

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ**

**AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**MATĚJ POSPIŠ**

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav biologie rostlin**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



## **Analýza polymorfizmu DNA pšenice**

Bakalářská práce

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

*Vypracoval:*  
Matěj Pospíš

---

Brno 2015



### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Analýza polymorfizmu DNA pšenice“ 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 *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval svému vedoucímu Ing. Tomáši Vyhnánkovi Ph.D., za obětavost, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a také za odborné vedení během praktické části laboratorních pokusů při vypracovávání bakalářské práce. Děkuji Ing. Petru Martinkovi CSc. ze zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž s. r. o. za poskytnutí pokusného materiálu. Také děkuji své konzultantce Ing. Kláře Štiasne za cenné rady, které mi pomohli tuto práci zkompletovat. A v neposlední řadě bych rád poděkoval i své rodině za podporu během celého studia.

## ABSTRAKT

### Analýza polymorfizmu DNA pšenice

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je v našich podmínkách nejvýznamnější a nejrozšířenější polní obilninou. Využívá se zejména k pekařským, pečivářským a krmným účelům. Je také základním zdrojem lidské výživy. Jsou známy také genotypy, které vykazují různá zbarvení: modré, purpurové, žluté nebo bílé. Toto zbarvení je zapříčiněno přítomností antokyanů, jež mají antioxidační účinky. Jsou také známy pozitivní vlivy antioxidantů na člověka, proto jsou považovány za zdraví prospěšné. Z kolekce Agrotestu fyto Kroměříž s.r.o. byly vybrány vzorky jarní a ozimé formy pšenice s bílou obilkou (Novosibirskaja 67a Heroldo) a modrým aleuronem (UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger, 48M, Skorpion (RU 440-6), RU 440-5, Barevná 9, Barevná 25, Xiao Yian, EF 02-54/9 a H 90-15-2), z kterých po naklíčení byla izolována DNA, a takto připravené vzorky byly podrobeny analýzám založených na detekci polymorfizmu DNA na základě reakce PCR z anglického. Sledovanými znaky byly lokusy *Glu-A3* pro nízkomolekulární podjednotky gluteninů ovlivňující pekařskou kvalitu, identifikace alel zodpovědných za tvorbu puroindolinu *Pina* a *Pinb*, jež mají vliv na tvrdost obilky a detekce nulových alel *Waxy* genů jejichž exprese má vliv na kvalitu škrobu v obilce. Dosažené výsledky mohou být využity ve šlechtění pšenice.

**Klíčová slova:** *T. aestivum* L., antokyan, PCR, *Glu-A3*, purinoindolin, *Waxy* geny

## ABSTRACT

### Analysis of DNA polymorphism wheat

Common wheat is the most important and widespread agriculture plant. It is used mainly in bakery industry, or as fodder and it is the major human nutrition source. Its genotypes cause different kinds of wheat colouring: blue, purple, yellow or white. This colouring is caused by anthocyanins with antioxidant effects. The positive influence of these antioxidants on human are considered to be healthy. Summer and winter wheat samples with white caryopsis (Novosibirskaja 67 and Heroldo) and blue aleurone (UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger, 48M, Skorpion, RU 440-6, RU 440-5, Barevna 9, Barevna 25, Xiao Yian, EF 02-54/9 and H 90-15-2) were chosen for the analysis. These samples were taken from Agrofest fyto Kroměříž s.r.o collection. DNA was isolated after these samples germination and the analysis was done on the basis of DNA polymorphism based on PCR reaction. There were three observed features: Locuses *Glu-A3* for gluten low-molecular subunits which influence baking quality. The second observed feature was the allele's identification that is responsible for purinoindoline (*Pina* and *Pinb*) genes production and these genes are responsible for the caryopsis hardness. The very last of observed features were *Waxy* genes and detection of *Waxy* genes null allele. The expression of these null allele influences the starch quality in caryopsis. Final outcomes can be used in wheat breeding.

**Key words:** *T. aestivum* L., anthocyanins, PCR, *Glu-A3*, purinoindoline, *Waxy* genes

## Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍLE PRÁCE .....	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	12
3.1	Pšenice setá ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	12
3.1.1	Systematické rozdělení rodu pšenice ( <i>Triticum</i> ).....	12
3.1.2	Fylogenetický vývoj.....	13
3.1.3	Anatomická a morfologická stavba rostliny .....	14
3.1.4	Obilka pšenice.....	14
3.1.5	Chemické složení pšeničného zrna .....	16
3.1.6	Využití pšenice.....	18
3.2	Antokyany .....	19
3.2.1	Chemická stavba .....	19
3.2.2	Funkce a využití antokyanů .....	20
3.3	Barevná pšenice .....	21
3.3.1	Historie genetické determinace.....	21
3.3.2	Typy zbarvení .....	21
3.4	Markery .....	25
3.4.1	Využití DNA markerů.....	26
3.4.2	Rozdělení DNA markerů .....	26
3.4.3	Využití DNA markerů u pšenice.....	28
4	MATERIÁL A METODIKA .....	29
4.1	Experimentální materiál .....	29
4.2	Metodika .....	30
4.2.1	Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA. ....	30



4.2.2	Příprava reakčních směsí pro PCR .....	30
4.2.3	Příprava agarózového gelu.....	33
4.2.4	Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR.....	33
4.2.5	Vyhodnocení výsledků.....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
5.1	Nízkomolekulární gluteniny.....	35
5.2	Markery tvrdosti obilky.....	37
5.3	Detekce nulových alel <i>Waxy</i> genů .....	40
6	ZÁVĚR.....	43
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	45
8	SEZNAM OBRÁZKU .....	53
9	SEZNAM TABULEK .....	54

## 1 ÚVOD

Pšenice je jednou z nejdůležitějších světových plodin. Tvoří základ stravy pro více než třetinu lidstva, využívá se do krmných směsí pro hospodářská zvířata. Využití také má ve zpracovatelském průmyslu, neboť se z ní vyrábí škrob a lých. U nás je dokonce vůbec nejpěstovanější obilninou.

Dnešní doba nám přináší genotypy pšenice, které jsou odlišné svým zbarvením obilky a do popředí se dostávají díky svým nutričním vlastnostem. Takové zbarvení je determinováno purpurovým perikarpem, modrým aleuronem a žlutým endospermem či bílou obilkou. Karotenoidy jsou zodpovědné za žluté zbarvení endospermu a antokyany svou přítomností vyvolávají modré a purpurové zbarvení. Minimální či nulová přítomnost barviv je charakteristická pro bílé zbarvené obilky.

Díky obsahu antokyanů jakožto antioxidantů, mohou být barevné pšenice považovány za tzv. „funkční potravinu“. Antioxidanty působí preventivně proti chorobám vyvolaným oxidativním stresem. Sem se řadí nemoci kardiovaskulární, neurodegenerativní či některé typy rakoviny.

K predikci kvality a užitkovosti pšenice se mimo jiné využívá molekulárních markerů. Díky těmto technikám molekulární biologie, můžeme pozorovat v genotypěch alelickou variabilitu, přítomnost či nepřítomnost sledovaných genů, což má poté dopad na výběr jedinců pro křížení a selekci v potomstvu.

Cílem bakalářské práce bylo prozkoumat alelickou variabilitu LMW-GS na lokusu *Glu-A3*, determinující pekárenskou kvalitu, studium *Pina* a *Pinb* genů spojovaných s tvrdostí obilky a detekci nulových alel *Waxy* genů, jež jsou zodpovědné za tvorbu amylózy v endospermu obilky u třinácti genotypů pšenice s odlišným zbarvením obilky.

## **2 CÍLE PRÁCE**

V této práci je stanoveno několik cílů:

1. Vypracování literární rešerše na problematiku analýzy polymorfizmu DNA u pšenice se zaměřením na markery asistovanou selekci.
2. Izolace genomické DNA vybraných genotypů pšenice s modrým aleuronem.
3. Praktická aplikace metod analýzy polymorfizmu DNA založených na principu PCR.
4. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá má dominantní postavení ve struktuře obilovin i pěstovaných plodin, jelikož zaujímá 51 až 52 % orné půdy a díky relativně vysoké úrovni i stabilitě výnosů představuje produkční jistotu ve všech výrobních oblastech České Republiky (Zimolka et al., 2005).

Díky aplikaci moderních osevních postupů a pokroků ve šlechtění každoročně poskytuje kolem 55 % české produkce obilovin. Roční produkce u nás je cca kolem 4 mil. tun a ve světě 700 mil. tun, z toho 60 % se využívá ke zkrmování a 35 % je využíváno pro mlýnsko-pekárenské účely. Převáděno do čísel. V České republice zhruba o cca 1,2 mil. tuny. Nadbytky poté použijeme v nepotravinářském průmyslu, např. k výrobě lihu (Prugar et al., 2008).

