



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

### ZMĚNY V OBSAHU GLIADINOVÝCH FRAKCIÍ BÍLKOVIN U DVOU GENOTYPŮ OZIMÉ PŠENICE S ROZDÍLNOU DÉLKOU VEGETAČNÍ DOBY V ZÁVISLOSTI NA DUSÍKATÉM HNOJENÍ V INTERAKCI SE SUCHEM.

CHANGES IN THE CONTENT OF GLIADIN PROTEIN FRACTIONS IN TWO GENOTYPES OF  
WINTER WHEAT WITH DIFFERENT LENGTHS OF VEGETATION TIME  
DEPENDING ON NITROGEN FERTILIZATION WITH DROUGHT INTERACTION.

#### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

#### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marie Francová

#### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1293/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Marie Francová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Změny v obsahu gliadinových frakcí bílkovin u dvou genotypů ozimé pšenice s rozdílnou délkou vegetační doby v závislosti na dusíkatém hnojení v interakci se suchem.

### Zadání diplomové práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu dusíkatého hnojení a sucha na složení a obsah lepkových bílkovin u pšenice seté. Zvláště se zaměřit na změny v obsahu gliadinů.

V experimentální části sledovat obsah proteinů gliadinové frakce u dvou genotypů ozimé pšenice s rozdílnou délkou vegetační doby v závislosti na dusíkatém hnojení v interakci se suchem.

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Marie Francová  
student(ka)

-----  
PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V této práci byl sledován vliv změny v obsahu gliadinových frakcí u dvou odrůd pšenice ozimé s rozdílnou délkou vegetační doby v závislosti na dusíkatém hnojení a suchu. Použité odrůdy byly Avenue a Tobac. Polovina rostlin byla hnojena dusíkatým hnojivem o koncentraci 200 kg N/ha. Třetina rostlin byla pěstována v podmínkách brzkého sucha (v období kvetení), třetina v podmínkách pozdního sucha (doba plnění zrna), třetina byla přirozeně zavlažovaná. Gliadinové frakce byly separovány metodou A-PAGE. Jejich obsah byl stanoven počítačovou denzitometrií. Dusíkaté hnojení zvyšovalo obsah jednotlivých frakcí. Samotné sucho (konkrétně brzké sucho) se projevilo pouze u  $\alpha$ -gliadinů odrůdy Tobac zvýšením jejich obsahu. Brzké i pozdní sucho zvyšovalo v kombinaci s dusíkatým hnojením obsah gliadinových frakcí odrůdy Tobac. Na odrůdu Avenue nemělo brzké sucho v kombinaci s dusíkatým hnojením vliv, s výjimkou frakce  $\alpha$ -gliadinů, kde brzké sucho zeslabilo vliv dusíkatého hnojení. Pozdní sucho v interakci s dusíkatým hnojením zvyšovalo u odrůdy Avenue obsah gliadinů. Nejvyšší nárůst obsahu gliadinů byl pozorován u frakce  $\omega$ -5 odrůdy Tobac při interakčním působení dusíkatého hnojení a pozdního sucha.

## **ABSTRACT**

In this diploma thesis the influence of the nitrogen fertilization and drought on the change in the content of gliadin protein fractions in two genotypes of winter wheat Avenue and Tobac was studied. These two genotypes differ in vegetation time length. Half of the plants were fertilized using nitrogen fertilizer at 200 kg N/ha. One third of the plants were cultured under the conditions of early drought (in bloom season), other one third was grown under the conditions of of late drought (grain filling season), and last third was grown under the conditions of natural irrigation. Individual gliadin fractions were separated by using A-PAGE method and their content quantified by computer densitometry. Our results have shown increase in gliadin fractions content after nitrogen fertilization. Early drought itself caused significant increase in the levels of  $\alpha$ -gliadin fractions in Tobac genotype. Early and late drought in combination with nitrogen fertilization increased levels of gliadin fractions in Tobac genotype. Early drought in combination with nitrogen fertilization had no effect on Avenue genotype, except of  $\alpha$ -gliadin fractions which decreased significantly. Late drought in combination with nitrogen fertilization caused significant increase in gliadin content in Avenue genotype. The highest increase in gliadin content was observed in fraction  $\omega$ -5 of the Tobac variety during interaction nitrogen fertilization with late drought.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

pšenice ozimá, gliadiny, lepek, dusíkaté hnojení, sucho, A-PAGE

## **KEYWORDS**

winter wheat, gliadins, gluten, nitrogen fertilization, drought, A-PAGE

FRANCOVÁ, Marie. *Změny v obsahu gliadinových frakcí bílkovin u dvou genotypů ozimé pšenice s rozdílnou délkou vegetační doby v závislosti na dusíkatém hnojení v interakci se suchem*. [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115835>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Miroslav Hrstka.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### *Poděkování*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, pomoc, cenné rady a připomínky a za trpělivost při vedení mé diplomové práce.*

## OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1. Globální klimatická změna .....	8
2.1.1. Skleníkové plyny .....	8
2.1.2. Vliv sucha na rostliny .....	10
2.1.3. Vliv sucha na pšenici .....	11
2.1.4. Vliv dusíkatého hnojení na rostliny .....	11
2.1.5. Vliv dusíkatého hnojení na pšenici .....	11
2.2 Význam pšenice a pšeničné proteiny .....	12
2.2.1. Morfologie pšeničného zrna .....	12
2.2.2. Pšeničné bílkoviny .....	14
2.2.2.1. Lepkové proteiny .....	14
2.2.2.2. Albuminy a globuliny .....	17
2.3. Vybrané metody stanovení lepkových proteinů .....	17
2.3.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	17
2.3.1.1. A-PAGE .....	18
2.3.1.2. SDS-PAGE .....	19
2.3.2. Kapilární elektroforéza .....	19
2.3.3. 2-D elektroforéza .....	19
2.3.4. ELISA .....	20
2.3.5. Chromatografické metody .....	21
2.3.6. Hmotnostní spektrometrie .....	21
3. PRAKTICKÁ ČÁST .....	22
3.1. Materiál .....	22
3.2 Metody .....	23
3.2.1 Přístroje .....	23
3.2.2 Chemikálie .....	23
3.2.3. Příprava roztoků .....	24
3.2.4. Příprava vzorků .....	24
3.2.5. Příprava polyakrylamidového gelu .....	24
3.2.6. Elektroforéza .....	25
3.2.7. Fixace a vizualizace bílkovin .....	25

3.3. Zpracování výsledků .....	25
4. VÝSLEDKY .....	26
5. DISKUZE .....	35
6. ZÁVĚR .....	38
7. Literatura.....	39

## 1. ÚVOD

V současné době lze pozorovat výrazný nárůst extrémů meteorologických jevů, jako jsou nezvyklé teploty či častá a intenzivní sucha. Tyto jevy jsou dány měnícím se klimatem. Klima se mění miliony let, v posledních letech jsou však tyto změny rychlé jako nikdy předtím.

Extrémní meteorologické jevy způsobují rostlinám stres, a tím ovlivňují jejich metabolismus. Vzhledem k důležitosti zajištění výživy lidstva je vhodné věnovat pozornost především změnám, které tyto jevy vyvolávají u hospodářsky významných plodin. Výsadní postavení mezi zemědělskými plodinami má v tomto ohledu pšenice.

Pšenice je jedna z nejdéle pěstovaných obilnin. V České republice je vysazována přibližně na čtvrtině orné půdy, její výnos se pohybuje mezi 3,5–6,0 t.ha<sup>-1</sup>. Využívá se k potravinářským, krmivářským i technickým účelům.

Pro nutriční i pekařskou kvalitu pšeničné mouky má rozhodující vliv obsah hrubých bílkovin. Nejdůležitějšími bílkovinami jsou z tohoto hlediska tzv. lepkové proteiny, které jsou tvořeny dvěma typy bílkovin – gliadiny s monomerní strukturou a gluteniny s polymerní strukturou. Lepek významně ovlivňuje reologické a viskoelastické vlastnosti těsta. Pro výslednou kvalitu těsta je rozhodující složení gliadinů a gluteninů a jejich vzájemný poměr.

Cílem této práce bylo sledovat a vyhodnotit vliv sucha v interakci s dusíkatým hnojením na složení gliadinových frakcí lepkových bílkovin dvou odrůd pšenice ozimé – rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Globální klimatická změna

Zemské klima je ovlivňováno mnoha faktory, které na něho působí. Zjednodušeně tyto faktory můžeme rozdělit na extraterestrické (neboli mimozemské, např. sluneční záření), terestrické (dané vlastnostmi planety – rozložením pevnin a oceánů, vegetace aj.) a antropogenní – dané činností člověka (zejména urbanizace a tvorba skleníkových plynů) [1].

Klima jako takové je nestabilní a proměnlivé. Jeho změny probíhají už miliony let.

Podle výzkumů Hönische a kol. [2] došlo ke zvýšení obsahu  $\text{CO}_2$  v atmosféře na přechodu doby ledové do doby meziledové o přibližně 30 %. Pravděpodobnou příčinou bylo uvolnění  $\text{CO}_2$  z oceánů. A naopak bylo pozorováno snížení koncentrace  $\text{CO}_2$  již několik tisíc let před nástupem doby ledové. Tyto změny jsou přičítány nárůstu objemu ledovců, ukládání uhličitánu vápenatého do korálových útesů a změnám probíhajícím v oceánech (zejména alkalita a cirkulace oceánů). Změny však probíhaly pomalu a rostliny se na ně stačily adaptovat.

Od počátku 20. století jsou však změny klimatu rychlé jako nikdy předtím. Velmi rychle se zvyšuje koncentrace  $\text{CO}_2$  ve vzduchu, stoupá teplota, jsou častější dlouhé periody sucha a další extrémní meteorologické jevy. Důležitou otázkou je, na kolik a jakým způsobem tyto změny ovlivňuje činnost člověka. Nejdůležitějšími antropogenními faktory jsou rozvoj průmyslu a dopravy, změny ve využívání půdy a obecně způsob hospodaření v zemědělství a lesnictví [3]. Tyto rychlé a výrazné změny klimatu, které se odchyľují od dlouhodobých pravidelných změn bývají souhrnně označovány globální změna klimatu (GZK) [4]. Dnes se má za to, že hlavní příčinou GZK je tzv. skleníkový efekt, způsobený skleníkovými plyny.

#### 2.1.1. Skleníkové plyny

Na planetu Zemi dopadá sluneční záření a planeta záření do vesmíru vyzařuje. Pokud tyto dva procesy nejsou v rovnováze a planeta více záření přijme, než vydá, dochází k jejímu zahřívání. Některé plyny, které jsou přirozenou součástí atmosféry, mají schopnost pohlcovat záření vyzařované povrchem Země. Díky tomu má planeta vhodné podmínky pro rozvoj života. Nejdůležitějším z těchto tzv. skleníkových plynů je vodní pára. Další skleníkové plyny jsou oxid uhličitý, freony, methan a oxid dusný. Lidskou činností se koncentrace těchto skleníkových plynů v atmosféře zvyšuje. Ke zvýšení koncentrace oxidu uhličitého dochází zejména v souvislosti se spalovacími procesy, methan se uvolňuje zemědělskou činností a z tajícího permafrostu, oxidy dusíku se tvoří při průmyslových výrobcích a ve spalovacích motorech, freony jsou uvolňovány z chladicích zařízení. [5] Nejvíce se na rostoucím oteplování Země podílí oxid uhličitý (z asi 47 %), dále methan (z 27 %) a freony (z 10 %) [6].

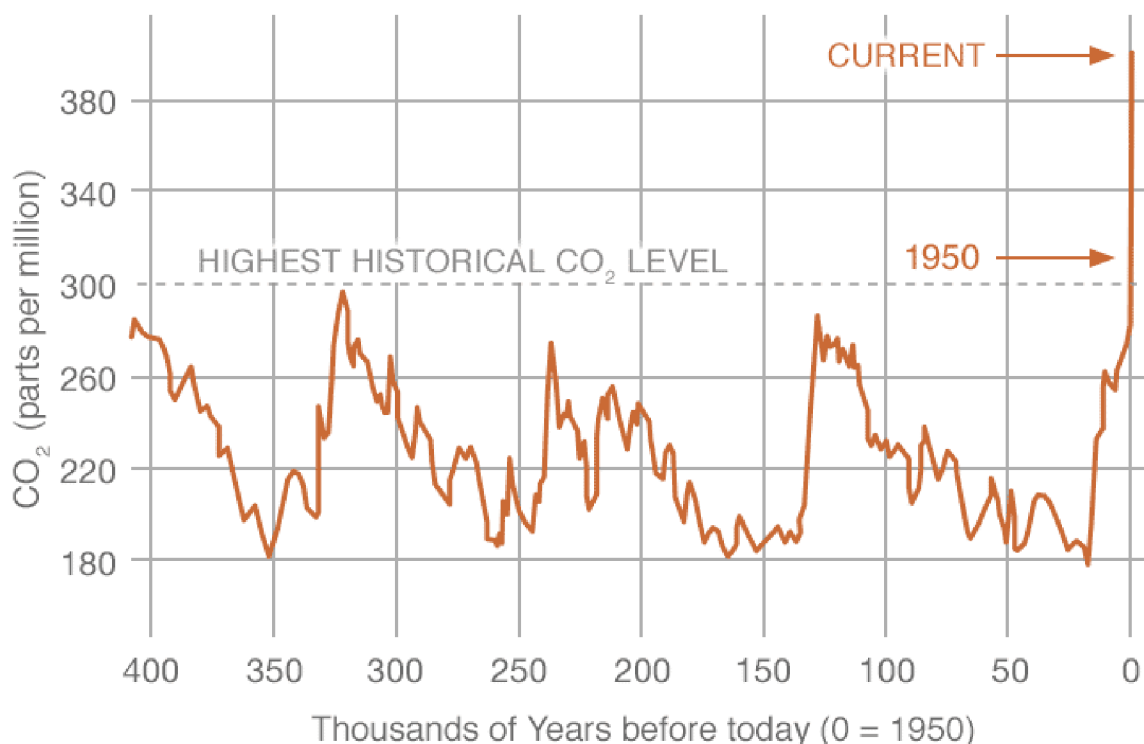
Atmosférické koncentrace oxidu uhličitého, methanu a oxidu dusného se zvýšily na úroveň vyšší než v předchozích nejméně 800 000 letech [1]. Koncentrace  $\text{CO}_2$  se



v posledních 1000 letech pohybovala poměrně stabilně mezi 270–290 ppm [7]. Za posledních 200 let se však zvýšila z hodnoty 280 ppm na hodnotu 360 ppm, což představuje přibližně 30% nárůst. Tento nárůst způsobuje oteplování zemské atmosféry a ovlivňuje srážky a evaporaci. Za hlavní příčinu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> se považují emise z fosilních paliv a změna ve využívání půdy. [8]

Důležitým ukazatelem je meziroční nárůst koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře. Podle Canadella a kol. [9] byl mezi léty 1970–1979 meziroční nárůst 1,3 μmol.mol<sup>-1</sup>, mezi léty 2000–2006 se však zvýšil na 1,9 μmol.mol<sup>-1</sup>.

Údaje o změnách koncentrace CO<sub>2</sub> se získávají kromě měření na různých místech Země také ze vzorků z arktických ledů (obr. 1) nebo prostřednictvím izotopové analýzy letokruhů.



Obr. 1 Vývoj koncentrace CO<sub>2</sub> za posledních 400 000 let získané analýzou ledovců [10]

Se zvyšující se koncentrací skleníkových plynů dochází také k nárůstu průměrné roční teploty. V průběhu 20. století se průměrná roční teplota ve většině evropských zemí zvýšila až o 0,8 °C.

