1 inhibitor

CHI = chalkonisomeráza

CHS = chalkonsyntáza

crtI = gen pro karotendesaturázu

DFR = dihydroflavonol 4-reduktáza

DI = Index diverzity

dpa = dny *post anthesis*

EBGs = Early Biosynthesis Genes

F3H = flavanon 3-hydroxyláza

GAPDH = glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

HTH = helix-turn-helix

INT1 = gen pro intensifier1

LBGs = Late Biosynthesis Genes

R-MYB = MYB-related

N67 = Novosibirskaya 67

NCBI = Národní centrum pro biotechnologické informace

PAL = fenylalaninamoniumlyáza

Pan = gen pro purple anther

Pc = gen pro purple culm

PCR = Polymerázová řetězová reakce – Polymerase Chain Reaction

PI = pravděpodobnost identity

PIC = polymorfní informační index

Plb = gen pro purple leaf blade

Pls = gen pro purple leaf sheath

Pp = gen pro purple pericarp

Rc = gen pro red coleoptile

SSR = Simple Sequence Repeat

TAL = tyrosinamoniumlyáza

TBS = Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen

TFs = transkripční faktory

TTG1 = gen pro Transparent tesla glabra1

UFGT UDPG = flavonoidglukosyltransferáza

WDR = tryptofan-aspartam repeats