#### 3.1.1 Systematické rozdělení rodu pšenice (*Triticum*)

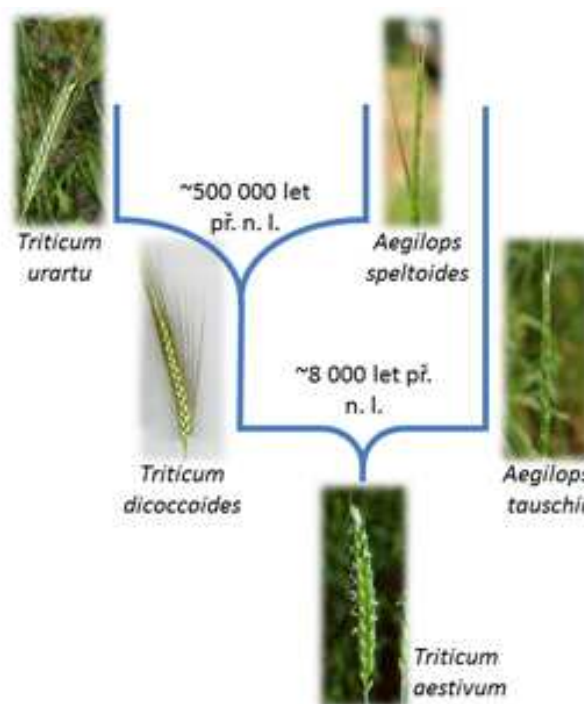
Rod pšenice řadíme do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Rozlišujeme tři podskupiny lišící se v počtu sad chromozomů. Skupina diploidní pšenice ( $2n=14$ ) zahrnuje planou formu pšenice jednozrnky (*T. boeoticum*) a kulturní formu pšenice jednozrnky (*T. monoccocum*), která má na rozdíl od plané méně rozpadavý klas. Pšenice jednozrnky mají obvykle úzký, plochý lichoklas s dvěma květy (Antonov & Grodecký, 1958). Diploidní pšenice nemají v současné době velký pěstitelský význam. Mezi tetraploidní pšenice ( $2n=28$ ) můžeme zařadit především pšenici tvrdou (*T. durum*) s nelámavým klasem, dlouhými osinami a sklovitou, neochmýřenou obilkou, která je vhodná pro výrobu těstovin. Tato pšenice je pěstována v jižních státech Evropy jako jařina. Nejvíce pěstovanou skupinou v Evropě i ve světě je skupina hexaploidní pšenice ( $2n=42$ ), a to pšenice setá (*T. aestivum*) a pšenice špalda (*T. spelta*). Nejvýznamnější pšenice setá má nelámavý, různě hustý klas, osinatý nebo bezosinný. Tato pšenice má čtyři variety – *erythrospermum*, *ferrugineum*, *milturum* a *lutescens*, které pravděpodobně vznikly ze špaldy. Pšenice špalda se začala rozšiřovat

až v posledních letech jako ozimá i jarní forma. Je využívána k výrobě těstovin, její klas je řidší, lámavější a obilky jsou pevně uzavřené v pluchách (Zimolka et al., 2005).

### 3.1.2 Fylogenetický vývoj

Jednotlivé druhy rodu *Triticum* L. jsou známy jako di-, tetra- a hexaploidy se základním chromozomálním číslem  $x=7$ . Jsou to alopolyploidy a mnoho jejich odrůd je nepostradatelných jako zemědělské plodiny, jelikož jsou zdrojem obživy pro třetinu lidstva. Známe základní čtyři genomy A, B, D, a G. Jsou aspoň z části zastoupeny ve všech odrůdách rodu *Triticum* (Goncharov et al., 2008).

Běžná pšenice (*Triticum aestivum*) je alohexaploid, neboť její genom obsahuje chromozomy  $BBA^uA^uDD$ , které byly odvozeny hybridizací mezi domestikovanou tetraploidní formou *Triticum turgidum* ssp. *diccoides* (dále jen „dvojrznka“) s genomem  $BBA^uA^u$  a diploidní *Aegilops tauschii* (DD). Předpokládá se, že dvojrznka byla odvozena hybridizací mezi dvěma divokými diploidními druhy: *Triticum urartu* (donor genomu  $A^u$ ) a možný donor genomu B se jeví jako *Aegilops speltoides* (Obr. 1) (Huang et al., 2002).



Obr. 1 Fylogeneze pšenice seté (Doležal, 2014)

### 3.1.3 Anatomická a morfologická stavba rostliny

Zárodek rostliny je uložen na hřbetní straně obilky, je krytý oplodím a osemením. V apikální části nalezneme vegetační vrchol s listy a na protilehlé straně se nachází hypokotyl se základy tří až pěti kořínků. Základem primárního kořínku je radikula, krytá čepičkou (*koleorhyzou*), která při klíčení proniká oplodím. Zároveň vznikají adventivní kořeny, také uložené v embryu. Stonek tvoří stéblo, které je duté, obvykle z pěti internodií, mezi kterými jsou kolénka. Stéblo se od báze zužuje směrem ke klasu. Z kolének vyrůstají listy, jejichž pochva objímá stéblo a částečně jej zpevňuje. Listy pšenice jsou přisedlé, tvořené čepelí a pochvou, na jejichž přechodu se nachází krátký, vroubkovaný jazýček. Po stranách listové pochvy nalezneme pár malých oušek, obvykle pokrytá trichomy. U prvních listů tvoří ouška pouze rudimenty, nejsou plně vyvinutá a u posledních listů jsou naopak zaschlá. Rostliny pšenice tvoří květenství ze složeného klasu, jehož základem je vřeteno, které má podobně jako stéblo jednotlivé články a kolénka. Na vřeteno přisedají jednotlivé klásky s dvěma až pěti kvítky a dvěma plevami (Pelikán, 1996).

Kvítky jsou chráněny z vnější strany pluchami, ze kterých může vyrůstat osina a z vnitřní strany pluškami. Otvírání kvítku pro opylení je zajištěno dvěma plenkami (lodikuly), umístěnými na spodní straně semeníku. Nezbytnou součástí květu jsou tyčinky a pestíky. Tyčinky, tvořené nitkami a prašníky vyrůstají ze semeníku. Plodem je obilka, skládající se ze tří základních částí – obaly, endosperm a embryo. Obaly jsou tvořené oplodím a osemením, pod kterým je vrstva aleuronových buněk, přiléhající k endospermu. Endospermové buňky mají nepravidelné trojúhelníkové tvary a jejich největší část tvoří škrobová zrna o různé velikosti a tvaru (Zimolka et al., 2005).

### 3.1.4 Obilka pšenice

#### 3.1.4.1 Anatomie obilky

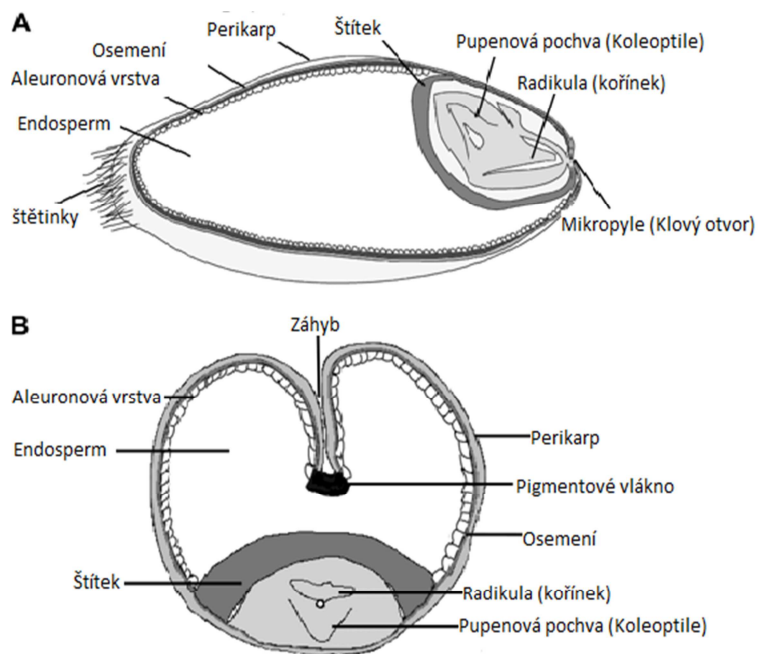
Můžeme říci, že všechny obiloviny mají stavbu obilky odlišnou. Liší se svým tvarem, velikostí či podílem zastoupení jednotlivých vrstev. Máme zrna tenká, protáhlá až skoro kulatá. Avšak pořadí vrstev je shodné. Charakteristickým znakem pro jednotlivé druhy obilovin může být, zda zrno má či nemá pluchy anebo se dá druh

určit podle tvaru zrna. Celkové rozměry zrna se pak také liší v rámci druhu v závislosti na klimatických podmínkách, odrůdě, kvalitě půdy, či lokalitě (Kadlec et al., 2002).

Endosperm v obilce zaujímá 84 - 86 % hmotnosti. Je tvořen velkými buňkami obsahujícími především škrob a bílkoviny. Oddělen od obalových vrstev je aleuronovými buňkami, obsahujícími bílkoviny, minerální látky, tuky a vitamíny. Ve fyziologii rostliny má endosperm nepostradatelnou roli při vývoji zárodku, neboť tvoří základní zdroj výživy v prvních fázích růstu, je z něj vyráběna mouka a při krmení či obživě je hlavním zdrojem sacharidů a bílkovin (Příhoda et al., 2004).