Podle organizace Intergovernmental Panel on Climate Change, založené v roce 1988, dochází v důsledku změn koncentrace tzv. skleníkových plynů k jednoznačnému oteplování klimatického systému, jehož změny pozorované od roku 1950 jsou bezprecedentní v průběhu desetiletí až tisíciletí. Důsledkem toho dochází k úbytku ledovců, zvýšení hladiny moře, okyselení oceánu po absorpci většího množství CO<sub>2</sub>. Podle výsledků výzkumů této organizace bude průměrná povrchová teplota v roce 2100 o 1,5 °C vyšší než proti průměrné teplotě z let 1850–1900. [1]

Změny klimatu ovlivňují také srážky. Ty jsou nerovnoměrné, dochází ke zvýšené četnosti a intenzitě sucha i přívalových dešťů [11].

### **2.1.2. Vliv sucha na rostliny**

Sucho je normální opakující se jev klimatu, který souvisí s jeho kolísáním. Nejedná se o jev náhodný, ani vzácný. Sucho může být definováno jako deficit srážek vzhledem k očekávaným srážkám, které se vyskytují v průběhu sezóny nebo určité části roku. [12, 13]

Sucho vzniká jako důsledek nedostatku srážek v kombinaci s dalšími faktory, které mohou jeho intenzitu výrazně zvýšit. Především se jedná o vysokou teplotu, dále například nízkou relativní vlhkost vzduchu nebo rychlost větru [12]. Vysoká teplota vzduchu podporuje vyšší výpar. Vliv má také charakter zim – pokud jsou z hlediska množství sněhu podprůměrné a trvají krátkou dobu, začne brzy pravidelný pokles zásob vody v půdě a v podzemních vodách [14]. Výskyt sucha může být přímo spojen s lidskou činností a poptávkou po vodě. Zemědělství představuje první hospodářský sektor, který je suchem zasažen [12].

Nedostatek vody je považován za hlavní enviromentální faktor limitující růst rostlin a tvorbu úrody [15]. Mezi jeho typické příznaky patří zavírání průduchů, inhibice fotosyntézy, stárnutí listů, omezení růstu rostliny a odumírání kořenů. Během stresu ze sucha je inhibována syntéza a pohyb cytokinů rostliny, často také dochází k jejich degradaci. Tento jev je úzce spojen se stárnutím listů. [16]

Zavírání průduchů omezuje difuzi CO<sub>2</sub> z atmosféry, což je hlavní příčinou inhibice fotosyntézy. Vodní stres také snižuje metabolické aktivity a především snižuje aktivitu enzymu Rubisco [15]. Právě zavírání průduchů a inhibice růstu listů jsou prvními reakcemi na sucho, které chrání rostlinu od ztráty vody. Velká ztráta vody by mohla vést k dehydrataci buněk, nekontrolovatelné kavitaci xylému a v konečném důsledku smrti rostliny [17].

Snížení vodního potenciálu pod 1,5 MPa způsobuje silný stres spojený s poklesem turgoru v buňkách a vadnutím listů. Předtím ale ztráta vody způsobuje zastavení růstu buněk, pokles fotosyntézy, asimilace nitrátů a zvýšení podílu stresových proteinů. Při ztrátě vody z buněk a pletiv klesá vodní potenciál listů k hodnotě 0,8 MPa, která je považována za hraniční, kterou je většina rostlin schopná snést.

Součástí adaptace na ztrátu vody je syntéza osmoticky aktivních látek – cukrů, alkoholů, některých aminokyselin, zejména prolinu, které zvyšují osmotický tlak v buňce. Se suchem bojují rostliny také opadem listů. [18]

Reakce rostlin na stres suchem může probíhat odlišně v závislosti na tom, zda již podobný stres v minulosti prodělaly – jejich reakce mohou probíhat rychleji i pomaleji. Jednou z metod přizpůsobení se suchu je zvýšená aktivita antioxidantů. [19, 20]

### **2.1.3. Vliv sucha na pšenici**

Obilniny patří mezi rostliny, které jsou na sucho citlivé jak ve fázi vegetativní, tak ve fázi plnění zrna. Navzdory tomu má však nedostatek vláhy díky bohatému kořenovému systému obilnin (v porovnání např. s hlíznatými či kořenovými plodinami) na ně menší vliv. [21]

Podle výzkumů Balla a kol. [22] se výrazně snižuje výnos a kvalita zrn pšenice při současném působení sucha a vysoké teploty, a to až o 76 % oproti poklesu o 57 % pouze při působení sucha.

Při stresu způsobeném nedostatkem vody dochází ke zvýšení obsahu bílkovin pšenice za současného celkového úbytku výtěžku zrna. Tento jev je způsoben snížením produkce škrobu. [22]

Na tom, jak ovlivňuje nedostatek vláhy složení bílkovin pšenice, nepadá v literatuře jednoznačný názor. Podle Zhanga a kol. [23] způsobuje sucho významné zvýšení obsahu albuminů a gliadinů, na globuliny a gluteniny nemá vliv. Naproti tomu Flagella a kol. [24] tvrdí, že stres suchem způsobuje nárůst gluteninů (konkrétně HMW gluteninů), nemá však vliv na gliadiny a LMW gluteniny. Zároveň tvrdí, že složení bílkovin je ovlivněno intenzitou tohoto sucha a obdobím, po které sucho na pšenici působí.

Podle Li a kol. [25] ovlivňuje výtěžnost pšenice převážně prostředí, zatímco genotyp pšenice má rozhodující vliv na sílu lepku. Sucho podle těchto výzkumů má na sílu lepku pozitivní vliv.

### **2.1.4. Vliv dusíkatého hnojení na rostliny**

Dusík má pro výživu rostlin výsadní postavení mezi biogenními živinami. Dusík je důležitou složkou biologicky aktivních látek jako jsou bílkoviny, purinové i pyrimidinové báze nukleových kyselin, chlorofyl, enzymy aj. Jeho množství v rostlinách závisí mimo jiné na jejím druhu, stáří a orgánu. Dusík je v rostlině v největším množství přítomen během brzkých fází vývoje a postupně klesá. [26] Snížené množství dusíku během fáze plnění zrna, tedy generativní fáze růstu, může vést k významnému rozkladu enzymu Rubisco a tím snižovat rychlost fixace CO<sub>2</sub>, což vede ke snížení výnosů zrna [27].

### **2.1.5. Vliv dusíkatého hnojení na pšenici**

U ozimé pšenice se zvyšuje utilizace dusíku při dostatečném zásobování sírou. Podle Schnuga a kol. [28] se jedná o navýšení z 59 % na 75 %. Podle Hřivny a kol. [29] ovlivňuje hnojení dusíkem pozitivně především celkové množství vyextrahovaných dusíkatých látek. Podle výsledků jejich pokusů prováděných v letech 2000-2001 došlo spolu s nárůstem celkových dusíkatých látek také ke zvýšení obsahu albuminů a gliadinů, zatímco podíl globulinů a gluteninů se snížil.

Poznatek, že dusíkaté hnojení zvyšuje výnosy pšeničných zrn se využívá již od dob tzv. Zelené revoluce, kterou zahájil svým výzkumem ve 40. letech 20. století Američan Norman Borlaug a která vedla ke celosvětovému zvýšení výnosů obilnin (především pšenice) a rýže. V rámci tohoto výzkumu bylo využito několik technologických postupů, které zvyšovaly produkci pšeničných zrn jako je použití syntetických dusíkatých hnojiv, šlechtění nových vysoce plodících odrůd odolných vůči některým nemocem a plísním, řízené zavlažování vodou, užívání pesticidů nebo mechanizace polních prací [30].

Vzhledem k úspěchu tohoto výzkumu se technologie Zelené revoluce rozšířily celosvětově. Mezi léty 1961–1985 se produkce obilnin v rozvojových zemích zdvojnásobila [31].

Navzdory nespornému pozitivu výrazného zvýšení produkce, má však zavádění těchto technik také svá negativa: používání syntetických dusíkatých hnojiv vede k degradaci půdy a znečišťování pitné vody a úbytek druhové rozmanitosti plodin způsobuje jejich náchylnost k nemocem a vede k nutnosti užití pesticidů [32]. S vyšší produkcí a intenzivnějším zemědělstvím dále roste poptávka po neobnovitelných zdrojích pro zemědělské zdroje a hnojiva a zvyšuje se obsah uhlíku v atmosféře [33].

## **2.2 Význam pšenice a pšeničné proteiny**

Pšenice setá má dominantní postavení v pěstování obilnin jak v České republice, tak ve světě. Od roku 2001 je v České republice pravidelně oseta na více než 700 tisíc hektarech zemědělské půdy s průměrným výnosem 5,35 t/ha.

Pšenice setá je považována za jednu z nejdéle pěstovaných obilnin. Důkazy o jejím pěstování již před 10 000 lety pocházejí z oblasti „úrodného půlměsíce“ (dnešní Irán, Irák, Sýrie a Jordánsko) [34, 35].

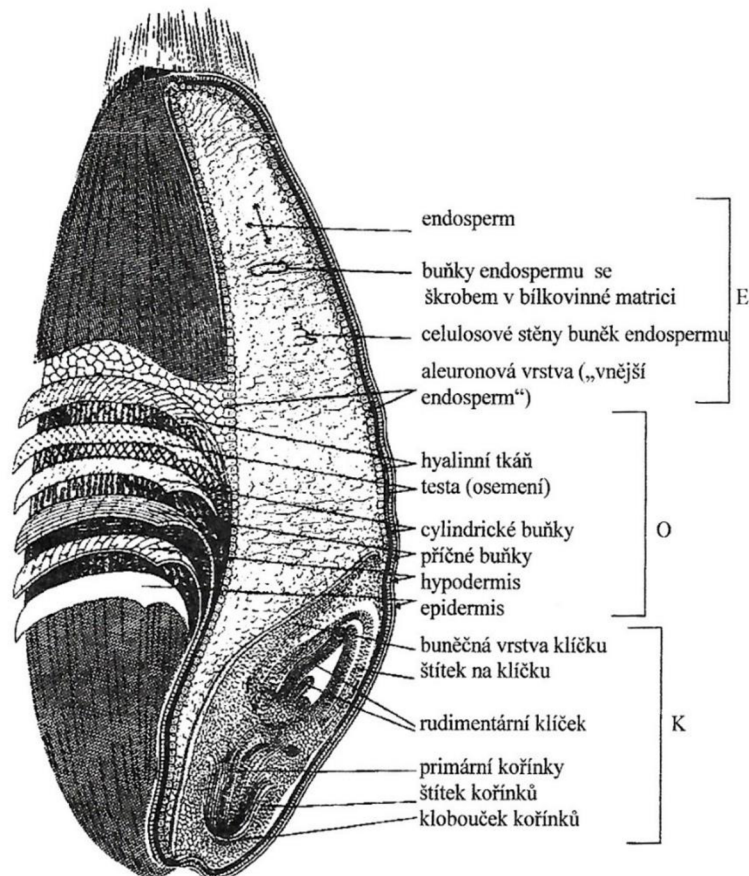
Pšeničná mouka se využívá v pekařství a pro na výrobu těstovin, zrno se dále zpracovává na kroupy a krupici. Pšeničné zrno, otruby a krmná mouka může sloužit jako krmivo. V menší míře se pšenice využívá jako surovina pro další výrobu (lív, pivo). Pšeničná stébla (sláma) se používají na podestýlku, jako krmivo nebo je možné je zaorat. [36, 37]

### **2.2.1. Morfologie pšeničného zrna**

Pšenice se řadí mezi obilniny s nahými zrny – není třeba je před zpracováním loupát a obušovat, při mlácení se uvolňuje zrno z obalů.

Pšeničné zrno je 5–8 mm dlouhé a 2,5–4,5 mm široké. Průměrná hmotnost tisíce zrn je 37 g. Rozměry a složení se mohou lišit v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách pěstování, lokalitě (zejména se jedná o srážky, osvit, teplotu a nadmořskou výšku), kvalitě půdy, hnojení [38].

Obilku (semeno obilnin) tvoří obalové vrstvy (oplodí a osemení), klíček a endosperm (obr. 2). Obalové vrstvy se v mlýnské terminologii označují otruby. Otruby tvoří přibližně 15 % hmotnosti pšenice, endosperm zaujímá přibližně 82 % hmotnosti a klíček asi 3 %. Podíly jsou velmi výrazně ovlivněny odrůdou pšenice. [38, 39]



Obr. 2 Stavba pšeničného zrna [38]

Povrchové vrstvy zrna, oplodí, slouží jako ochrana před mechanickým poškozením, chemickým poškozením a ztrátám vody. Obsahují zejména nerozpustné polysacharidy na bázi celulózy. Pod oplodím se nachází osemení, které zrna propůjčuje barvu. Hlubší vrstvy obsahují látky na bázi polysacharidů, které jsou schopny vázat vodu a umožňují bobtnání zrna. Otruby mohou být využity jako zdroj vlákniny pro úpravu výživových vlastností výrobků, zhoršují ale kvalitu a zpracovatelnost těsta. [38, 39]

Pod osemením se nachází endosperm, technologicky nejvýznamnější část zrna. Sušinu endospermu tvoří z 60–75% škrob, přibližně 10 % tvoří bílkoviny, lipidy zaujmají asi 1,5 %, zbytek tvoří minerální látky a vláknina. [40, 41]

Bílkoviny mají velký význam pro pekárenskou technologii. Vnější vrstvu endospermu tvoří velké buňky aleuronové vrstvy, která se může při mletí stát součástí jak mouky, tak otrub. Tato vrstva je velmi bohatá na bílkoviny (cca 30 %), oproti endospermu je toto množství téměř trojnásobné. Tyto bílkoviny však nemají pekařskou kvalitu endospermu, protože jejich molekuly nemají srovnatelnou velikost ani strukturu

uspořádání. Buňky tvořící aleuronovou vrstvu však obsahují velké množství minerálních látek, a proto se výrazně zvyšuje podíl minerálních látek v mouce při vymílání této vrstvy. [38, 39]

Klíček (zárodek nové rostliny) je vždy před zpracováním zrna odstraněn (procesy broušení a špicování). Klíček obsahuje vysoké množství proteinů, lipidů a minerálních látek. Právě v klíčku se vedle aleuronové vrstvy nachází nejvíce bílkovin. Klíček a aleuronová vrstva však představují jen malou část hmotnosti zrna, a proto je podíl těchto bílkovin v celkové bílkovině zrna velmi malý. Bílkoviny těchto složek se velikostí molekul a strukturou od bílkovin endospermu významně liší, což se odráží ve zpracovatelských vlastnostech.

Vzhledem k tendenci klíčku podléhat oxidačním a enzymovým změnám (obsahují vysoké množství tuků) by jeho semletí negativně ovlivnilo sensorické vlastnosti výrobku. [38, 39]

### **2.2.2. Pšeničné bílkoviny**

Bílkoviny endospermu hrají důležitou roli při zpracování pšeničného zrna. Jejich množství a složení významně ovlivňuje nutriční hodnotu zrna [42]. Tvoří přibližně 10 až 15 % pšeničného zrna. Rozdíly jsou dány odrůdou, podmínkami pěstování, kvalitou a dalšími faktory [38].