Nejmenší částí obilky je klíček. Tvoří pouze 3 % hmotnosti. Je oddělen od endospermu štítkem, který obsahuje až 33 % bílkovin. Klíček obsahuje mnoho živin, neboť musí být připraven k okamžitému vyklíčení, pokud nastanou vhodné podmínky. Obsahuje bílkoviny, monosacharidy, aminokyseliny, vitamíny skupiny B (hlavně B1) a vitamín E, který je zde zastoupen ve značné míře. Klíček obsahuje také tuk, ten je před mletím obilky na mouku odstraňován, aby v získané mouce nedocházelo k hydrolyzování tuku, neboť následkem by byla žluklá chuť, která je pro konzumenta nežádoucí (Šipláková, 2008).

Obalové vrstvy tvoří asi 8 až 14 % hmotnosti zrna. Tvoří je několik vrstev buněk, které slouží jako mechanická ochrana klíčku a endospermu. Skládají se z oplodí a osemení. Oplodí (*pericarp*) tvoří pokožka (*epidermis*), buňky podélné (*epicarp*), buňky příčné (*mesocarp*) a buňky hadicové (*endocarp*). Osemení (*perisperm*) je tvořeno vrstvou barevnou a hyalinní (skelnou). Pro lepší představu se můžeme podívat na model obilky (Obr. 2) (Příhoda et al., 2004).



Obr. 2 Model zrna pšenice ukazující primární strukturu obilky (A) longitudinální řez, (B) transverzální řez (upraveno dle Rathjen et al., 2009)

### 3.1.5 Chemické složení pšeničného zrna

Obecně můžeme rozdělit složení pšeničného zrna do několika oddílů a to sice: sacharidy, lipidy vitamíny, minerální látky a bílkoviny.

#### *Sacharidy*

Jsou organické sloučeniny patřící do skupiny polyhydroxyderivátů karboxylových kyselin. Tvoří nejpodstatnější podíl pšeničného zrna (50 – 70 %) a patří sem především polysacharidy škrob, hemicelulosa, celulosa, pentozany, a také sacharidy jako součásti komplexů s lipidy a bílkovinami – glykolipidy a glykoproteiny. Škrob se skládá z amylopektinů a z amyloz s přímým řetězcem glukózových zbytků. Pšeničná škrobová zrna tvoří dvě frakce, větší a menší. Nazýváme je „prima“ a „sekunda“ (Prugar et al., 2008).

Větší části „prima“ mají velikost 10-15  $\mu\text{m}$  a malé části „sekunda“ mají velikost menší jak 10-15  $\mu\text{m}$ . Tyto menší části jsou vázány na bílkovinnou matici a jsou proto hůře oddělitelné, tím snižují kvalitu lepku a výtěžnost škrobu (Cornell et al., 1994).



## ***Lipidy***

V obilce jsou zastoupeny 1,5 – 3,0 %. Tvořeny jsou jednak vlastními tuky, složenými z kyseliny linolové a olejové a také fosfatidy, obsahujícími kyselinu fosforečnou a dusíkatou bázi. Největší podíl lipidů je směřován do klíčkové části obilky. A i když je podíl lipidů v obilce malý, nelze ho přehlížet, či podceňovat, neboť mají význam pro skladování obilí a mouky. Díky štěpení fosfatidů se uvolňuje kyselina fosforečná a mastné kyseliny, což má za následek zvyšování kyselosti. Oxidační procesy pak zapříčiňují zhoršení sensorické kvality, díky žluknutí. Také se uplatňují v biochemických procesech během kynutí a pečení (Prugar et al., 2008).

## ***Vitamíny***

Nízkomolekulární sloučeniny, které jsou nepostradatelné pro život u všech vyšších organismů, kde mají nezastupitelnou funkci katalyzátorů v biochemických reakcích. V obilce se vyskytují vitamíny nezbytné pro lidský organismus i organismus hospodářských zvířat. Hromaděny jsou především v klíčku a v aleuronové vrstvě obilky. Avšak mlýnským zpracováním tyto části přechází do otrub a tmavých krmných mouk, jsou mouky světlé ochuzeny o tento vitamínový podíl. Podle mletí pak úbytek činní až polovinu původního obsahu v zrně (Prugar et al., 2008).

## ***Minerální látky***

V závislosti na odrůdě, půdě či podmínkách v průběhu vegetace se obsah minerálních látek v obilce nejčastěji pohybuje v rozsahu 1,4 – 3,0 %. Zahrnujeme sem minerální prvky jako fosfor, draslík, síru, hořčík, vápník, sodík, železo, mangan, zinek, bór, měď. Největší zastoupení můžeme pozorovat v klíčku a obalových vrstvách obilky. Proto nám stupeň vymletí snižuje obsah těchto prvků v mouce. Obecně platí, že čím je mouka světlejší, tím je tato bilance horší (Šárka & Bubník, 2010).

## ***Bílkoviny***

Vysokomolekulární přírodní sloučeniny tvořeny aminokyselinami, mají v obilce největší význam hned z několika hledisek. To první je vliv na technologickou kvalitu mouky a druhé je nutriční a krmná hodnota. Množství v sušině kolísá od 8 do 20 %. V průměrném roce se pak tyto hodnoty pohybují v rozpětí 12 – 13 % (Šárka & Bubník, 2010).

Z hlediska technologické kvality pšenice je podstatná bílkovina lepek. Díky své chemické struktuře bílkoviny mezi bílkoviny nerozpustné ve vodě. Řadíme sem gliadin a glutenin. Glutenin způsobuje pružnost a bobtnavost lepku, gliadin zase jeho tažnost. Tvoří trojrozměrnou síť peptidových řetězců propojenou navzájem různými můstky a vazbami (Kučerová, 2004).

### **3.1.6 Využití pšenice**

Pšenice je dlouhá léta zdrojem obživy a tak je logické, že její využití známe v pečivářenském, pekářenském či krmném průmyslu. U pekařské kvality hraje největší význam obsah a kvalita lepku a také škrob. Dále také to jsou pentozany (polysacharidy zvyšující viskozitu těsta). Jsou obsaženy spolu s celulosou ve vláknině. Také nesmíme opomenout enzymy. Některé totiž ( $\alpha$ -amyláza) v nesklizeném porostu, štěpí škrob na jednodušší cukry, což má pak za následek snížení kvality pečiva (je ploché) (Both & Chloupek, 2005).

Aby mohla být vhodně využita v daném průmyslu, musí mít požadovanou kvalitu, neboli skupiny jakosti (Zimolka et al., 2000):

- E – elitní pšenice (nejkvalitnější),
- A – kvalitní pšenice,
- B – chlebová pšenice,
- C – všechny odrůdy nevhodně pro tvorbu kynutého těsta, pšenice vhodné pro výrobu sušenek, či pro výrobu škrobu a lihu.

#### **3.1.6.1 Kvalita pšenice**

Kvalita neboli jakost je termín, kterým hodnotíme stupeň potřeb, které má daná odrůda splňovat proti standardu. Je to hodnota poměrná, ne absolutní a je třeba v ní zohledňovat různé požadavky zpracovatelů. K rozlišení stupňů jakosti využívají Both & Chloupek (2005) různá kritéria:

1. Hygienické – zdravotní závadnost či nezávadnost osiva.
2. Nutriční – toto kritérium nám říká, do jaké míry splňuje dané osivo výživové doporučení z hlediska nutriční kvality.
3. Senzorické - určuje se základními smysly (vzhled, křupavost).
4. Technologické - kritérium, velmi důležité pro zpracovatele, neboť má vliv na náklady a konečnou cenu. Můžeme zde rozdělit na dva aspekty:
  - a) obsah účinné látky,
  - b) zpracovatelnost.
5. Užité – jakým směrem a způsobem produkt využijeme, trvanlivost, rychlá příprava.

## **3.2 Antokyany**

Antokyany jsou přírodní pigmenty rozpustné ve vodě, které patří mezi nejdůležitější skupinu pigmentů v rostlinách. Jsou přítomny v ovoci, zelenině, květech a dalších nadzemních orgánech rostlin. Způsobují červené, fialové až modré zbarvení květů, plodů a jiných částí rostlin (Chabinová et al., 2011).

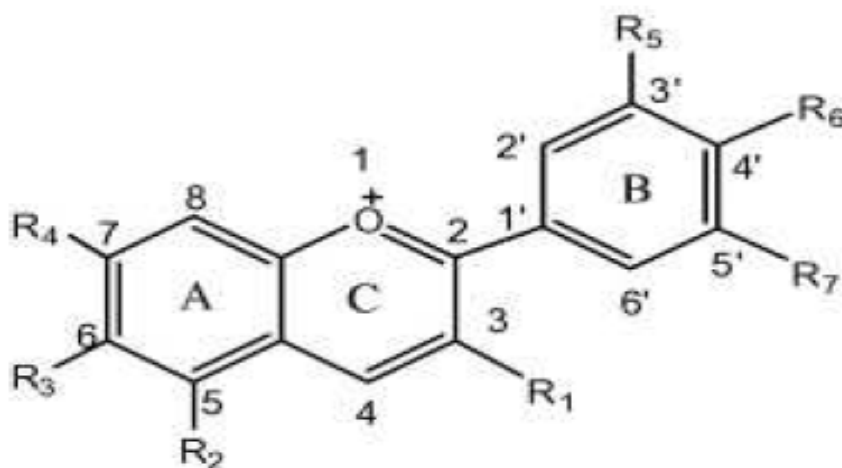
V dnešní době jsou stále více a více středem zájmu široké společnosti. Pro jejich nutriční vlastnosti se o ně zajímají vědci, či šlechtitelé rostlin. Během posledních deseti let zájem o antokyany vzrostl po té, co se objevily široké možnosti jejich využití. Ať už jako přírodní barviva, alternativy pro dobarvování pokrmů, a v neposlední řadě pro jejich antioxidační účinky (He & Giusti, 2010).

### **3.2.1 Chemická stavba**

Z pohledu chemické stavby, jsou tyto látky odvozeny od 2-fenylbenzopyranu (flavanu), přesněji 2-fenylbenzopyrilyového (flavyliového) ionu, jehož strukturu si můžeme prohlédnout na obrázku 3. Tato struktura je aglykonová (necukerná) a označuje se jako antokyanidin. Je známo, že tento antokyanidin je součástí glykosidů, které obsahují jeden či více sacharidů. Díky hydroxylovým skupinám na aromatických

jádrech jsou tyto látky dobře rozpustné ve vodě, etanolu či metanolu (Delgado-Vargas et al., 2000).

Nejčastěji zastoupené sacharidy, které se vyskytují v antokyanech jsou xylóza, arabinóza, ramnóza, glukóza, galaktóza (Escribano-Bailón et al., 2004).



Obr. 3 Struktura antokyanidinu.  $R_1 - R_7$ : podle navázání glykosidu místo hydroxylové či methoxylové skupiny odvozen typ anthokyanidinu (Castañeda-Ovando et al., 2008)

### 3.2.2 Funkce a využití antokyanů

Antokyaniny v rostlinách zastávají shodné funkce jako flavonoidy. Fungují např. jako biologická ochrana (kyanidin-3-glukosid), antioxidanty či ochrana pletiv před přílišným slunečním světlem. Významnou roli hrají také při reprodukci rostlin, neboť lákavým zbarvením orgánů (květů, plodů a semen), lákají opylovače, či jiné šířitele semen. Také bylo pozorováno, že kyanidin-3-glukosid inhibuje růst larev motýlů (*Heliothis virescens*), kteří napadají listy rostliny tabáku (Tsuda et al., 1998).

Pro člověka je nejzajímavější jejich antioxidační aktivita, neboť po konzumaci hrají antokyaniny důležitou roli při prevenci kardiovaskulárních a nádorových onemocnění člověka (Konczak & Zhang, 2004; Castañeda-Ovando et al., 2008).

V minulosti se prokázala jejich schopnost vázat těžké kovy, jako je železo, zinek a měď. Působí též jako induktory enzymů glutation – S – transferázy (GST) a superoxid dismutázy (Hosseinian et al., 2008).

### 3.3 Barevná pšenice

Nejběžnějším zbarvením pšenice seté (*Triticum aestivum*,  $2n = 6x = 42$ , BBAADD), je červené zbarvení, ale jsou známy i jiné genotypy nesoucí rozdílné znaky barevnosti. Například modré, purpurové, či bílé. Takové zbarvení zapříčiňují antokyany, přírodní pigmenty (Trojan et al., 2010).

#### 3.3.1 Historie genetické determinace

Prvním, kdo popsal fialově zbarvené odrůdy, byl v roce 1879 Ludwig Witmack. Avšak pár let před tím (1872/1873) Johan Maria Hildebrandt na svých cestách po východní Africe vytvořil kolekci semen divokých odrůd barevné pšenice, kterou poté celou předal muzeu zemědělství v Berlíně. Během dalších let pak došlo ke křížení druhů, kdy z tetraploidních odrůd, které obsahovaly fialový perikarp (druh přivezen z Etiopie) byly vyšlechtěny hexaploidní odrůdy pekařské pšenice. Modře zbarvené odrůdy se vyvinuly v první polovině 20. století mezidruhovým křížením mezi pšenicí a jejími příbuznými. Původně se tato křížení prováděla za účelem přenosu genů pro odolnost vůči nemocem, zimě či lepšímu výnosu (Zeven, 1991).

V současnosti se studie těchto barevných odrůd zaměřují na zvýšení obsahu anthokyanů v obilce kombinováním odlišných fialových (perikarp) a modrých (aleurón) genotypů (Jaafar et al., 2013).

#### 3.3.2 Typy zbarvení

Jak už bylo dříve zmíněno, v dnešní době máme různé genotypy pšenice (*Triticum aestivum*) odlišující se zbarvením obilky.

### 3.3.2.1 Žluté zbarvení zrna

V současné době (od roku 2011) máme na našem trhu registrovány dvě odrůdy se žlutým zbarvením endospermu zrna.

Mluvíme zde o ozimé odrůdě Citrus a jarní odrůdě Luteus, jejichž autorem je prof. Dr. Wilhelm Jahn – Deesbach, německý profesor pocházející z Giessenu. Odrůdy jako takové se příliš neliší od červenozrnných odrůd. Liší se pouze žlutě zbarveným endospermem (Martinek & Vyhnánek, 2014).

### 3.3.2.2 Purpurové zbarvení zrna

Purpurové zbarvení perikarpu zrna (Obr. 4) pochází z tetraploidní pšenice *T. turgidum*, která pochází z Abisské oblasti nacházející se v Etiopii. Geny pro toto zbarvení se nazývají *Pp* (*purple pericarp*). Tyto geny byly lokalizovány pro australskou odrůdu Purple Feed na 7B (*Pp1*) a na 6A (*Pp2*) dále pak geny z kanadské Purple na 7B (*Pp1*) a 2A (*Pp3*) (Arbuzova et al., 1998; Arbuzova & Maystrenko, 2000).

Jak už bylo zmíněno, většina antokyanů se nachází v perikarpu zrna, díky tomu mají otruby vyšší průměrný obsah antokyanů ( $251 \text{ mg kg}^{-1}$ ) než v celozrnném šrotu ( $101 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Abdel-Aal & Hucl, 1999).



Obr. 4 Purpurová pšenice s vysokým obsahem antioxidantů (Rückschloss et al., 2011)

### 3.3.2.3 Modré zbarvení zrna

Za modré zbarvení aleuronové vrstvy jsou zodpovědné geny *Ba* (blue aleurone). Je nutno dodat, že toto zbarvení se do pšenice dostalo pomocí více donorů. Dle katalogu genetických symbolů pšenice rozlišujeme dva geny *Ba1* a *Ba2*. *Ba1*, který byl lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 4B na translokovaném segmentu přeneseném do pšenice z *Elytrigia pontica* (Qualset et al., 1983) a vyskytuje se u jarní pšenice UC66049. *Ba2* který pochází z pšenice (*Triticum boeoticum* Boiss.) (Martinek & Vyhnánek, 2014) leží na chromozomu 4AL (Dubcovsky et al., 1996). Pro studium a určení těchto translokací na chromozomu jsou nejvhodnějšími metodami FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a GISH (genomická *in situ* hybridizace) (Zheng et al., 2006).

Miroslav Škorpík je jméno nejvíce skloňované spolu s modrozrnnou pšenicí u nás. Popsal nové modrozrnné variety *T. spelta* var. mostovoy Škorpík, *T. spelta* var. *cyanospermum* Škorpík, *T. aestivum* L. var. *rodianum* Škorpík a *T. aestivum* L. var. *kovacikianum* Škorpík (Škorpík & Šašek, 1980). Dále svým dlouholetým výzkumem ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i., v Praze – Ruzyni vyšlechtil ozimou odrůdu pšenice s názvem Skorpion (Obr. 5). Ta v roce 2011 prošla registračními zkouškami v Rakousku a byla zapsána do Evropského katalogu odrůd (Martinek & Vyhnánek, 2014).

Pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) byly u modrozrnných pšenic zjištěny čtyři hlavní druhy antokyanů: delfinidin-3-glukosid (45 %), kyanidin-3-glukosid (28 %), delfinidin-3-rutinosid (22 %) a kyanidin-3-rutinosid (2 %). U těchto sloučenin je známa přirozená antioxidační aktivita (Abdel-Aal et al., 2008).