Z hlediska aminokyselinového složení se v zrně nejvíce nachází glutamin (cca 35 %). Je zdrojem vodíkových vazeb, které mají velký vliv na strukturu těsta. Dále jsou ve větší míře zastoupeny prolin a leucin, které mají také vliv na zesíťování těsta. V pšeničném zrně se naopak nachází velmi malé množství esenciální aminokyseliny lyzinu. [38, 39]

Bílkoviny pšeničného zrna lze dělit podle různých hledisek: podle morfologického původu (bílkoviny endospermu, aleuronové vrstvy a klíčku), biologické funkce (zásobní či metabolicky aktivní) nebo podle chemického složení (jednoduché bílkoviny nebo komplexní – lipoproteiny, glykoproteiny aj.).

Podle rozpustnosti v různých rozpouštědlech rozdělil Osborne v roce 1907 bílkoviny obilovin na albuminy rozpustné ve vodě, globuliny rozpustné v roztocích solí, prolaminu rozpustné v 70% ethanolu a gluteliny částečně rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad [38].

#### **2.2.2.1. Lepkové proteiny**

Lepkové proteiny mají výhradně zásobní funkci. Zahrnují prolaminu, u pšenice označované gliadiny, a gluteliny, u pšenice označované gluteniny. Jsou to vysokomolekulární sloučeniny. Gliadiny a gluteniny omezeně bobtnají a při hnětení za přítomnosti kyslíku vytváří pevný gel – lepek. Lepek dává těstu jeho tažnost, pružnost, a schopnost zadržovat vodu. Právě v jedinečném složení lepku tkví výhoda pšenice v porovnání s ostatními obilninami, např. žitem, který vytváří gely převážně z polysacharidů, a které nedosahují takových kvalit. [39]

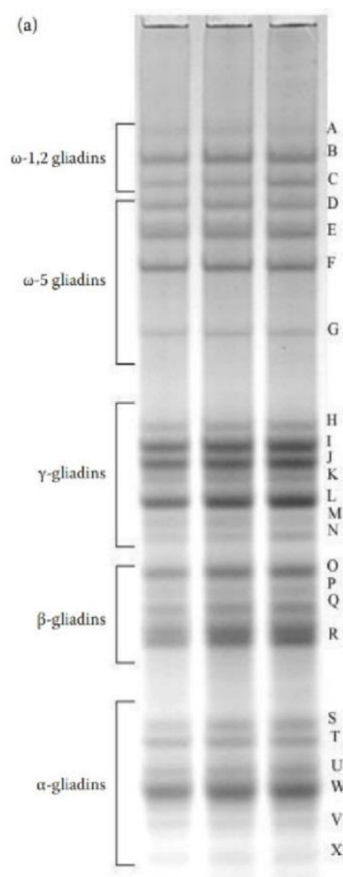
Lepek může být z těsta izolován vypráním v proudu vody. Po odplavení škrobu a látek rozpustných ve vodě vzniká tzv. mokrý lepek. Mokrý lepek se poté vymačká, případně odstředí. Takový lepek potom obsahuje cca 90 % proteinů, 8 % lipidů a 2 % sacharidů v sušině. [38]

Podle Lekeše [43] se na množství lepkových bílkovin podílí z 24 % odrůda pšenice a ze 75 % podmínky pěstování. Na kvalitě lepku má však odrůda podíl až 68 %, zatímco prostředí pouze 32 % [43].

### 2.2.2.1.1. Gliadiny

Gliadiny jsou tvořeny jedním makromolekulárním řetězcem. Tato makromolekula vytváří helixy, které jsou spojeny nepravidelnými ohyby. Strukturu helixů umožňují početné vodíkové můstky. Ohyby řetězce udržují disulfidické můstky.

Gliadiny tvoří asi 30–40 % pšeničných proteinů. Lze je rozdělit metodou gelové elektroforézy, přičemž polohy a počty frakcí jsou dány odrůdou pšenice. Gliadiny se dobře dělí v polyakrylamidovém gelu v kyselém pH (obr. 3). Podle klesající elektroforetické mobility se dělí na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadiny. [38, 44, 45]



Obr. 3 Gliadinové frakce (metoda A-PAGE) [49]

V nejmenším množství se v pšeničném lepku nacházejí  $\omega$ -gliadiny (7–13 % lepkových proteinů). Obsahují nejméně cysteinu, jsou chudé na síru, a proto se u nich nevyskytují

disulfidické vazby.  $\omega$ -gliadiny se rozdělují na  $\omega$ 1,2-gliadiny o molekulové hmotnosti přibližně 39–44 kDa a  $\omega$ 5-gliadiny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 49 až 55 kDa.

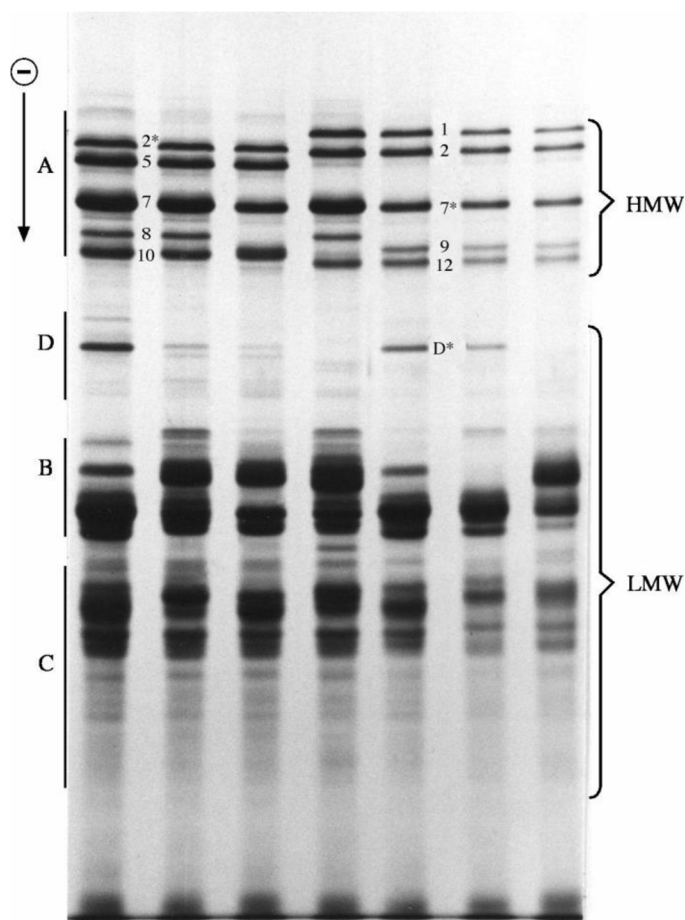
$\gamma$ -gliadiny tvoří 23–31 % lepkových proteinů.

$\alpha$ - a  $\beta$ -gliadiny vytváří tři intramolekulární disulfidové můstky. Protože mají tyto dva typy gliadinů velmi podobnou pohyblivost v elektroforetickém gelu, často se označují souhrnně jako  $\alpha$ -gliadiny. Dohromady tvoří 28–33 % lepkových bílkovin. [46, 47]

Gliadiny jsou zodpovědné zejména za viskozitu a roztažnost těsta. Jejich elastické vlastnosti jsou poměrně malé [47].

### 2.2.2.1.2. *Gluteniny*

Gluteniny jsou tvořeny makromolekulami s vysokým počtem řetězců různé velikosti. Tvoří přibližně 45 % celkových proteinů endospermu. Gluteniny lze po odstranění gliadinů rozdělit pomocí metody SDS-PAGE (obr. 4). Touto metodou byly podjednotky rozděleny na čtyři skupiny – A, B, C, D. Podjednotky A jsou tvořeny gluteniny s vysokou molekulovou hmotností, podskupiny B, C, a D gluteniny s nízkou molekulovou hmotností. [48]



Obr. 4 Gluteninové frakce (SDS-PAGE) [50]



Nízkomolekulární podjednotky LMW (Low Molecular Weight) o velikosti 30–55 kDa jsou udržovány disulfidickými a vodíkovými vazbami uvnitř řetězců, s ostatními řetězci jsou spojeny vodíkovými vazbami. Na celkové stabilitě se podílí hydrofobní síly. LMW gluteninové podjednotky tvoří asi 19–25 % lepkových bílkovin. [39, 47]

Stabilitu vysokomolekulárních podjednotek HMW (High Molecular Weight) o velikosti 100–140 kDa udržují disulfidické můstky jak uvnitř řetězců, tak mezi řetězci [45]. Disulfidické můstky vznikají mezi cysteinovými zbytky, které se nacházejí v koncových částech makromolekul, které označujeme domény. Vysokomolekulární gluteninové podjednotky mají rozhodující vliv na zvýšení objemu pečiva. V lepkových bílkovinách zaujímají cca 10–15 %.

Kromě již zmiňovaných disulfidických a vodíkových vazeb se se v gluteninech vyskytují iontové vazby mezi kyselými a bazickými skupinami aminokyselin a také van der Waalsovy vazby při přiblížení hydrofobních řetězců. [38]

Gluteniny mají vliv na pevnost i pružnost těsta. Redukční činidla způsobují rozpad gluteninových řetězců na menší části a tím narušují strukturu lepku. Oxidační činidla ji naopak stabilizují. Tyto poznatky jsou využívány v pekárenských technologiích. [39, 47]

#### **2.2.2.2. Albuminy a globuliny**

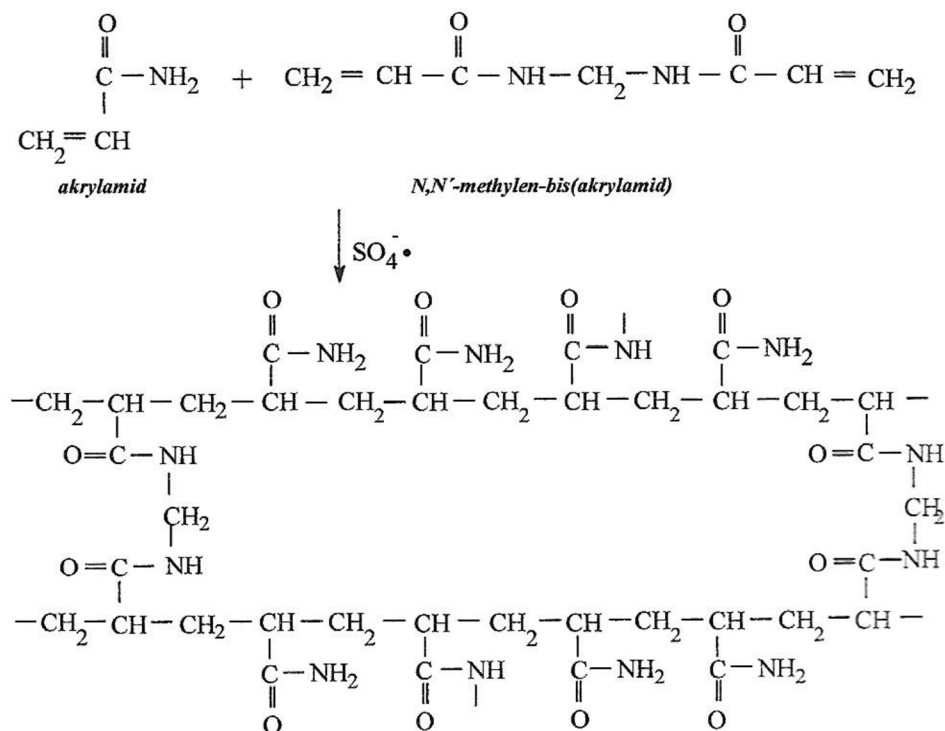
Albuminy a globuliny tvoří přibližně 20–25 % proteinů endospermu. Mají především metabolickou aktivitu. Některé albuminy (především vysokomolekulární) a globuliny mají také zásobní funkci. [45, 51]

### **2.3. Vybrané metody stanovení lepkových proteinů**

#### **2.3.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Elektroforéza je elektromigrační technika založená na rozdílné elektroforetické pohyblivosti částic a molekul v stejnosměrném elektrickém poli. Elektroforetická pohyblivost je dána nábojem a velikostí molekuly, jejím tvarem, teplotou systému a vlastnostmi matrice, přes kterou molekula migruje (porozita a viskozita). Velké molekuly mají nižší elektroforetickou mobilitu než molekuly malé. Proteiny jsou amfoterní molekuly – jejich náboj se mění v závislosti na pH prostředí, čehož se s úspěchem využívá při jejich analýze touto metodou.

Polyakrylamidový gel je průhledný, pevný, nevodivý gel, jehož vlastnosti se poměrně snadno upravují podle požadavků analýzy. Jedná se zejména hustotu, případně gradient hustoty. Vzniká polymerací akrylamidu a N,N'-metylen-bis(akrylamidu) (obr. 5). Poměrem těchto složek lze ovlivnit velikost pórů či jeho tuhost. Jako iniciátor reakce se používá peroxidisíran amonný nebo riboflavin, jako katalyzátor se používá tetramethylethylendiamin (TEMED), který volné radikály stabilizuje. Reakce je exotermní, a proto je potřeba kazety s gelem chladit, aby nedocházelo k vadám gelu. [52, 53]



Obr. 5 Tvorba polyakrylamidu [52]

Také během samotné elektroforézy dochází k vývoji tepla (tzv. Jouleovo teplo), které má negativní vliv na difuzi. Systém je proto vhodné chladit. [53]

### 2.3.1.1. A-PAGE

K separaci gliadinů se často používá elektroforéza v kyselém prostředí (acid polyacrylamide gel electrophoresis – A-PAGE). PH prostředí je obvykle 3. V tomto kyselém prostředí jsou všechny proteiny nabitě kladně a pohybují se ke katodě. Kyselý prostředí zajišťuje pufr (často roztok kyseliny octové a glycinu). Elektroforéza probíhá za nativních podmínek, sekundární a terciární struktura proteinů zůstává zachována a proteiny mohou být separovány na základě velikosti, tvaru či náboje. [54, 55] Důležitým faktorem je teplota, která ovlivňuje pKa pufrů i analytů [54].