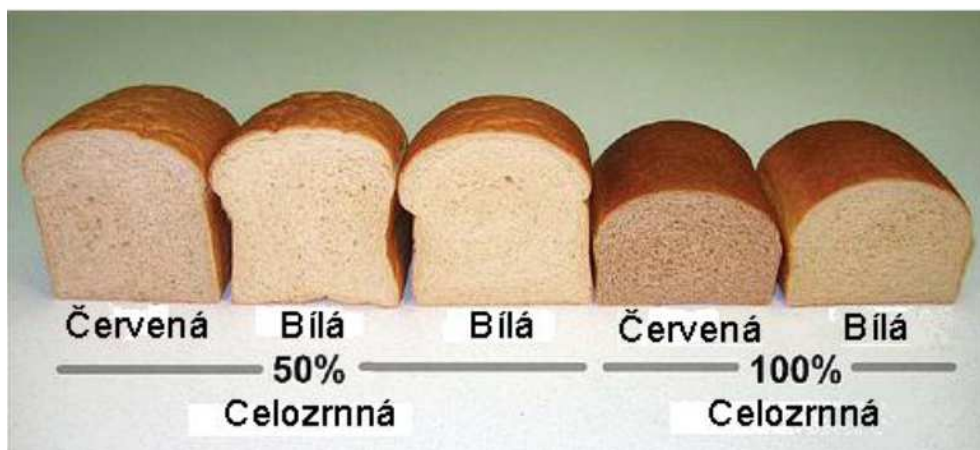


Obr. 5 Zrno modré pšenice (Rückschloss et al., 2011)

#### **3.3.2.4 Bílé zbarvení zrna**

Toto zbarvení je řízeno sestavou recesivních alel *r-A1*, *r-B1* a *r-D1*. Je také známo, že tento genotyp má nižší obsah fenolických látek, které mají hořkou příchuť. Dále zde není přítomna polyfenol oxidáza, která je u odrůd červené pšenice uložena v povrchových vrstvách zrna. To v konečném důsledku způsobuje vyšší výmelnost mouky, díky čemuž finální produkt může obsahovat více vlákniny, minerálů a proteinů. Absence fenolických látek je kladným efektem, protože produkt je přirozeně sladší, což by mohlo mít význam v cukrářství. Tyto odrůdy jsou více rozšířeny do suchých oblastí. V České republice máme registrovanou zatím jedinou odrůdu Heroldo. Bohužel je více náchylná k prorůstání, což může být jedním z důvodů, proč u nás není moc rozšířená (Martinek et al., 2006). Na obrázku 6 je znatelný rozdíl v barvě bochníků chleba upečených z mouky bílé a červené pšenice.





Obr. 6 Chleba upečený z celozrnné mouky červené a bílé pšenice (převzato z Podhorná, 2010)

### 3.4 Markery

Markery jsou obecně používány při studiu genetické variability. Umožňují nám pozorovat alely, které jsou přítomny ve sledovaném vzorku. První, kdo použil tyto metody, byl J. G. Mendel při svých pokusech na hrachu. Využil zde tzv. morfologických markerů jako je např. barva semen či květů u hrachu. U ječmene pak barvu aleuronu, délku osiny, víceřadost apod. Avšak morfologické markery mají jen omezené varianty fenotypů a proto nemohou odhalit požadovanou genetickou variabilitu, jako markery DNA (Klumpler, 2006).

Počátkem 60. let 20. století došlo k objevení allozymového polymorfismu, jinak řečeno izoenzymových markerů. Izoenzymy, nazýváme různé formy téhož enzymu. Jejich funkcí je katalyzování stejné chemické reakce, ale důsledkem odlišného pořadí aminokyselin se jejich primární struktura liší některou ze svých vlastností (nábojem, konformací atd.). Díky této rozdílné primární struktuře můžeme pozorovat na elektroforéze různě rychlou migraci v gelu. A i když tato metoda odhaluje jen kódující úseky genomu, byl díky ní vytvořen katalog 353 kultivarů ječmene (White & Cooke, 1992).

Avšak v současné době se nejvíce využívá DNA markerů. Ty hodnotí vlastní strukturu DNA. Nejčastěji se využívají pro svou variabilitu, neboť mohou charakterizovat celý genom. Navíc jsou velice spolehlivé, protože jejich vlastnosti závisí jen na sekvenci DNA. Další nespornou výhodou je jejich rychlost determinace.

Jejich identifikace se po té provádí pomocí metod molekulární biologie jako izolace DNA, PCR (polymerázová řetězová reakce), štěpení restričními enzymy a elektroforéza (White & Cooke, 1992).

### **3.4.1 Využití DNA markerů**

DNA markery jsou založeny na variabilitě v sekvencích DNA neboli polymorfismu. Nejčastěji se využívá sekvencí s vysokým polymorfismem, díky čemuž získáváme podrobný popis genetické diverzity. Podmínkou pro DNA markery je častý, rovnoměrný výskyt v genomu, tak aby bylo možné najít marker pro co nejtěsnější vazbu se sledovaným genem. Snadno a rychle se testují. Jelikož máme širokou paletu možných typů DNA markerů, musíme si vždy dobře rozmyslet, jaký typ bude nejvhodnější podle cíle a rozsahu studované problematiky.

### **3.4.2 Rozdělení DNA markerů**

Rozdělujeme markery založené na hybridizaci se sondou: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a na markery založené na PCR: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), SSR (Simple Sequence Repeats), STS (Sequence Tagged Site), SNAP (Single-Nucleotide Amplified Polymorphism) a další. Hlavními výhodami markerů založených na PCR oproti RFLP je nižší výchozí koncentrace DNA, díky amplifikaci DNA při PCR. Také zde odpadá tzv. Southernův přenos a konstrukce sondy, což nám výrazně usnadní obtížnost a časovou náročnost celé analýzy. Využívají se jako nástroje k lokalizaci jednotlivých genů, cílené selekci ve šlechtění při tvorbě nových odrůd, tvorbě genetických map (Klumpler, 2006).

#### ***RFLP***

Tato metoda je založena na užití restričních enzymů. Štěpením DNA pomocí restričních enzymů (endonukleázy) dochází ke tvorbě různého počtu odlišně dlouhých fragmentů štěpené genomové DNA. Takto se dají odlišit jedinci i v rámci druhu.

Výhodou RFLP je využívání kodominantní dědičnosti, díky které můžeme určit jedinečný lokus. Nevýhodou je dlouhá doba analýzy a také je tato metoda náročnější, než metody založené na PCR.

### ***RAPD***

Tato analýza je založena na užití PCR, kde se využívají primery o délce přibližně 10 nukleotidů s náhodně navrženou sekvencí, kterou nám navrhne software. Díky nízkému počtu nukleotidů daného primeru dochází během PCR k nasedání na více místech amplifikované DNA. Pomocí RAPD primeru lze amplifikovat určitého lokusu, který je většinou dominantní. Nevýhodou je, že pomocí této metody nelze rozlišit dominantního homozygota od heterozygota (Williams et al., 1990).

### ***SSR, STR, Mikrosatelity***

SSR (Simple Sequence Repeats) či STR (Short Tandem Repeats), nebo také mikrosatelity jsou krátké motivy o délce dvou až šesti nukleotidů, tandemově se opakujících v počtu až šedesáti repetit. Mikrosatelity jsou náhodně a také rovnoměrněji rozmístěné v genomu. Některé geny jsou těmito mikrosatelity obklopeny (SSR) a také tyto geny od sebe oddělují. Tyto části sekvencí byly proto navrženy jako primery pro amplifikaci SSR lokusů. Touto metodou lze odhalit polymorfizmy v řadě genotypů, na základě délky produktů. Tyto markery jsou kodominantní stejně jako většina RFLP a míra heterozygotnosti je opravdu vysoká. Proto mohou být používány v mapování genomů a kvalifikaci genetické rozmanitosti (Mitas et al., 1995).

### ***STS***

STS markery (Sequence Tagged Sites) fungují na principu znalosti konkrétní unikátní sekvence DNA v genomu. Využívají se jako způsob, kterým se mapuje zkoumaný genom (Olson et al., 1989). Jejich velkou výhodou je rychlý a snadný průběh celé analýzy (PCR a elektroforéza) a jejich kodominantní charakter. Nevýhodou STS markerů je jejich obtížné získávání, neboť je vyžadována unikátní sekvence DNA pro navržení primerů (zmapování daného úseku genomu DNA) (Klumpler, 2006).

### 3.4.3 Využití DNA markerů u pšenice

Chao et al. (1989) píše ve své práci o mapování genomu pšenice pomocí RFLP. Po rozštěpení jaderné DNA restrikčními enzymy vzniklo osmnácti fragmentů na homologních skupinách sedmého chromozomu. Pomocí hybridizačních cDNA (copy deoxyribonukleová kyselina) sond po té určili přesné pozice nukleotidů na ramenech homologních chromozomů 7A, 7B a 7D (tvorba map). Tyto mapy zahrnují tři lokusy kódující expresi těchto izoenzymů: aminopeptidáza (*Amp-3*), endopeptidáza (*ep-1*) a  $\alpha$  amyláza ( $\alpha$ -Amy-2), pět lokusů nesoucích geny rezistence proti patogenům aj.

Hlavní podstatou šlechtění rostlin je výběr vhodných jedinců, kteří nesou nejlepší znaky v potomstvu. Avšak šlechtitelé pracují se stovkami populací, čítající i tisíce jedinců. Markery asistovaná selekce vysoce zvýšila účinnost a efektivitu oproti běžným šlechtitelským přístupům. Mnoho zemědělsky významných vlastností jako jsou výnos, kvalita, či rezistence vůči chorobám jsou kódovány geny, které jsou známé jako lokusy pro kvantitativní znak QTL. Mají kvantitativní charakter projevu. Identifikovat tyto projevy pomocí markerů založených na fenotypu by bylo zcela nemožné. Proto se k zjištění přítomnosti takových genů začalo využívat molekulárních markerů. Jedním z hlavních využití molekulárních markerů v zemědělském výzkumu byla tvorba vazebných map. Pomocí těchto map identifikujeme místa na chromozomech, které obsahují zájmové geny, kódující projevy jednotlivých genů, či QTL.

Parker & Langridge (2000) ve své práci uvádí přeměnu kodominantních AFLP markerů pro hlavní lokusy kódující barvu endospermu v barevné hexaploidní pšenici, do sekvence STS markerů, které se dají využít pro markery asistovanou selekci (MAS). Dva alelické produkty AFLP byly klonovány a sekvenovány. Tyto primery se amplifikovaly jen u populací, které nesly znaky rodičovské linie „Schomburgk“ a tak se využilo těchto poznatků k vytvoření populačních map, podle kterých se dá odvodit počátek tzv. „žluté“ alely. I na tomto příkladu se dá dobře demonstrovat široké využití molekulárních markerů.

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Experimentální materiál

Rostlinný materiál pro experiment byl poskytnut ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. a obsahoval třináct nestandardně zbarvených genotypů. K dispozici byly genotypy jak jarní, tak ozimé pšenice s obilkami modré a bílé barvy. Přehled genotypů a pracovních čísel uvádí tabulka 1. Jako pozitivní kontroly pro jednotlivé *Glu-3* alely byly použity odrůdy ChineseSpring (*Glu-A3a*), Gabo (*Glu-A3b*), Gawain (*Glu-A3c*), Abbodanza (*Glu-A3d*), Liocorno (*Glu-A3e*), Apostle (*Glu-A3f*) a Glenlea (*Glu-A3g*), která byly poskytnuty Genovou bankou Výzkumného ústavu rostlinné výroby Praha – Ruzyně.

Tab. 1 Přehled genotypů *Triticum aestivum* použitých pro analýzy

Číslo vzorku	Přehled genotypů <i>Triticum aestivum</i>	Barva obilky	Typ	Označení položky v evidenci genových zdrojů
1	<i>Novosibirskaja 67 (N67)</i>	bílá	jařina	01C0202808
14	<i>UC66049</i>	modrá	jařina	01C0205100
15	<i>Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen</i>	modrá	jařina	01C0205098
16	<i>Tschermaks Blaukörniger</i>	modrá	jařina	K-46708
17	<i>48M</i>	modrá	ozim	*
18	<i>Skorpion (RU 440-6)</i>	modrá	ozim	01C0106994
19	<i>RU 440-5</i>	modrá	ozim	*
20	<i>Barevná 9</i>	modrá	ozim	01C0106098
21	<i>Barevná 25</i>	modrá	ozim	01C0106102
22	<i>Xiao Yian</i>	modrá	jařina	K-65029
23	<i>EF 02-54/9</i>	modrá	ozim	*
24	<i>H 90-15-2</i>	modrá	ozim	*
25	<i>Heroldo</i>	bílá	ozim	01C0106728

Vysvětlivky: červená – čísla dle EVIGEZ (VÚRV Praha), modrá – čísla dle Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale (CIMMYT), \* – není známo, jedná se odrůdy a genové zdroje zařazené do kolekce Ing. Petrem Martinkem, CSc. (Agrotest fyto, s.r.o.)

## 4.2 Metodika

Vlastní molekulárně biologické analýzy tvořily tyto kroky:

- Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA.
- Příprava reakčních směsí pro PCR.
- Příprava agarózového gelu.
- Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR.
- Vyhodnocení výsledků.

### 4.2.1 Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA

Genotypy byly vysety na Petriho misky, na filtrační papír. Po 5 až 7 dnech byly odebrány vzorky DNA po 100 mg z klíčících rostlin *Triticum aestivum* a to vždy do dvou zkumavek a poté byly uloženy do hlubokomrazicího boxu při teplotě -70 °C. Po té byla DNA extrahována pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle příslušného návodu (Qiagen, 2012)

Pomocí přístroje Picodrop Spectrometr (Picodrop) bylo provedeno měření koncentrace extrahované DNA (mg/μl) a zároveň také její čistota. Po vyhodnocení bylo usouzeno, že naměřené hodnoty byly dostatečné pro provedení analýz.

### 4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR

Pro detekci alel na lokusu *Glu-A3* jsme použili alelově specifické STS markery, založené na jednonukleotidových polymorfizmech, které byly navrženy podle Wang et al. (2010).

Primery, které jsme použily při analýze, jsou uvedeny v tabulce 2. K identifikaci alel na lokusech *Pina* a *Pinb*, které mají kodominantní charakter a kódují geny tvrdosti obilky (*puroindolin a*, *puroindolin b*) jsme použili specifické STS markery podle Huang & Brûlé-Babel (2011) (Tab. 3).

K identifikaci nulových alel pro *Waxy* geny pšenice jsme použili specifické primery podle Vanzetti et al. (2009) (Tab. 4).

Reakční směs pro PCR jsme připravili postupným přidáváním jednotlivých chemikálií do mikrozkušavky podle protokolu (Tab. 5). Vzniklý mastermix jsme po té rozpipetovali do mikrozkušavek pro PCR vždy po 24 µl a následně jsme přidali 1 µl předem vyizolované templátové DNA daného genotypu. Po pečlivém uzavření mikrozkušavek jsme takto připravené směsi vložili do jamek termocyklieru T3 (Biometra), kde byl přednastaven program s příslušným teplotním a časovým profilem:

- Pro *Glu-A3*: 5 min 94 °C, poté 38 cyklů po 35 sekundách při 94 °C, 35 sekund při 60 °C a 90 sekund při 72 °C, závěrečné prodloužení 8 min při 72 °C.
- Pro *Pina*, *Pinb*: 5 min 94 °C, poté 35 cyklů po 30 sekundách při 95 °C, 30 sekund při 60 °C a 90 sekund při 72 °C, závěrečné prodloužení 10 min při 72 °C.
- Pro *Waxy* geny: 2 min 94 °C, poté 33 cyklů po 1 min při 94 °C, 2 min při 54 °C a 2 min při 72 °C.

Tab. 2 Alelově specifické PCR markery pro identifikaci *Glu-A3* (Wang et al., 2010)

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

Tab. 3 Primery a velikost jejich produktů pro analýzu lokusu Pina a Pinb (Huang & Brûlé, 2011)

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

Tab. 4 Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu Waxy genů (Vanzetti et al., 2009)

Název primeru	Sekvence	Amplifikovaný lokus
#4F	AAGAGCAACTACCAGT	<i>Wx-A1</i> , <i>Wx-B1</i>
#4R	TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	a <i>Wx-D1</i>

Tab. 5 Složení mastermixu (složení pro jednu reakci)

Složky reakce	Množství (µl)
deionizovaná H <sub>2</sub> O	16,8
pufr	5
dNTP	0,1
primer (začínající – F)	1
primer (končící – R)	1



### 4.2.3 Příprava agarózového gelu

Separace na gelu je založena na principu rozdělování molekul podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli na základě molekulové hmotnosti separované látky. Analýzy alelových variant *Glu-A3*, *Pina/b* a nulových alel *Waxy* genů byly provedeny na 1 % agarózovém gelu, připraveném podle následujícího postupu: 1891 ml destilované vody bylo smícháno s 38 ml 50x TAE pufru (trisacetátový pufr). Z roztoku bylo odlito cca 270 ml do lahve a přidáno 2,8 g agarózy odvážené na analytických vahách. Vzniklá směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě až k varu. Mezitím byla sestavena vanička pro nalévání gelu, společně s hřebenem, sloužícím ke tvorbě jamek pro vzorky DNA. Po povaření agarózy s roztokem pufru a následném zchlazení byly přidány 2  $\mu$ l ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl přelit do sestavené vaničky a po odstranění bublin cca 20 minut tuhnul v digestoři. Po vyjmutí hřebenu ze ztuhlého gelu byla vanička přenesena do elektroforetické vany a zalita zbytkem naředěného TAE pufru. Gel byl připraven pro nanášení vzorků. Jednotlivé složky pro přípravu gelu jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6 *Komponenty pro přípravu 1 % agarózového gelu*

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

### 4.2.4 Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR

Separace PCR produktů jsme provedli na horizontální elektroforéze v systému Agagel Maxi (Biometra, GE). Amplifikované vzorky jsme rozpipetovali po 20  $\mu$ l do gelu, zalitého puftrem. Po té jsme elektroforetickou vanu zakryli bezpečnostním krytem a aparaturu jsme připojili ke zdroji stejnosměrného napětí Minicell Power Pack P20 od firmy Biometra. Následná separace probíhala při napětí cca 70 – 80 V, po dobu jedné až dvou hodin.

Po jedné až dvou hodinách jsme ukončili separaci, soustavu odpojili od proudu a gel jsme vyjmuli i s vaničkou z pufu. Vizualizaci výsledných produktů jsme provedli pomocí kamery pod UV lampou v transiluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc.). Zaznamenání obrazu jsme provedli pomocí softwarově ovládané černobílé kamery CCTV (Panasonic, USA).