Další složkou je močovina, která ovlivňuje elektroforetickou mobilitu zvyšováním koeficientu tření. Také ruší vodíkové vazby proteinů, čímž zvyšuje rozpustnost hydrofobních proteinů. [46, 55]

### 2.3.1.2. SDS-PAGE

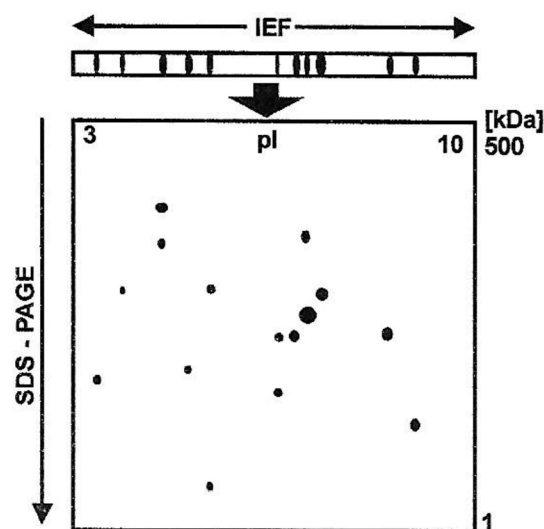
Elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) je jednou z nejčastějších metod využívaných pro separaci bílkovin. V případě lepkových bílkovin se používá spíše pro separaci gluteninů. Dodecylsírany sodný udělí všem analytům uniformní záporný náboj a bílkoviny se dále dělí pouze na základě rozdílné molekulové hmotnosti. [52, 56]

### 2.3.2. Kapilární elektroforéza

Také kapilární elektroforéza je separační metoda, v níž jsou částice separovány na základě odlišné rychlosti migrace ve stejnosměrném elektrickém poli. Probíhá v křemenných kapilárách (případně skleněných nebo plastových kapilárách) o vnitřním průměru 25–150  $\mu\text{m}$ . Na rozdíl od plošné elektroforézy není nutná přítomnost gelu. Kapiláry mají malou vodivost a generují jen malé množství tepla. To umožňuje aplikaci vyššího separačního napětí, což zkracuje dobu analýzy. Mezi hlavní výhody kapilární elektroforézy patří vysoká účinnost, malá spotřeba vzorků, vysoké rozlišení a krátký čas analýzy. Nedostatkem však je možnost adsorpce analytů na vnitřní stěnu kapiláry, která se týká právě polypeptidů a proteinů. [57, 58]

### 2.3.3. 2-D elektroforéza

2-D elektroforéza (obr. 6) je metoda, která se používá pro stanovení složení vysoce heterogenních směsí. Jedná se v podstatě o kombinaci dvou metod. Proteiny se nejprve rozdělí v gradientu pH podle izoelektrických bodů (putují do místa, jehož pH odpovídá izoelektrickému bodu proteinu), využívá se tedy metoda izoelektrické fokusace. Následně se jednotlivé zóny separují na polyakrylamidovém gelu s přidávkou SDS, které analytům udělí uniformní záporný náboj a separace proběhne na základě molekulové hmotnosti. [53, 54]

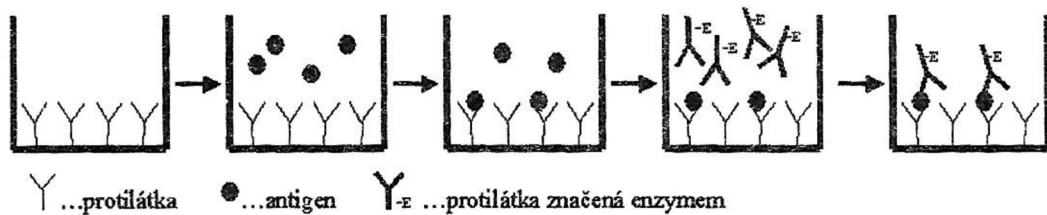


Obr. 6 Princip 2-D elektroforézy [52]

### 2.3.4. ELISA

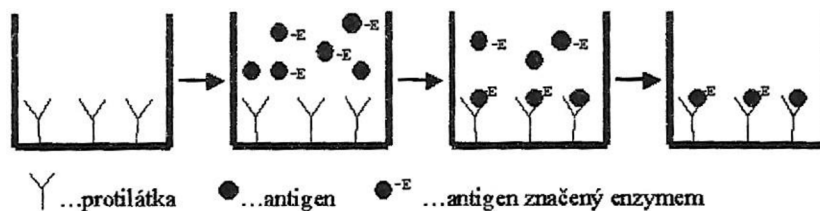
ELISA (z anglického Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) neboli enzymová imunoanalýza na pevné fázi, je moderní metoda, která se využívá pro analýzu pšeničných gliadinů.

Nekompetitivní ELISA (obr. 7) je založena na nekovalentní interakci antigenu a specifické protilátky vázané na pevný nosič. Po ustanovení rovnováhy a promytí systému se do něho přidá druhá protilátka značená enzymem. Vytváří se komplex antigen-protilátka-antigen (tzv. sendvičový komplex). Enzym poté katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt, který se nejčastěji spektrofotometricky stanoví. [46, 52]



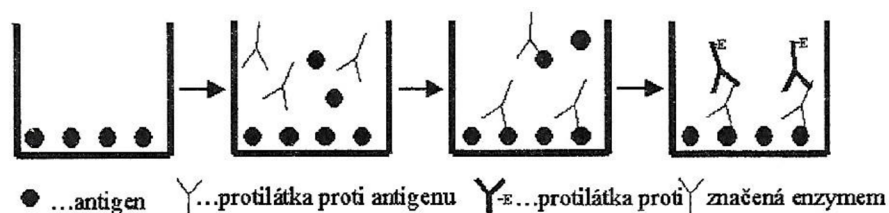
Obr. 7 Princip nekompetitivní ELISA [52]

Kompetitivní ELISA spočívá v soutěži o vazbu na protilátku mezi neznačeným antigenem ze vzorku a značeným antigenem přidaným do systému. Protilátka je přitom vázaná na pevném nosiči. Po ustanovení rovnováhy se systém promyje a poté je změřena enzymová aktivita (přímá kompetitivní metoda – obr. 8).



Obr. 8 Princip přímé kompetitivní ELISA [52]

U nepřímé kompetitivní metody (obr. 9) spolu soutěží antigen zakotvený na pevném nosiči se stanovovaným antigenem vzorku o místa na protilátce, jejichž počet je omezený. Tato protilátka se přidává do systému spolu se stanovovaným antigenem. Čím více je stanovovaného antigenu, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Po ustanovení rovnováhy a promytí se zjišťuje množství ukotvené protilátky přidáním značené protilátky. [52, 59]



Obr. 9 Princip nepřímé kompetitivní ELISA [52]

### **2.3.5. Chromatografické metody**

Při analýze pšeničných bílkovin se z chromatografických metod nejvíce používá RP–HPLC – kapalinová chromatografie na obrácených fázích, a to zejména pro analýzu gluteninů. Molekuly se separují na základě hydrofobních interakcí s ligandy stacionární fáze.

Další chromatografickou metodou, která se využívá pro separaci proteinů, je gelově permeační HPLC, případně HPLC na iontoměničích.

Tyto metody jsou poměrně nespecifické, ale podávají informace o rozdělení bílkovin do podskupin a vlastnostech těchto podskupin. Tyto metody lze také použít pro přečištění jednotlivých frakcí. [46]

### **2.3.6. Hmotnostní spektrometrie**

Ke srovnávací kontrole správnosti měření zejména imunoanalytických metod se ve výjimečných případech (hlavně z důvodu ceny a nároků na přístroje) používá metoda MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight). Principem je ionizace bílkovin dusíkovým laserem v nízkomolekulární matrici. Ionty jsou poté urychleny stejnosměrným elektrickým polem. Analyzuje se doba letu iontů v trubici k detektoru, která je úměrná poměru hmotnosti iontů vůči jejich náboji. [46, 60]

### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1. Materiál

Cílem této práce bylo sledovat a vyhodnotit vliv časného a pozdního sucha v interakci s dusíkatým hnojením na složení gliadinových frakcí lepkových bílkovin dvou odrůd pšenice ozimé – rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Vzorky pocházely z Experimentální stanice Ústavu pro výzkum globální změny v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Tato stanice se nachází v nadmořské výšce 590 m n. m. Průměrná teplota je zde 7,2 °C a průměrný roční úhrn srážek 609 mm (1981–2010) [61]. Pšenice byla pěstována v komorách se střechou propustnou pro UV záření s regulovaným zavlažováním. Srážky byly v případě simulace sucha regulovány pomocí pohyblivých střešních lamel (obr. 10). Každá komora byla rozdělena na dvě poloviny, kdy jedna byla hnojena (200 kg N/ha), druhá nikoli (obr. 11).



*Obr. 10 Experimentální stanice ekofyziologie rostlin v Domanínku [62]*



*Obr. 11 Experimentální stanice ekofyziologie rostlin v Domanínku – pohled do komory [63]*

### **3.2 Metody**

Gliadinové frakce byly separovány z mouky 2-chlorethanolem a rozděleny metodou A-PAGE podle Polišíenské et al. [64] a technické normy ČSN 46 1085-2. Kvantifikace jednotlivých frakcí byla provedena denzitometricky programem Multi Gauge verze 3.1 (FUJIFILM).

#### **3.2.1 Přístroje**

Analytické vahy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD.

Vortex – Stuart, firma MERCI

Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF

Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE

Aparatura pro vertikální elektroforezu s možností chlazení - Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA

Zdroj – Major Science MP-500P

#### **3.2.2 Chemikálie**

2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)

Pyronin Y (SIGMA ALDRICH)

Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)

Glycin (SIGMA ALDRICH)

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

N,N'-Methylenbisakrylamid (SIGMA ALDRICH)

Močovina (LACHEMA)

Kyselina askorbová (LACH-NER)  
Síran železnatý heptahydrát (LACHEMA)  
Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)  
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)  
Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)  
Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)  
Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)

### 3.2.3. Příprava roztoků

*Gelový tlumivý roztok:* K 1,0 g glycinu a 20 ml ledové kyseliny octové bylo přidáno 1 000 ml destilované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 4 °C.

*Elektrodový tlumivý roztok:* 0,8 g glycinu a 8,0 ml ledové kyseliny octové bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 2 000 ml. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C. Elektrodotový tlumivý roztok byl pro elektroforézu použit vždy pouze jednou.

*Roztok pro extrakci gliadinů:* 0,05 g pyroninu Y a 25 ml 2-chlorethanolu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 4 °C.

*0,015% roztok síranu železnatého:* 0,014 g heptahydrátu síranu železnatého bylo rozpuštěno v 5,0 ml destilované vody. Před každým použitím byl připraven čerstvý roztok.

*10% roztok peroxodisíranu amonného:* 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1,0 ml destilované vody. Před každým použitím byl připraven čerstvý roztok.

*Fixační roztok:* 100 g kyseliny trichloroctové byl kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1000 ml. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při teplotě 20°C.

*Barvicí roztok:* 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,5 g Coomassi Brilliant Blue R-250 bylo kvantitativně převedeno do baňky na 100 ml. Baňky byla doplněna po rysku ethanolem. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

### 3.2.4. Příprava vzorků

Do mikrozkušavky Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo naváženo 50 mg pšeničné mouky a přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny. Po promíchání na vortexu byl vzorek umístěn do chladničky, kde byl ponechán přes noc. Následující den byl odstředěn při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut. Odstředěný supernatant byl použit v elektroforéze. Byl uchováván v mrazničce při teplotě –18 °C.

### 3.2.5. Příprava polyakrylamidového gelu

Do kádinky s přibližně 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo přidáno 10 g akrylamidu, 0,4 g N,N'-methylenbisakrylamidu, 6,0 g močoviny a 0,1 g kyseliny



askorbové. Ke směsi bylo přidáno 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna gelovým tlumivým roztokem do objemu 100 ml. Směs byla vychlazená na 6 °C. Kazeta na elektroforézu byla také vychlazená na 6 °C. Po vychlazení směsi byl do ní přidán současně roztok peroxidisíranu amonného o objemu 0,2 ml a roztok TEMED o objemu 3 ml. Roztok byl ihned použit k naplnění gelové kazety. Poté byl do její horní části umístěn hřeben pro tvorbu prohlubně pro dávkování vzorku. Gel bylo možno použít po 1 hodině od přípravy až do následujícího dne za předpokladu, že byl uchováván v chladničce.

### **3.2.6. Elektroforéza**

Po vytažení hřebene z gelu byly vytvořené jamky promyty elektrodovým tlumivým roztokem. Gelové kazety byly umístěny do aparatury na elektroforézu. Tato aparatura byla naplněna elektrodovým tlumivým roztokem. Zdroj napájení byl připojen tak, aby probíhala separace složek od anody v horní části ke katodě ve spodní části. Nejprve běžela po dobu 60 minut elektroforéza na prázdno při napětí 80 V. Poté byly nadávkovány vzorky o objemu 5 µl. Po zapnutí probíhala elektroforéza vzorků při konstantním napětí 80 V po dvojnásobný čas než byla doba běhu barviva pyroninu Y (přibližně 240 minut). Elektroforetická aparatura byla v průběhu separace chlazená.

### **3.2.7. Fixace a vizualizace bílkovin**

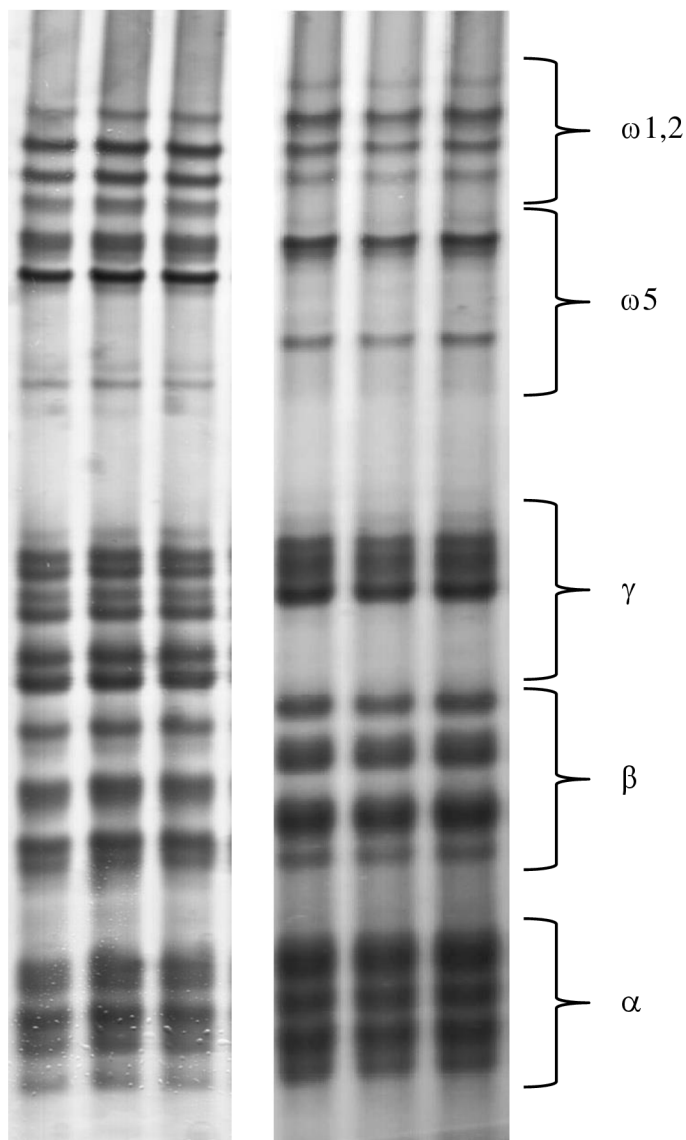
Po ukončení elektroforézy byly gely uvolněny do misek s destilovanou vodou a promyty. Poté byla destilovaná voda vylita a gely byly převrstveny směsí 300 ml fixačního a 15 ml barvicího roztoku. Misky byly poté umístěny na třepačku, kde setrvaly po dobu 24 hodin. Poté byly gely promyty vodou z vodovodu a přemístěny na sklo. Pokud nebyly ihned vyhodnoceny, byly umístěny na skleněnou podložku a zabaleny do potravinářské fólie, která je chránila proti vyschnutí, a skladovány v chladničce při teplotě 5 °C.