#### **4.2.5 Vyhodnocení výsledků**

Produkty amplifikace, vizualizované na agarózovém gelu jsme porovnávali s velikostními markery. Použili jsme 100 bp DNA Ladder (Promega) a pBR322 DNA *HaeII* (ABgene).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Nízkomolekulární gluteniny

V pšeničném endospermu jsou přítomny zásobní bílkoviny, které zde mají nezastupitelnou funkci. Tyto bílkoviny se dělí na gliadiny a gluteniny. Gluteniny dělíme podle pohyblivosti v SDS-PAGE (dodecylsírán sodný – polyakrylamidový gel) elektroforéze v polyakrylamidovém gelu na vysokomolekulární (HMW-GS) a nízkomolekulární (LMW-GS) (Štiasna et al., 2014).

Jsou navzájem poutány disulfidickými vazbami, díky čemuž utváří polymerní strukturu. Při kontaktu s vodou gluteniny spolu s gliadiny tvoří lepek. Poměrem bílkovin v lepku získáváme jedinečné vlastnosti tažnosti a pružnosti (elasticity) pšeničné mouky. HMW-GS jsou zastoupeny přibližně 10 % z celkového množství zásobních proteinů. LMW-GS tvoří asi 1/3 z celkového množství zásobních proteinů. LMW-GS jsou umístěny na *Glu-3* lokusu, na krátkých ramenech chromozomů 1A, 1B, a 1D. Alelické kombinace gluteninových podjednotek mají pak přímý vliv na technologickou kvalitu pšenice (Branlard et al., 2001).

Doposud bylo identifikováno dvacet různých alel pro tyto proteiny. Pro lokus *Glu-A3* jich je sedm (*a, b, c, d, e, f, g*), devět pro *Glu-B3* (*a, b, c, d, e, f, g, h, i*) a pro lokus *Glu-D3* jich máme pět (*a, b, c, d* a *e*). Pomocí sedmi specifických STS markerů navržených podle (Wang et al. 2010) jsme zkoumali alelovou skladbu lokusu *Glu-A3* v kolekci třinácti genotypů pšenice s modrým a bílým zbarvením obilky. Každá alela byla detekována na gelu společně s kontrolním vzorkem. Pro *Glu-A3a* jsme zvolili kontrolní odrůdu Chinese Spring, která tvořila produkt o velikosti 529 bp. Dále to byla kontrolní odrůda Gabo (pro *Glu-A3b*) s velikostí produktu 892 bp, Abbodanza (*Glu-A3d*) 967 bp, Liocorno (*Glu-A3e*) 158 bp a Apostle (*Glu-A3f*) o velikosti 552 bp. Pozitivní kontrola Glenlea (*Glu-A3g*) amplifikovala produkt 1345 bp dlouhý. Alelu *Glu-A3c* jsme detekovali pomocí společného markeru pro *Glu-A3a* a *Glu-A3c* odlišitelného pomocí kontroly Gawain s velikostí produktu 573 bp.

Detekované alely u těchto třinácti genotypů jsou shrnuty v tabulce 7. Nejpočetnější výskyt jsme zaznamenali u alely *Glu-A3f* (Obr. 7). Méně častý výskyt byl pozorován u alel *Glu-A3c* a *Glu-A3d*. Alely *Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3e* a *Glu-A3g* (Obr. 8) nebyly

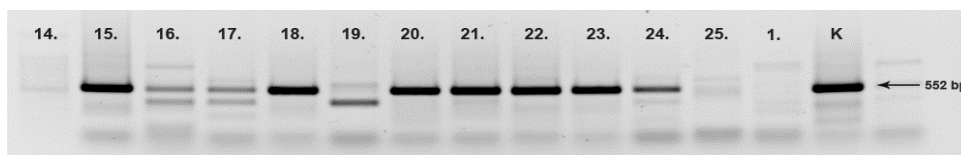
vůbec detekovány. Branlard et al. (2003) ve své práci pozorovali u francouzských genotypů jako nejčastěji se vyskytující alelu *Glu-A3a*, stejně jako u českých a afrických odrůd, kde byla detekována jako druhá nejčastější v pořadí alela *Glu-A3d* (Bradová & Štočková, 2010; Bellil et al., 2012). Zhang et al. (2012) uvádí, že přítomnost alel *Glu-A3a*, *A3c*, *A3d* a *A3f* má pozitivní efekt na odpor těsta. Na základě těchto poznatků hodnotíme námi testované genotypy, jako vhodný materiál vykazující potenciál dobré pekařské kvality.

Genotypy vykazovaly převážně homozygotní formy genu, byly však pozorovány i formy heterozygotní. A to ve dvou případech u odrůd UC66049 a 48M. Zde by bylo vhodné provést doplňující analýzu, neboť není jisté, či se jedná o heterozygotní projev genu, nebo jen on příměs v materiálu. Jelikož se jedná o genové zdroje, u kterých nejsou požadavky na čistotu tak vysoké, provádělo se hodnocení na základě fenotypu resp. podle vyrovnanosti porostu.

Tab. 7 Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro *Glu-A3*

<b>Genotyp</b>	<b>Barva</b>	<b>Výsledná alela</b>
Novosibirskaja 67	bílá	<i>Glu-A3f</i>
UC66049	modrá	<i>Glu-A3d/f</i>
Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen	modrá	<i>Glu-A3d</i>
Tschermaks Blaukörniger	modrá	ND
48M	modrá	<i>Glu-A3c/f</i>
Skorpion (RU 440-6)	modrá	ND
RU 440-5	modrá	<i>Glu-A3f</i>
Barevná 9	modrá	<i>Glu-A3f</i>
Barevná 25	modrá	<i>Glu-A3f</i>
Xiao Yian	modrá	<i>Glu-A3f</i>
EF 02-54/9	modrá	<i>Glu-A3c</i>
H 90-15-2	modrá	<i>Glu-A3d</i>
Heroldo	bílá	<i>Glu-A3d</i>

Vysvětlivky: ND – nebylo detekováno, / - detekovány dvě alely



Obr. 7 PCR produkty získané pomocí markeru *Glu-A3f*

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – *Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen*, 16. – *Tschermaks Blaukörniger*, 17. – 48M, 18. – *Skorpion (RU 440-6)*, 19. – *RU 440-5*, 20. – *Barevná 9*, 21. – *Barevná 25*, 22. – *Xiao Yian*, 23. – *EF 02-54/9*, 24. – *H 90-15-2*, 25. – *Heroldo*, 1. – *Novosibirskaja 67*, K. – *Kontrola (Apostle)*, šipka označuje velikost příslušného produktu.



Obr. 8 PCR produkty získané pomocí markeru *Glu-A3g*

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – *Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen*, 16. – *Tschermaks Blaukörniger*, 17. – 48M, 18. – *Skorpion (RU 440-6)*, 19. – *RU 440-5*, 20. – *Barevná 9*, 21. – *Barevná 25*, 22. – *Xiao Yian*, 23. – *EF 02-54/9*, 24. – *H 90-15-2*, 25. – *Heroldo*, 1. – *Novosibirskaja 67*, K. – *Kontrola (Glenlea)*, šipka označuje velikost příslušného produktu.

## 5.2 Markery tvrdosti obilky

Tvrdość obilky je jedním z nejvíce důležitých ukazatelů kvality u pšenice. Je to významná vlastnost pšeničného zrna, která se vztahuje na kvalitu mletí, hnětení a pečení těsta. Škrobové zrna v endospermu obilky jsou vázány rozdílnými molekulami puroindolinu, díky čemuž vykazují rozdílnou tvrdost zrna. Gaines et al. (2000) zjistili, že „měkké“ pšenice mají vysoký obsah amylózy ve vazbě s tuky a malý obsah škrobu.

Mouka z tvrdé pšenice je nejvhodnější pro pečení chleba a mouka z měkké pšenice je nejčastěji užívána k pečení koláčů, pečiva a sušenek. Tuto tvrdost primárně zajišťuje komplex nazývaný *Ha* lokus, který je tvořen třemi, úzce vázanými geny: *Gsp-1*, *Pina* a *Pinb*. Pšenice obsahuje dva typy proteinů: puroindolin a (*Pina*) a puroindolin b (*Pinb*) (Chen et al., 2007).

Přičemž geny *Pina* a *Pinb* jsou hlavními genetickými faktory tvrdosti zrna. *Pina-D1* a *Pinb-D1* byly lokalizovány v distální oblasti chromozomu 5D. Všechny odrůdy tzv. „tvrdých“ pšenic mají sekvenční mutaci na jednom z těchto genů, což má za následek změnu tvrdosti zrna. V současné době známe devět alel pro *Pina*

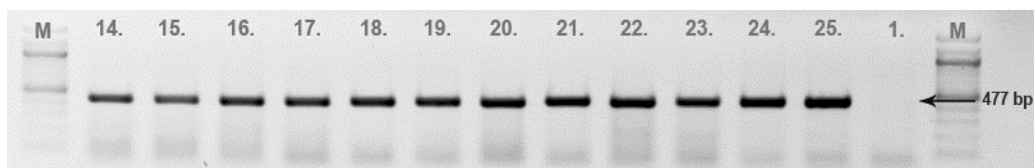
a sedmnáct alel pro *Pinb*. Velké množství nově identifikovaných alel bylo pozorováno u čínských krajových odrůd. V Evropě a Severní Americe byly popsány *Pina* a *Pinb* alely u tvrdých pšenic (*Pina-D1b*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c*, *Pinb-D1d*). Je známo mnoho metod pro stanovení jednonukleotidového polymorfizmu (SNP). Většina je založena na ligaci oligonukleotidu a vytvoření primeru specifického pro danou alelu (Huang & Brûlé-Babel, 2011).