## **3.3. Zpracování výsledků**

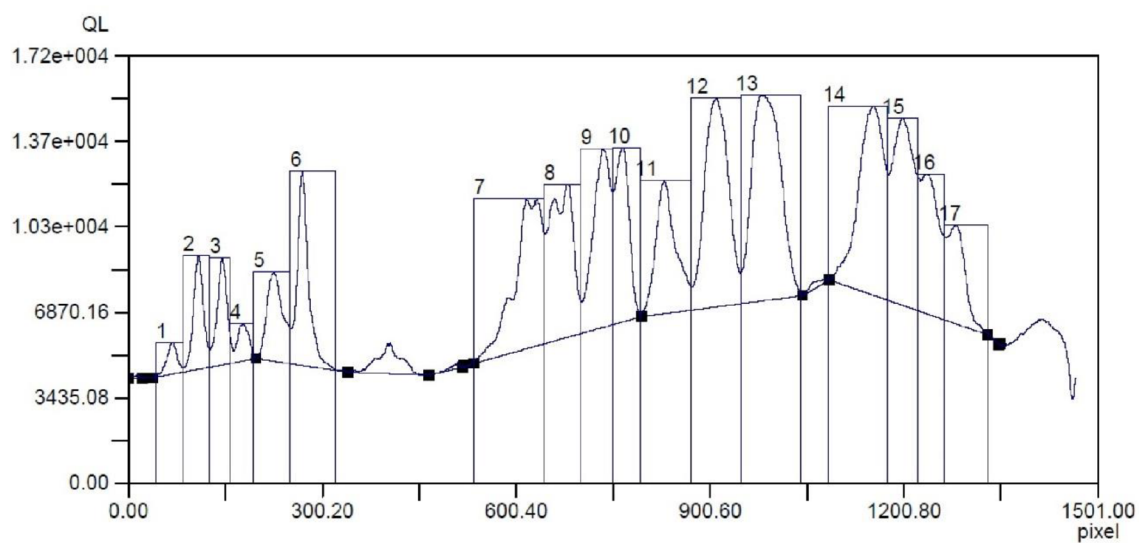
Z výsledků tří měření každého vzorku byl spočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Pro vyhodnocení vlivu sucha a hnojení na jednotlivé gliadinové frakce daných odrůd ozimé pšenice byla použita vícefaktorová analýza variance (ANOVA). Pro následné porovnání průkaznosti rozdílů byl využit Tukeyův test při hladině významnosti  $p = 0,5$ .

#### 4. VÝSLEDKY

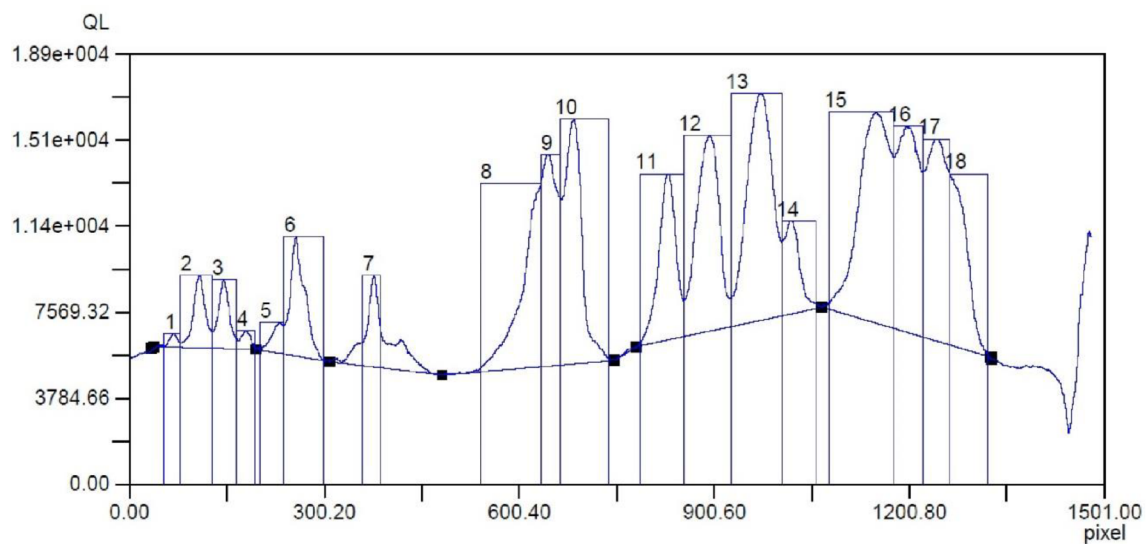
Na obrázku 12 jsou znázorněny polyakrylamidové gely získané v experimentální části práce znázorňující rozdělení gliadinových frakcí odrůd pšenice ozimé Avenue a Tobac. Gely byly převedeny prostřednictvím počítačové denzitometrie na píky (obr. 13 a 14). Plocha píků byla použita k vyhodnocení.



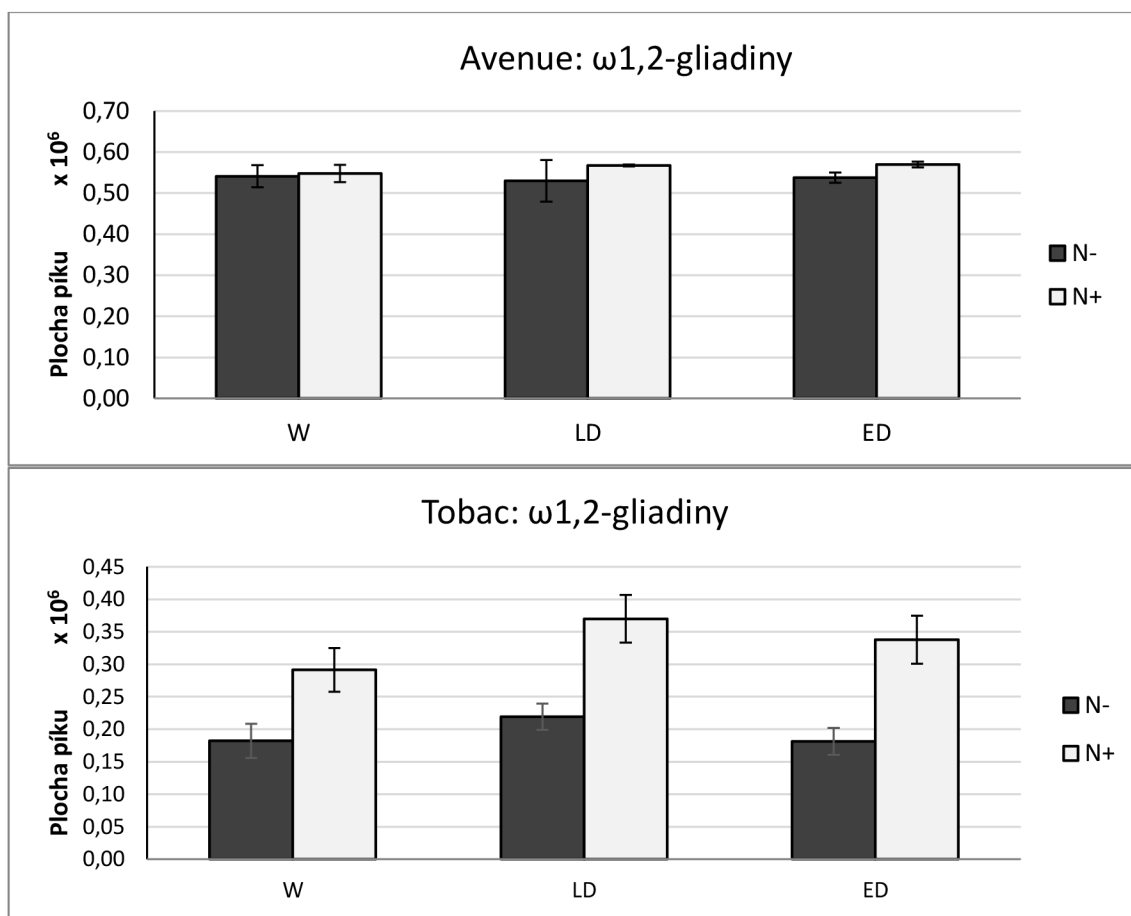
Obr. 12 Rozdělení gliadinových frakcí – Avenue (vlevo) a Tobac (vpravo) pomocí A-PAGE



Obr. 13 Ukázka elektroforeogramu odrůdy Avenue



Obr. 14 Ukázka elektroforeogramu odrůdy Tobac

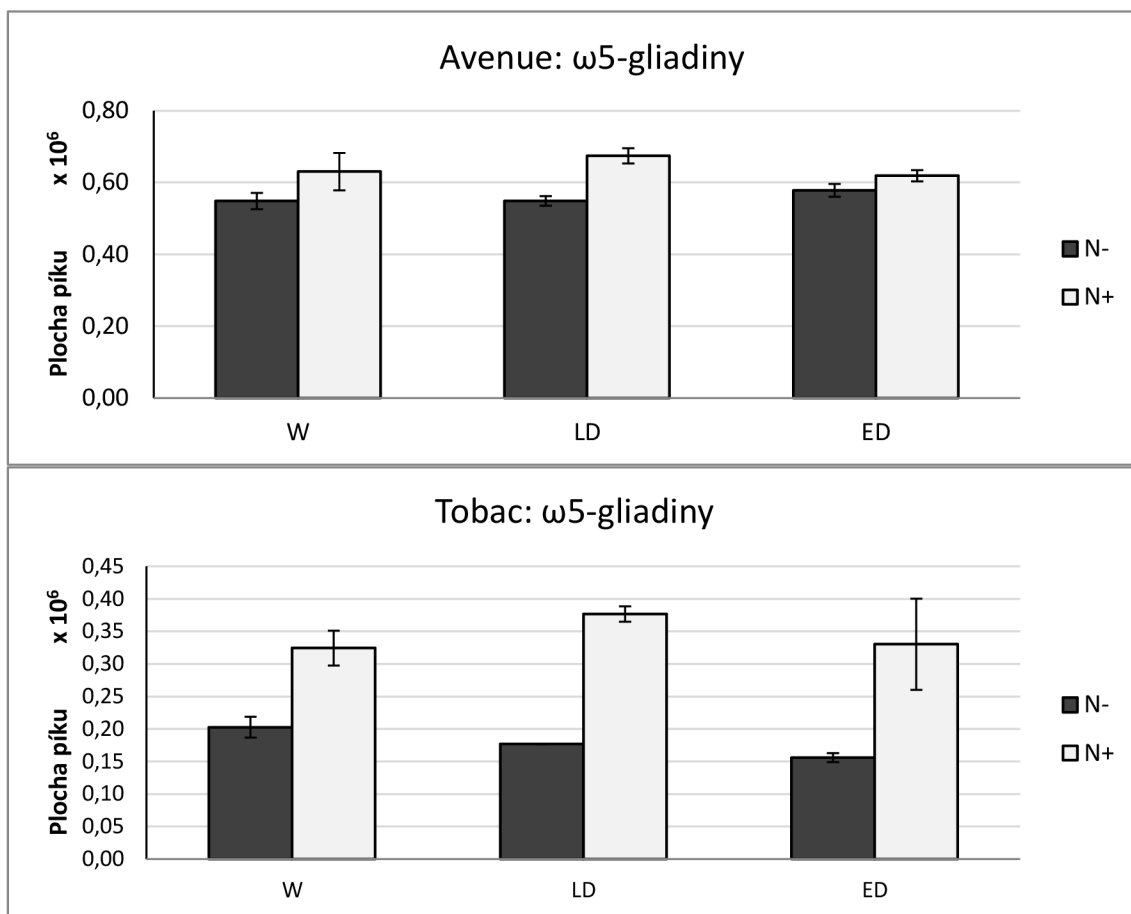


Obr. 15 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\omega$ 1,2-gliadinů pšenice ozimé rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidávkou dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 15 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\omega$ 1,2-gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U odrůdy Avenue nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu  $\omega$ 1,2-gliadinů mezi rostlinami pěstovanými za přístupu srážek a rostlinami pěstovanými v podmínkách brzkého či pozdního sucha. Rovněž, což je překvapivé, nebyly zjištěny významné rozdíly mezi hnojenou a nehnojenou variantou, v kombinaci těchto vlivů.

U hnojených rostlin odrůdy Tobac byl zjištěn významný nárůst v obsahu  $\omega$ 1,2-gliadinů oproti nehnojené variantě. U hnojených rostlin vystavených pozdnímu suchu byl pozorován nárůst o 68,8 %. Také u rostlin stresovaných brzkým suchem byl zjištěn nárůst obsahu této frakce u hnojených rostlin, a to o 86,3 % ve srovnání s rostlinami nehnojenými. Sucho nemělo na obsah této frakce významný vliv.

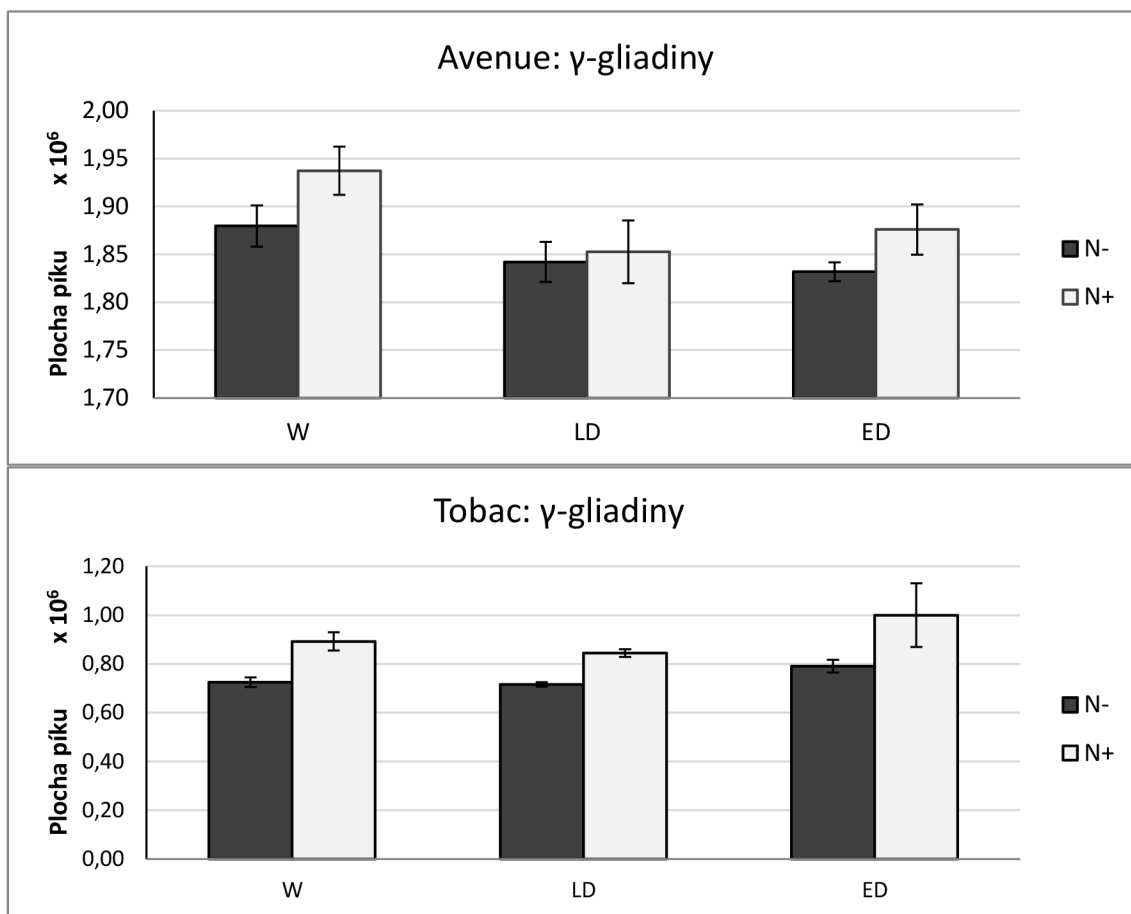


Obr. 16 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah ω5-gliadinů pšenice ozimé rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidávkou dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 16 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah ω5-gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U odrůdy Avenue byl pozorován statisticky významný rozdíl v obsahu ω5-gliadinů mezi hnojenou a nehnojenou variantou zalévané pšenice, vlivem hnojení došlo k nárůstu této frakce o 14,9 %. Dále bylo zjištěno, že u hnojených rostlin vystavených pozdnímu suchu byl obsah této frakce gliadinů o 22,8 % vyšší než u nehnojených rostlin. Sucho samotné nemělo na obsah gliadinů této frakce podstatný vliv.

U odrůdy Tobac byl pozorován nárůst obsahu ω5-gliadinů u hnojených zavlažovaných rostlin oproti nehnojeným zavlažovaným rostlinám o 59,9 %. U rostlin vystavených pozdnímu suchu byl obsah ω5-gliadinů hnojených rostlin dokonce o 113,6 % vyšší oproti rostlinám nehnojeným. Také u rostlin stresovaných brzkým suchem byl statisticky významný rozdíl mezi hnojenou a nehnojenou variantou: obsah ω5-gliadinů v případě hnojených rostlin byl o 111,9 % vyšší než u nehnojených.

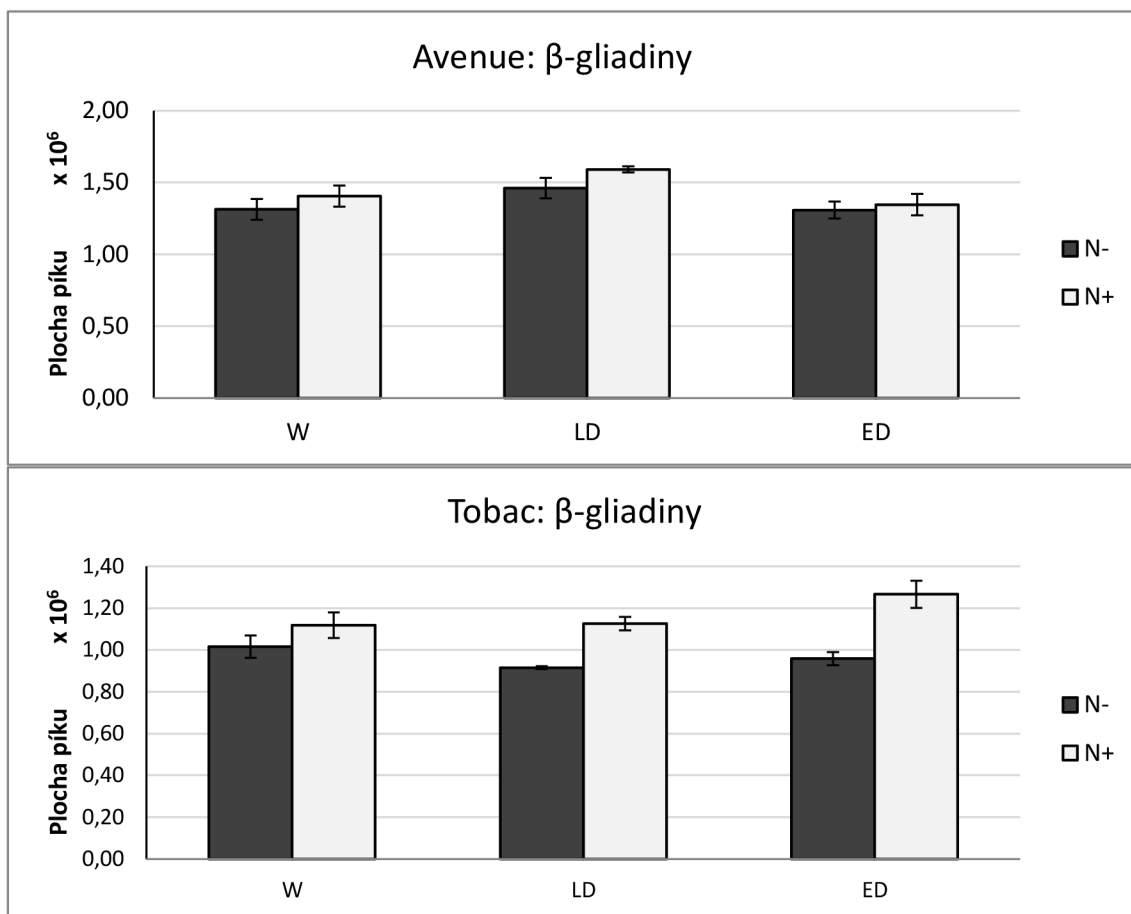


Obr. 17 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\gamma$ -gliadinů pšenice ozimé rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidávkou dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 17 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\gamma$ -gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U odrůdy pšenice Avenue nebyl pozorován vliv stresu brzkým či pozdním suchem, ani vliv hnojení na obsah  $\gamma$ -gliadinů.

U zavlažovaných rostlin odrůdy Tobac byl zjištěn nárůst  $\gamma$ -gliadinů o 22,9 % v případě hnojené varianty oproti variantě nehnojené. U hnojených rostlin vystavených pozdnímu suchu byl zjištěn nárůst této gliadinové frakce o 17,9 % oproti nehnojeným, u rostlin stresovaných brzkým suchem byl obsah  $\gamma$ -gliadinů vyšší o 26,4 % u hnojené varianty ve srovnání s variantou nehnojenou. Rozdíly v obsahu  $\gamma$ -gliadinů mezi zavlažovanými rostlinami a rostlinami stresovanými suchem nebyly pozorovány.



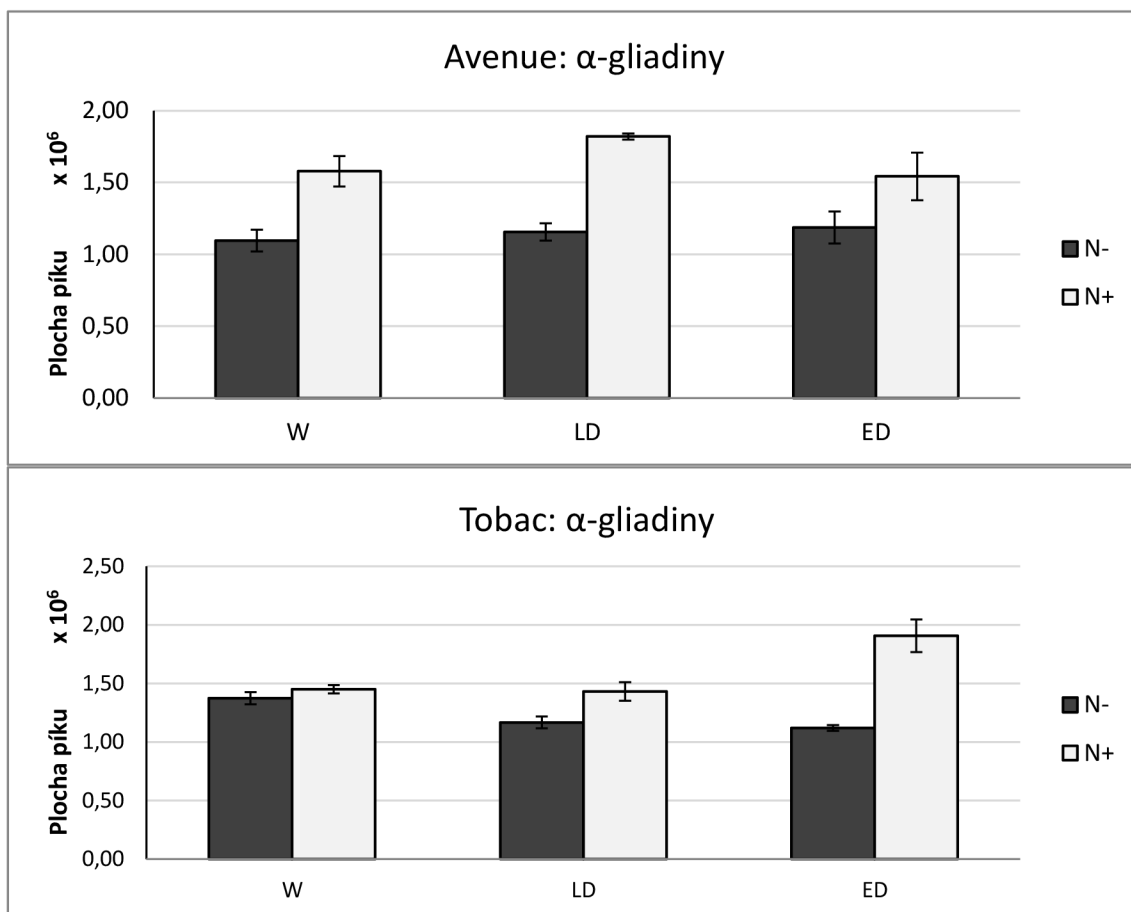
Obr. 18 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\beta$ -gliadinů pšenice ozimé rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidávkem dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 18 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\beta$ -gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U pšenice odrůdy Avenue nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v obsahu  $\beta$ -gliadinů vlivem dusíkatého hnojení, sucha ani jejich kombinace.

U odrůdy Tobac byl zjištěn nárůst obsahu  $\beta$ -gliadinů u hnojené varianty oproti nehnojené variantě u rostlin vystavených brzkému suchu o 32,1 %. Dále byl zjištěn nárůst obsahu této frakce gliadinů u hnojené varianty rostlin vystavených pozdnímu suchu o 23,0 % oproti nehnojeným rostlinám.

U hnojených rostlin můžeme pozorovat vliv brzkého sucha, kdy je obsah  $\beta$ -gliadinů o 13,2 % než u zavlažovaných rostlin a o 12,5 % u rostlin vystavených pozdnímu suchu.



Obr. 19 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\alpha$ -gliadinů pšenice ozimé rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidavkem dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 19 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah  $\alpha$ -gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U odrůdy Avenue byl v případě zavlažovaných rostlin zjištěn nárůst  $\alpha$ -gliadinů hnojené varianty o 44,0 % oproti nehnojené variantě.

Při stresu pozdním suchem byl pozorován nárůst  $\alpha$ -gliadinů hnojené varianty oproti nehnojené o 57,5 %. Při stresu brzkým suchem se navýšil obsah této frakce gliadinů u hnojených rostlin o 29,9 % oproti nehnojeným.

U hnojených rostlin se projevilo nárůst obsahu  $\alpha$ -gliadinů o 15,4 % u rostlin vystavených pozdnímu suchu oproti zalévaným rostlinám.

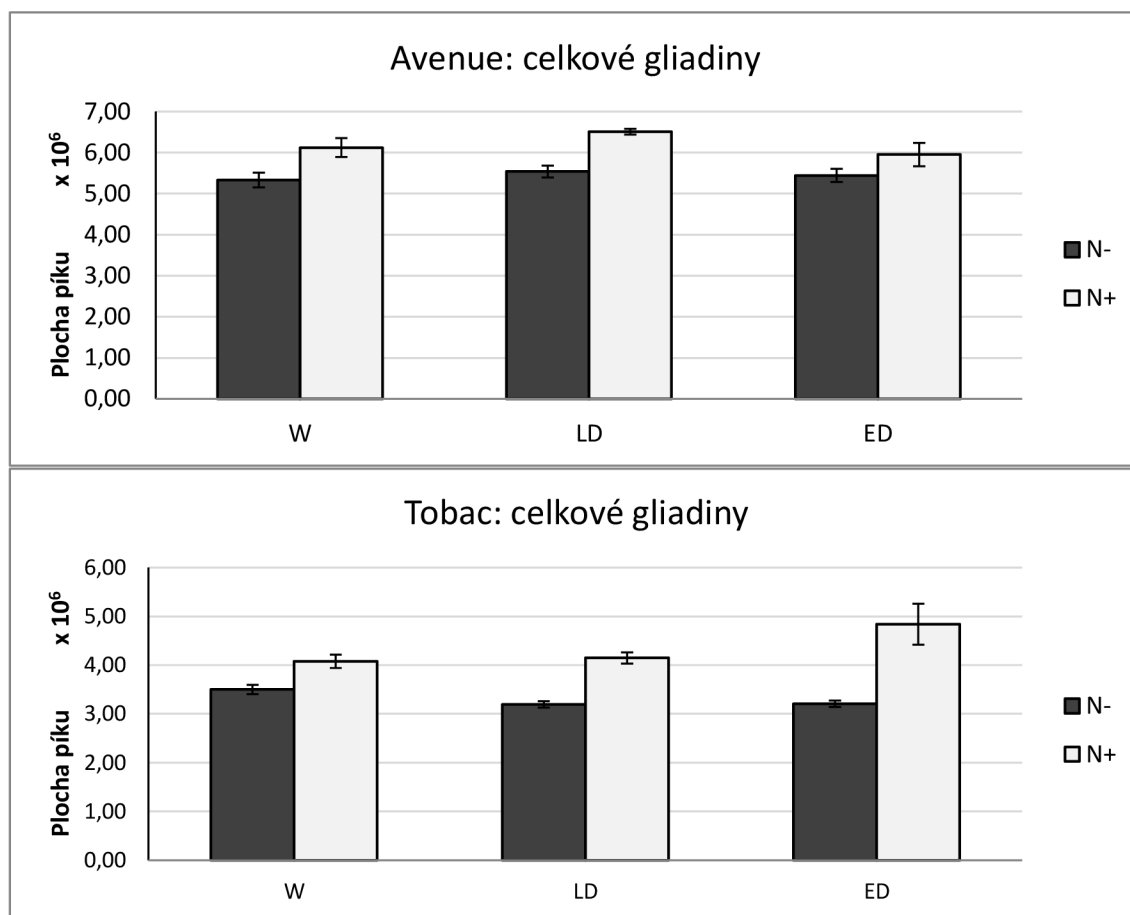
U odrůdy Tobac byl u rostlin stresovaných brzkým suchem pozorován nárůst  $\alpha$ -gliadinů u hnojené varianty o 70,2 % u varianty nehnojené.

Také byl pozorován vliv sucha u hnojených rostlin mezi rostlinami zavlažovanými a vystavenými brzkému suchu. Hnojené rostliny vystavené brzkému suchu vykazovaly o 31,4 % vyšší nárůst  $\alpha$ -gliadinů ve srovnání s hnojenými rostlinami, které byly



zavlažovány. U hnojených rostlin vystavených brzkému suchu byl výnos  $\alpha$ -gliadinů o 33,1 % vyšší než u hnojených rostlin vystavených pozdnímu suchu.

U nehnojených rostlin byl pozorován statisticky významný rozdíl v obsahu  $\alpha$ -gliadinů pouze mezi rostlinami zavlažovanými a rostlinami vystavenými brzkému suchu. Zavlažované rostliny vykazovaly o 22,61 % vyšší obsah  $\alpha$ -gliadinů než rostliny vystavené brzkému suchu.



Obr. 20 Vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah celkových gliadinů pšenice ozimé odrůdy rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Graf zobrazuje srovnání ploch píků všech variant – pěstování za přístupu srážek (W), s působením pozdního sucha (LD) a brzkého sucha (ED), s přidávkou dusíkatého hnojení (N+) a bez dusíkatého hnojení (N-). Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování.

Obrázek 20 srovnává vliv brzkého sucha, pozdního sucha a hnojení na obsah celkových gliadinů u odrůd Avenue a Tobac.

U odrůdy Avenue byl zjištěn nárůst obsahu celkových gliadinů zavlažovaných rostlin hnojené varianty o 14,8 % oproti variantě nehnojené. U rostlin vystavených pozdnímu stresu byl u hnojené varianty nárůst celkových gliadinů 17,5 % oproti variantě nehnojené.

Vliv samotného sucha se na celkových gliadinech této odrůdy neprojevil.

U odrůdy Tobac byl pozorován nárůst celkových gliadinů zavlažovaných rostlin o 16,5 % u hnojené varianty oproti variantě nehnojené. Také byl zjištěn vyšší obsah celkových gliadinů u hnojených rostlin vystavených brzkému suchu o 50,1 % oproti nehnojeným rostlinám vystaveným stejnému suchu. Hnojené rostliny vystavené pozdnímu suchu vykazovaly o 29,9 % vyšší obsah celkových gliadinů než rostliny nehnojené.

U hnojených rostlin bylo dále pozorováno zvýšení obsahu celkových gliadinů o 18,7 % u rostlin vystavených brzkému suchu oproti zalévaným rostlinám. Stejně tak došlo k nárůstu obsahu celkových gliadinů o 16,7 % u hnojených rostlin vystavených brzkému suchu oproti hnojeným rostlinám vystaveným pozdnímu suchu.

## 5. DISKUZE

Je obecně známo, že brzké sucho je více devastující u raných odrůd, protože tyto odrůdy mají tendenci předčasně dozrávat – indukuje se senescence. Naopak pozdní sucho těmto odrůdám tolik nevádí, protože mu alespoň zčásti uniknou. Kromě výnosu je ovlivněno i složení zrna. V průběhu zrání se ukládají nejprve především bílkoviny, poté hlavně škrob. Čas, kdy nastane sucho, je tedy rozhodující pro poměr těchto dvou hlavních složek zrna. Je pravděpodobné, že se mění také složení bílkovin, zejména pokud sucho nastane brzo a ovlivní tak jejich ukládání.

Tato práce měla potvrdit nebo vyvrátit tyto závěry u dvou odrůd pšenice – rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Rovněž měla sledovat, jak účinky sucha ovlivňuje dusíkaté hnojení.

Dusíkaté hnojení mělo na obě zkoumané odrůdy významný vliv. U rané odrůdy Avenue byl pozorován nárůst obsahu  $\omega$ -5,  $\alpha$ -gliadinů a celkových gliadinů. U pozdní odrůdy Tobac bylo vlivem hnojení zaznamenáno zvýšení obsahu  $\omega$ -1,2,  $\omega$ -5 gliadinů,  $\gamma$ -gliadinů a celkových gliadinů.

Vliv dusíkatého hnojení byl velmi výrazně ovlivněn interakcí se suchem. U odrůdy Avenue brzké sucho v kombinaci s hnojením mírně snížilo výnos  $\alpha$ -gliadinů oproti obsahu v zrnech rostlin, které byly pouze hnojené. Naopak pozdní sucho v kombinaci s hnojením výnosy gliadinů u odrůdy Avenue zvyšovalo – jednalo se o frakce  $\omega$ 5-,  $\alpha$ - a o celkové gliadiny. U odrůdy Tobac brzké sucho výrazně zesílilo vliv dusíkatého hnojení, a to u všech gliadinových frakcí. Kombinace dusíkatého hnojení a vlivu pozdního sucha výrazně zvýšila obsah všech gliadinových frakcí Tobacu a celkových gliadinů s výjimkou  $\alpha$ -gliadinů.

Vůbec nejvyšší nárůst gliadinů byl pozorován u  $\omega$ 5 frakce rostlin odrůdy Tobac, které byly hnojené a vystavené pozdnímu suchu (nárůst o 113,6 % proti pouze hnojeným). Jen o málo menší nárůst (o 111,9 % proti pouze hnojeným) byl pozorován opět u této frakce hnojených rostlin vystavených brzkému suchu.

Brzké sucho podle výsledků této práce v rozporu s úvodní hypotézou téměř nemělo na obsah gliadinů rané odrůdy Avenue vliv. Jedinou výjimkou byla  $\alpha$ -gliadinová frakce, u které brzké sucho v interakci s dusíkatým hnojením snižovalo jejich výnos v porovnání s rostlinami pouze hnojenými. Pozdní sucho naopak v kombinaci s dusíkatým hnojením vliv na odrůdu Avenue mělo – zvyšovalo obsah gliadinů.

V mírném rozporu s úvodní hypotézou jsou také výsledky odrůdy Tobac, kde mělo brzké sucho v interakci s dusíkatým hnojením o něco málo větší vliv na gliadiny, než pozdní sucho interagující s dusíkatým hnojením.

Především je ale v rozporu fakt, že brzké sucho se více podepsalo na obsahu gliadinů u pozdní odrůdy Tobac než u rané odrůdy Avenue. Avšak pozdní sucho se, již v souladu

s úvodní hypotézou, více projevilo u odrůdy Tobac. Celkově byla odrůda Tobac více citlivá na stres suchem.

Podle výsledků Hamříkové [65] dochází vlivem dusíkatého hnojení zvýšení koncentrace  $\omega$ 1,2-,  $\omega$ 5-,  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů. V souladu s tímto tvrzením bylo i v této práci pozorováno zvýšení obsahu  $\omega$ 5-gliadinů, dále se však závěry liší s ohledem na odrůdu – Avenue vykazovala nárůst také  $\alpha$ -gliadinů, Tobac naopak  $\omega$ 1,2-gliadinů a navíc, na rozdíl od Hamříkové, i  $\gamma$ -gliadinů.

Podle Wiesera a kol. [66] jsou k dusíkatému hnojení nejvíce senzitivní gliadinové frakce bohaté na glutamin, tedy  $\omega$ 1,2- a  $\omega$ 5-gliadiny, a méně frakce na gliadin chudé jako například  $\gamma$ -gliadiny. U odrůdy Avenue byl v souladu s tímto závěrem zvýšen podíl  $\omega$ 5-gliadinů, avšak u  $\omega$ 1,2-gliadinů nárůst obsahu pozorován nebyl. Také v souladu s prací Wiesera nebyl pozorován nárůst  $\gamma$ -gliadinů. Největší vliv však mělo, na rozdíl od výsledků Wiesera a kol. vliv dusíkaté hnojení na nárůst  $\alpha$ -gliadinů. U odrůdy Tobac byl nárůst  $\omega$ 1,2-gliadinů a  $\omega$ 5-gliadinů vlivem hnojení vůbec největší, což je v souladu s výsledky této práce. Tento vliv byl dále ještě výrazně zesílen účinky jak brzkého, tak pozdního sucha.

Práce Daniel a Triboi [67] tvrdí, že dusíkaté hnojení zvyšuje obsah  $\omega$ 1,2- a  $\omega$ 5-gliadinů a mírně snižuje obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů. Tento závěr se neshoduje s výsledky měření v této práci. U odrůdy Avenue sice byl zvýšen obsah  $\omega$ 1,2-gliadinů, ale u  $\alpha$ -gliadinů došlo v rozporu s touto prací k jejich zvýšení. U odrůdy Tobac se obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů nezměnil.

Wroblewitz a kol. [68] nezaznamenali statisticky významné zvýšení obsahu gliadinů při použití dusíkatých hnojiv a v případě  $\omega$ 5-gliadinů dokonce pozorovali pokles jejich koncentrace. Toto je zcela v rozporu s výsledky této práce, kdy mělo dusíkaté hnojení významný vliv na většinu frakcí a  $\omega$ 5-gliadiny se ukázaly k dusíkatému hnojení velmi senzitivní.

V naší práci se neprojevil vliv samotného sucha, jedinou výjimku tvoří  $\alpha$ -gliadiny odrůdy Tobac, kde brzké sucho způsobilo jejich výrazný nárůst. Tento nárůst byl ještě více zřetelný při kombinaci tohoto sucha s dusíkatým hnojením. U hnojených rostlin se brzké sucho projevilo také u  $\beta$ -gliadinů odrůdy Tobac, kde způsobilo jejich navýšení. Ačkoli se vliv samotného sucha v této práci příliš neprojevil, v interakci s dusíkatým hnojením byl jeho projev výrazný.

V odborné literatuře jsou názory na vliv sucha na gliadinové frakce poměrně nesourodé.

Podle výzkumů Altenbachové [69] a Yanga a kol. [70] se obsah  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadinových frakcí pod vlivem sucha snižuje. Podle Zörba a kol. [71] způsobuje sucho mírný nárůst  $\omega$ 1,2-gliadinů, snížení obsahu  $\gamma$ -gliadinů, na  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadiny vliv nemá. Podle výzkumů Zhanga a kol. [23] způsobuje sucho nárůst obsahu gliadinů a albuminů a pokles gluteninů a globulinů. Flagella [24] naproti tomu tvrdí, že stres suchem vliv na koncentraci gliadinů nemá. Ani s jednou z těchto prací se výsledky této práce příliš

neshodují. Snad nejbližší je tvrzení Flagelly, protože s výjimkou  $\alpha$ -gliadinů se vliv samotného sucha bez hnojení na gliadiny neprojevil.

Saint Pierre a kol. [72] ve své práci tvrdí, že koncentrace gliadinů se při stresu suchem zvyšuje za současného snížení celkového výnosu zrna. Zvýšení obsahu gliadinů u rostlin vystavených suchu v porovnání se zavlažovanými rostlinami je přisuzován přednostní tvorbě bílkovin na úkor škrobu. U zavlažovaných rostlin produkují rostliny naopak více škrobu na úkor proteinů. V této práci se samotné sucho projevilo pouze u  $\alpha$ -gliadinů, avšak v interakci s dusíkatým hnojením významně zvyšovalo obsah gliadinů, a proto lze se závěry Saint Pierra a kol. souhlasit.

Podle studie Ozturka a Aydina [73], kteří sledovali vliv sucha v různých fázích vývoje rostliny, způsobuje největší nárůst proteinů kontinuální sucho. Pozdní sucho také zvyšuje obsah proteinů v zrně. Naproti tomu brzké sucho na obsah proteinů nemělo významný vliv. Tato tvrzení jsou v rozporu s touto prací, kdy se naopak zvýšil obsah gliadinů u rostlin vystavených brzkému suchu a nikoli pozdnímu suchu.

Tomasz [74] ve své práci uvádí, že lze u odrůdy Tobac pozorovat velkou senzitivitu na stres suchem. Do jisté míry jsou výsledky této práce v souladu s tímto tvrzením, protože odrůda Tobac reagovala na sucho podstatně více než odrůda Avenue, i když především v kombinaci s dusíkatým hnojením. Thomasz dále uvádí, že největší vliv na stres suchem měla  $\alpha$ -gliadinová frakce. Také toto tvrzení je částečně v souladu s výsledky této práce, kde se u  $\alpha$ -gliadinů odrůdy Tobac projevil vliv brzkého sucha.

Chadimová [75] ve své práci pozorovala výrazný pokles koncentrace  $\omega$ 1,2- a  $\omega$ 5-gliadinů při stresu suchem. V souladu s těmito výsledky je také práce Hamříkové [65], která pozorovala snížení obsahu především  $\alpha$ -gliadinů. To je v rozporu s touto prací. V rozporu s těmito výsledky je také práce Odstrčilové [76], která zjistila nárůst všech frakcí gliadinů právě vlivem sucha. Ani s ní však výsledky této práce nekorrespondují, zvýšení bylo pozorováno pouze u  $\alpha$ -gliadinů odrůdy Tobac.

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledovat změny v obsahu gliadinových frakcí u dvou odrůd pšenice ozimé s rozdílnou délkou vegetační doby v závislosti na dusíkatém hnojení a suchu.

K výzkumu byla vybrána raná odrůda pšenice Avenue a pozdní odrůda pšenice Tobac. Vzorky pocházely z Experimentální stanice Ústavu výzkumu globální změny Akademie věd České republiky v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Rostliny byly pěstovány ve speciálních komorách propustných pro UV záření, k regulaci srážek sloužily pohyblivé střešní lamely. Polovina rostlin byla hnojena dusíkatým hnojivem o koncentraci 200 kg N/ha, polovina hnojena nebyla.

Gliadinové frakce byly separovány metodou A-PAGE podle normy ČSN 46 1085-2. Jejich obsah byl stanoven počítačovou denzitometrií, výsledky byly statisticky vyhodnoceny metodou ANOVA.

Dusíkaté hnojení a sucho měly na jednotlivé odrůdy rozdílný vliv.

Dusíkaté hnojení zvyšovalo obsah jednotlivých frakcí (u odrůdy Avenue to byly  $\omega$ 5-,  $\alpha$ -gliadiny a celkové gliadiny, u odrůdy Tobac  $\omega$ 1,2-,  $\omega$ 5-,  $\gamma$ -gliadiny a celkové gliadiny).

Vliv samotného sucha se projevil pouze u odrůdy Tobac – nárůstem obsahu  $\alpha$ -gliadinů při působení brzkého sucha.

Projev sucha, jak brzkého, tak pozdního, se však zvýraznil kombinací s dusíkatým hnojením. Tato kombinace většinou vedla ke zvýšení obsahu gliadinových frakcí, výrazněji u odrůdy Tobac. Brzké sucho v kombinaci s hnojením u této odrůdy zvýšilo všechny gliadinové frakce, pozdní sucho v této interakci mělo podobný efekt. U odrůdy Avenue došlo u  $\alpha$ -gliadinů při interakci brzkého sucha a dusíkatého hnojení ke snížení jejich obsahu, ale na další frakce nemělo brzké sucho v kombinaci s dusíkatým hnojením vliv. Pozdní sucho v interakci s dusíkatým hnojením vedlo podobně jako u odrůdy Tobac ke zvýšení obsahu gliadinových frakcí.

## 7. Literatura

- [1] Trnka, Miroslav, Zdeněk Žalud, Petr Hlavinka, Lenka Bartošová a kol. *Průvodce změnou klimatu* [online]. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.klimatickazmena.cz/cs/vse-o-klimaticke-zmene/pruvodce-zmenou-klimatu>
- [2] HONISCH, B., N. G. HEMMING, D. ARCHER, M. SIDDALL a J. F. MCMANUS. Atmospheric Carbon Dioxide Concentration Across the Mid-Pleistocene Transition. *Science*. 2009, 324(5934), 1551-1554. DOI: 10.1126/science.1171477. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171477>
- [3] JOOS, F. a R. SPAHNI. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(5), 1425-1430 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1073/pnas.0707386105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707386105>
- [4] KRÄUCHI, N. Potential impacts of a climate change on forest ecosystems. *Forest Pathology*. 1993, 23(1), 28-50. DOI: 10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x. ISSN 1437-4781. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x>
- [5] MAREK, Michal V. *Uhlik v ekosystemech České republiky v měnícím se klimatu*. 1. Praha: Academia, 2011. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [6] FORSTER, P. V. et al Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., Miller, H. L. (Eds)]. Cambridge university Press, Cambridge, United Kingdom a New York, NY, USA, p 207.
- [7] SMITH, T. M., W. P. CRAMER, R. K. DIXON, R. LEEMANS, R. P. NEILSON a A. M. SOLOMON. The Global Terrestrial Carbon Cycle. *Terrestrial Biospheric Carbon Fluxes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, **70**, 19. DOI: 10.1007/978-94-011-1982-5\_2. ISBN 978-0-7923-2502-4. Dostupné také z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1982-5\\_2](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1982-5_2)
- [8] HALLETT, John. *Climate change 2001: The scientific basis*. Edited by J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, N. Noguer, P. J. van der Linden, D. Xiaosu, K. Maskell and C. A. Johnson. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge. 2001. 881 pp. ISBN 0521 01495 6. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* [online]. 2002, **128**(581), 1038-1039 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1002/qj.200212858119. ISSN 00359009. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/qj.200212858119>

- [9] CANADELL, J. G., C. LE QUERE, M. R. RAUPACH, et al. Contributions to accelerating atmospheric CO<sub>2</sub> growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(47), 18866-18870. DOI: 10.1073/pnas.0702737104. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702737104>
- [10] Carbon Dioxide. Vital Signs – Climate Change: Vital Signs of the Planet. [online]. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/vital-signs/carbon-dioxide/>
- [11] Dopady změny klimatu – Extrémní jevy. *Klimatická změna v České Republice* [online]. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.klimatickazmena.cz/cs/vse-o-klimaticke-zmene/dopady-zmeny-klimatu-extremni-jevy/>
- [12] BLINKA, Petr: Metoda hodnocení sucha. In: *XIV. Česko-slovenská bioklimatologická konference, Lednice na Moravě 2.-4. září 2002*. Ed. Rožnovský, J., Litschmann, T. ISBN 80-85813-99-8, s. 32-44. Dostupné z: <http://www.cbks.cz/sbornik02/Blinka.pdf>
- [13] WILHITE, Donald A. Drought. NIERENBERG, W. A. *Encyclopedia of Earth System Science*. San Diego: Academic Press, 1992, s. 81-92. ISBN 0122267257. Dostupné z: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1063&context=droughtfacpub>
- [14] *Suché období 2014-2017: vyhodnocení, dopady a opatření*. Praha: Český hydrometeorologický ústav, 2018. ISBN 978-80-87577-81-3. Dostupné z: [http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/reditel/SIS/publikace/sbornik\\_Sucho\\_web.pdf](http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/reditel/SIS/publikace/sbornik_Sucho_web.pdf)
- [15] FLEXAS, Jaume, Matilde BARÓN, Josefina BOTA, et al. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandieri × V. rupestris). *Journal of Experimental Botany* [online]. 2009, **60**(8), 2361-2377 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/jxb/erp069. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erp069>
- [16] MEREWITZ, E. B., T. GIANFAGNA a B. HUANG. Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, **62**(15), 5311-5333 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1093/jxb/err166. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err166>
- [17] PINHEIRO, C. a M. M. CHAVES. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, **62**(3), 869-882 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/jxb/erq340. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erq340>



- [18] ČIAMPOROVÁ, Milada a Igor MISTRÍK. Rastlinná bunka v nepriaznivých podmienkach. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1991. 136 s. Biologické práce. ISBN 80-224-0290-7.
- [19] DING, Yong, Michael FROMM a Zoya AVRAMOVA. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature Communications* [online]. 2012, **3**(1) [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1038/ncomms1732. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms1732>
- [20] *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin ...: (sborník příspěvků)*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2013. ISBN 978-80-213-2357-5.
- [21] DARYANTO, Stefani, Lixin WANG a Pierre-André JACINTHE. Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. *Agricultural Water Management* [online]. 2017, **179**, 18-33 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1016/j.agwat.2016.04.022. ISSN 03783774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378377416301470>
- [22] BALLA, K., M. RAKSZEGI, Z. LI, F. BÉKÉS, S. BENCZE a O. VEISZ. Quality of winter wheat in relation to heat and drought shock after anthesis. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2011, **29**(No. 2), 117-128 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.17221/227/2010-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=29&firstPage=117&type=publishedArticle>
- [23] ZHANG, Yu-feng, Xiu-wen HUANG, Li-li WANG, Liu WEI, Zhi-hui WU, Ming-shan YOU a Bao-yun LI. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture*[online]. 2014, **13**(5), 919-925 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60601-2. ISSN 20953119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913606012>
- [24] FLAGELLA, Zina, Marcella M. GIULIANI, Luigia GIUZIO, Chiara VOLPI a Stefania MASCI. Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *European Journal of Agronomy* [online]. 2010, **33**(3), 197-207 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.eja.2010.05.006. ISSN 11610301. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1161030110000596>
- [25] LI, Yun-Fang, Yu WU, Nayelli HERNANDEZ-ESPINOSA a Roberto J. PEÑA. Heat and drought stress on durum wheat: Responses of genotypes, yield, and quality parameters. *Journal of Cereal Science*[online]. 2013, **57**(3), 398-404 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.01.005. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521013000118>
- [26] HAJZLEROVÁ, Pavla. *Uplatnění dusíku a síry ve výživě obilnin*. Brno, 2007. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Vedoucí práce Tomáš Lošák.

- [27] NÁTR, Lubomír. *Koncentrace CO<sub>2</sub> a rostliny*. Praha: ISV, 2000. Přírodní vědy (ISV). ISBN 80-858-6662-5.
- [28] SHUNG, E., S. HANEKLAUS a D. MURPHY. Impact of sulphur fertilisation on fertiliser nitrogen efficiency. *Sulphur in Agriculture* [online]. 1993, 1993, **1993**(17), 8-12 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Ewald\\_Schnug/publication/282609880\\_Impact\\_of\\_sulphur\\_fertilization\\_on\\_fertilizer\\_nitrogen\\_efficiency/links/5730826b08ae744151912455/Impact-of-sulphur-fertilization-on-fertilizer-nitrogen-efficiency.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/Ewald_Schnug/publication/282609880_Impact_of_sulphur_fertilization_on_fertilizer_nitrogen_efficiency/links/5730826b08ae744151912455/Impact-of-sulphur-fertilization-on-fertilizer-nitrogen-efficiency.pdf?origin=publication_detail)
- [29] HŘIVNA, L., L. HURTOVÁ a J. GÁLOVÁ. Vliv hnojení dusíkem a sírou na podíl bílkovinných frakcí pšenice ozimé. In: *Acta Universitatis agriculturae et Silviculturae Mendeliana Brunensis*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, s. 7-16. ISBN 1211-8516. Dostupné z: [https://acta.mendelu.cz/media/pdf/actaun\\_2004052040007.pdf](https://acta.mendelu.cz/media/pdf/actaun_2004052040007.pdf)
- [30] FARMER, B. H. Perspectives on the 'Green Revolution' in South Asia. *Modern Asian Studies* [online]. 1986, **20**(01) [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1017/S0026749X00013627. ISSN 0026-749X. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0026749X00013627](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0026749X00013627)
- [31] CONWAY, Gordon. *The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century*. Ithaca, N.Y.: Comstock Pub. Associates, c1998. ISBN 978-0-8014-8610-4.
- [32] SHIVA, Vandana. The Green Revolution in the Punjab. *The Ecologist*. 1991, **21**(2), 57-60. ISSN 0012-9631.
- [33] CHURCH, Norman J. *Why Our Food is So Dependent on Oil*. UK: Powerswitch, 2005. Dostupné z: <https://www.resilience.org/stories/2005-04-01/why-our-food-so-dependent-oil/>
- [34] KŘEN, Jan. *Metodika pěstování ozimých obilnin: [pšenice ozimá, ječmen ozimý, žito, tritikale]*. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 1998. ISBN 8090254527.
- [35] KONVALINA, Petr a Jan MOUDRÝ. *Pěstování pšenice seté v ekologickém zemědělství: metodika pro praxi*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2008. ISBN 9788073941314.
- [36] DIVIŠ, Jiří. *Pěstování rostlin: (učební texty pro obor provozní podnikatel a pozemkové úpravy a převody nemovitostí)*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2010. ISBN 978-80-7394-216-8.

- [37] SMUTNÝ, Vladimír, Petr VRTÍLEK, Tamara DRYŠLOVÁ a Lubomír NEUDERT. Různé technologie zpracování půdy a jejich vliv na výnos a ekonomiku pěstování ozimé pšenice v suché oblasti. In *Zborník príspevkov z 8. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou Pestovateľskej technológie a ich význam pre prax*. Piešťany: Výskumný ústav rastlinnej výroby v Piešťanoch, 2017, s. 12--16. ISBN 978-80-89417-75-9. Dostupné také z: [http://www.vurv.sk/fileadmin/CVRV/subory/Zborniky/Pestovateľske\\_technologie/Pestovateľske\\_technologie\\_2017.pdf#page=11](http://www.vurv.sk/fileadmin/CVRV/subory/Zborniky/Pestovateľske_technologie/Pestovateľske_technologie_2017.pdf#page=11)
- [38] PŘÍHODA, Josef, Marie HRUŠKOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-7080-530-7.
- [39] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-509-9.
- [40] BELDEROK, B., J. MESDAG a D. A. DONNER. *Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe*. Boston: Kluwer Academic Publishers, ©2000. ISBN 07-923-6383-3.
- [41] SHEWRY, P. R. The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. *Nutrition Bulletin* [online]. 2009, **34**(2), 225-231 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x. ISSN 14719827. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x>
- [42] PRUGAR, Jaroslav. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [43] LEKEŠ, L. Vědeckými metodami k naplňování cílů ve výrobě obilovin v 7. pětiletce. *Úroda*. 1982, **30**, 195-196. ISSN 0139-6013.
- [44] EDWARDS, W. P. *The science of bakery products*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2007. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [45] ŽILIĆ, Slađana, Miroljub BARAĆ, Mirjana PEŠIĆ, Dejan DODIG a Dragana IGNJATOVIĆ-MICIĆ. Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, **12**(9), 5878-5894 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.3390/ijms12095878. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5878>
- [46] HULÍN, Petr, Pavel DOSTÁLEK a Igor HOCHÉL. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy*. 2008, 102(5), 327-337. ISSN 0009-2770.
- [47] WIESER, Herbert. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [online]. 2007, **24**(2), 115-119 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535>

- [48] MALIK, Ali Hafeez. Nutrient uptake, transport and translocation in cereals: Influences of environment and farming conditions. *Introductory paper at the Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science (1654-3580)* [online]. Alnarp: Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Swedish University of Agricultural Sciences, 2009, **2009**, 46 [cit. 2019-04-11]. ISSN 1654-3580. Dostupné z: <https://pub.epsilon.slu.se/4083/>
- [49] DZIUBA, M., D. NAŁĘCZ, I. SZERSZUNOWICZ a J. WAGA. Proteomic analysis of wheat  $\alpha$ - and  $\beta$ -gliadins. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2014, **32**(No. 5), 437-442 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.17221/600/2013-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=32&firstPage=437&type=publishedArticle>
- [50] WRIGLEY, Colin W., Ferenc BÉKÉS a Walter BUSHUK. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACC International, c2006. ISBN 978-1-891127-51-9.
- [51] MOROT-GAUDRY, Jean-François. *Nitrogen assimilation by plants: physiological, biochemical and molecular aspects*. Enfield, N.H.: Science Publishers, 2001. ISBN 9781578081394.
- [52] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- [53] MAGDELDIN, S., ed. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.
- [54] ÖTLEŞ, Semih. *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2009. ISBN 978-1-4200-4566-6.
- [55] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular Info* [online]. 2011 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html>.
- [56] KIEFFER, R., F. SCHURER, P. KÖHLER a H. WIESER. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *Journal of Cereal Science* [online]. 2007, **45**(3), 285-292 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.09.008. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521006001627>
- [57] LAUER, Henk H. a Gerard P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Germany, **2009**; p 174. Dostupné z: [http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990\\_3777EN.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990_3777EN.pdf)

[58] VUIGNIER, Karine, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY, Pierre-Alain CARRUPT a Sophie MARTEL. Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **398**(1), 53-66 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1007/s00216-010-3737-1. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3737-1>

[59] NICOLAS, Yves, Sandra DENERY-PAPINI, Jean-Pierre MARTINANT a Yves POPINEAU. Suitability of a Competitive ELISA Using Anti-Peptide Antibodies for Determination of the Gliadin Content of Wheat Flour: Comparison with Biochemical Methods. *Food and Agricultural Immunology* [online]. 2010, **12**(1), 53-65 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1080/09540100099625. ISSN 0954-0105. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540100099625>

[60] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

[61] Experimentální pracoviště ekofyziologie rostlin Domanínek. *CZECHGLOBE – Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.* [online]. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: [http://www.czechglobe.eu/cs/pracoviste/experimentalni-pracoviste-ekofyziologie-rostlindomaninek/?fbclid=IwAR3GoVQJ4JWqPFXITNzTuLtGVvrvVTNU9wdUT\\_AutuOcvKmxkMigEVoJ7No](http://www.czechglobe.eu/cs/pracoviste/experimentalni-pracoviste-ekofyziologie-rostlindomaninek/?fbclid=IwAR3GoVQJ4JWqPFXITNzTuLtGVvrvVTNU9wdUT_AutuOcvKmxkMigEVoJ7No)

[62] Experimentální stanice ekofyziologie rostlin- Domanínek. In: *Commons.wikimedia.org* [online]. 2018 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=74184288>

[63] Pozoruhodny experiment simuluje rostlinam budouci klima. Akademie věd České republiky [online]. 2013 [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <http://www.cas.cz/sd/novinky/hlavnistranka/130709-pozoruhodny-experiment-simuluje-rostlinam-budouci-klima.html>

[64] POLIŠENSKA, Ivana, Lenka NEDOMOVA a Stanislav CUPAK. Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforezy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]. Kroměříž: Agrotest fyto, 2010, 12 s. ISBN 978-80-904594-2-7.

[65] HAMŘÍKOVÁ, D. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah proteinů gliadinové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 76 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

[66] WIESER, Herbert, Remy MANDERSCHIED, Martin ERBS a Hans-Joachim WEIGEL. Effects of Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(15), 6531-6535 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>

[67] DANIEL, C. a E. TRIBOI. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science* [online]. 2000, **32**(1), 45-56 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138>

[68] WROBLEWITZ, Stefanie, Liane HUTHER, Remy MANDERSCHIED, Hans-Joachim WEIGEL, Hermann WATZIG a Sven DANICKE. Effect of Rising Atmospheric Carbon Dioxide Concentration on the Protein Composition of Cereal Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, **62**(28), 6616-6625 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1021/jf501958a. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf501958a>

[69] ALTENBACH, Susan B. New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *Journal of Cereal Science*. 2012, **56**(1), 39-50 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.12.012. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012000124>

[70] YANG, F., A. D. JØRGENSEN, H. LI, I. SØNDERGAARD, Ch. FINNIE, B. SVENSSON, D. JIANG, B. WOLLENWEBER a S. JACOBSEN. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain. *PROTEOMICS*. 2011, vol. 11, issue 9, s. 1684-1695 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1002/pmic.201000654. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000654>

[71] ZORB, Christian, Elisabeth BECKER, Nikolaus MERKT, Stephanie KAFKA, Sarina SCHMIDT a Urs SCHMIDHALTER. Shift of grain protein composition in bread wheat under summer drought events. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2017, **180**(1), 49-55 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1002/jpln.201600367. ISSN 14368730. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.201600367>

[72] SAINT PIERRE, C., C.J. PETERSON, A.S. ROSS, J.B. OHM, M.C. VERHOEVEN, M. LARSON a B. HOEFER. Winter wheat genotypes under different levels of nitrogen and water stress: Changes in grain protein composition. *Journal of Cereal Science*. 2008, **47**(3), 407-416 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.05.007. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521007000902>

[73] OZTURK, A., F. AYDIN, Nikolaus MERKT, Stephanie KAFKA, Sarina SCHMIDT a Urs SCHMIDHALTER. Effect of Water Stress at Various Growth Stages on Some Quality Characteristics of Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2004, **190**(2), 93-99 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1046/j.1439-037X.2003.00080.x. ISSN 0931-2250. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-037X.2003.00080.x>

[74] TOMASZ, T. *Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce u čtyř odrůd pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 69 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

[75] CHADIMOVÁ, K. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a dusíkatého hnojení na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 70 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

[76] ODSTRČILOVÁ, E. *Vliv dusíkatého hnojení a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 54 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.