Při našich analýzách jsme se zaměřili na rozlišení alel lokusů *Pina* a *Pinb* pomocí primerových kombinací. STS1-9 pro alelu *Pina* a 4 SNP primery pro alelu *Pinb* s odlišnými velikostmi produktů. Podle metodiky uvedené v článku od Huang & Brûlé Babel (2011) jsme získali výsledky, které jsou uvedeny v tabulce 8. Při detekci *Pina* jsme analyzovali dvě alely pro každý genotyp. Zde jsme detekovali přítomnost pouze *Pina-D1a* (Tab. 8) (Obr. 9). Při analýze *Pinb* jsme detekovali tři alely ze čtyř použitých v našem experimentu (*Pinb-D1a*, *b* a *d*) (Tab. 8) (Obr. 10) (Obr. 11). *Pinb-D1a* byl detekován u 23 %, *Pinb-D1b* u (38 %) a *Pinb-D1d* u 23 %. Alela *Pinb D1c* nebyla detekována vůbec. Konstatujeme, že všechny genotypy ve studovaném souboru vykazovali fenotyp „tvrdého“ zrna.

Tab. 8 Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro *Pina* a *Pinb*

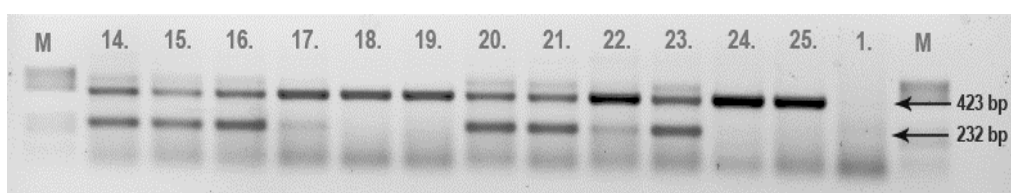
Genotyp	Barva obilky	Alelická skladba	
		<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>
Novosibirskaaja 67	bílá	ND	ND
UC66049	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Tschermaks Blaukörniger	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
48M	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Skorpion (RU 440-6)	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>
RU 440-5	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>
Barevná 9	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Barevná 25	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Xiao Yian	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
EF 02-54/9	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
H 90-15-2	modrá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Heroldo	bílá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>

Vysvětlivky: ND – nebylo detekováno



Obr. 9 PCR produkty *Pina-D1a*

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, 16. – Tschermaks Blaukörniger, 17. – 48M, 18. – Skorpion (RU 440-6), 19. – RU 440-5, 20. – Barevná 9, 21. – Barevná 25, 22. – Xiao Yian, 23. – EF 02-54/9, 24. – H 90-15-2, 25. – Heroldo, 1. – Novosibirskaja 67, M – velikostní marker, šipka označuje velikost příslušného produktu.



Obr. 10 PCR produkty *Pinb-D1a* (423 bp) a *Pinb-D1b* (232 bp)

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, 16. – Tschermaks Blaukörniger, 17. – 48M, 18. – Skorpion (RU 440-6), 19. – RU 440-5, 20. – Barevná 9, 21. – Barevná 25, 22. – Xiao Yian, 23. – EF 02-54/9, 24. – H 90-15-2, 25. – Heroldo, 1. – Novosibirskaja 67, M – velikostní marker, šipky označují velikost příslušných produktů.



Obr. 11 PCR produkty *Pinb-Da* (236 bp) a *Pinb-Dd* (423 bp)

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, 16. – Tschermaks Blaukörniger, 17. – 48M, 18. – Skorpion (RU 440-6), 19. – RU 440-5, 20. – Barevná 9, 21. – Barevná 25, 22. – Xiao Yian, 23. – EF 02-54/9, 24. – H 90-15-2, 25. – Heroldo, 1. – Novosibirskaja 67, M – velikostní marker, šipky označují velikost příslušných produktů.

U genotypu Novosibirskaja 67 jsme nedetkovali žádné PCR produkty a to ani při opakování analýz (pro každou variantu minimálně tři opakování). To je nejspíše zapříčiněno mutací v lokusu pro nasedání primerů obecných pro *Pina-D1* a *Pinb-D1* (Tab. 8). Tyto mutace jsou jednotlivě spojeny s tvrdostí obilky, avšak nevíme, jestli může mutace u obou lokusů tvrdost obilky zvýšit, či snížit (Tranquilli et al., 2002). A tak tento genotyp bude podroben dalšímu studiu.

Znalost genetické determinace lokusu *Pina* a *Pinb* v pšenici s nestandardním zbarvením by mohla být využita při markery asistované selekci ve šlechtitelských programech. Neboť struktura endospermu nám ukazuje rozdíly mezi studovanými genotypy.

### 5.3 Detekce nulových alel *Waxy* genů

Škrob je jednou z hlavních složek pšeničné mouky. Jeho obsah a chemické složení mají vliv na kvalitu produktů, které se z pšeničné mouky vyrábí. Zodpovědným enzymem za biosyntézu amylozy je syntáza vázaná v molekulách škrobu (GBBS) či voskový protein. U pšenice jsou známy tři geny, které kódují GBBS. Jsou to *Wx-A1*, *Wx-D1* a *Wx-B1*, jenž jsou lokalizovány na chromozomech 7A, 7D a 4A. Vliv *Waxy* genů je značný z hlediska technologické kvality, neboť díky zvyšování poměru mezi amylozou a amylopektinem dochází též k zvyšování množství a kvality škrobu v endospermu (Yamamori & Quynh, 2000).

V současné době došlo k identifikaci přirozeně se vyskytujících mutací, tzv. nulových alel, díky čemuž došlo ke ztrátě jedné či více GBBS izoforem. Přítomností jedné či dvou forem GBBS vedou k závěru, že klesne obsah amylozy u pšenice. Tyto pšenice jsou poté nazývány „částečně voskové“. Genotypy se třemi nulovými alelami obsahují škrob složený pouze z amylopektinu. Tyto voskové pšenice pak nachází uplatnění při výrobě některých asijských pokrmů či při výrobě modifikovaných potravinářských škrobů (Graybosch, 1998).

Největší vliv na obsah amylozy a kvalitu byl pozorován u mutantů *Wx-B1*, potom *Wx-D1* a nakonec *Wx-A1* (Yamamoria & Quynh, 2000).

V naší práci jsme se zaměřili na detekci výskytu nulových alel *Waxy* genů *Wx-B1*, *Wx-D1* a *Wx-A1*. Pomocí primerů #4F a #4R navržených podle (McLauchlan et al., 2001).

Použité primery byly navrženy k amplifikaci tří fragmentů GBSS genů A, B a D. Fragment D měl velikost 299 bp a byl nejdelší. Fragment A byl středně velký a jeho velikost byla 257 bp. Nejkratší byl fragment B o velikosti 227 bp (Tab. 9). Ze třinácti testovaných genotypů pouze tři (13 %) vykazovaly projev nulové alely, a to *Wx-B1*.

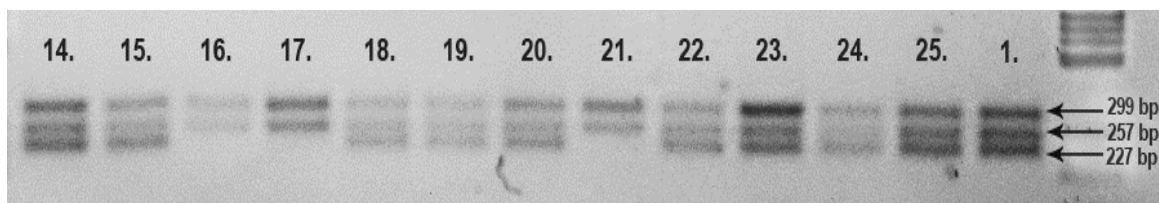


Jmenovitě Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger, a Barevná 9 (Obr. 12). Alely *Wx-A1* a *Wx-D1* byly přítomny v celé kolekci (Tab. 9). V souboru 103 argentinských genotypů pšenice vykazovalo přítomnost nulové alely v lokusu *Wx-A1* 24 % vzorků (Vanzetti et al. 2009).

Tab. 9 Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro *Wx-B1*, *Wx-D1* a *Wx-A1*

Genotyp	Barva obilky	Velikost produktu		
		<i>Wx-D1</i> 299 bp	<i>Wx-A1</i> 257 bp	<i>Wx-B1</i> 227 bp
Novosibirskaja 67	bílá	+	+	+
UC66049	modrá	+	+	+
Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen	modrá	+	+	-
Tschermaks Blaukörniger	modrá	+	+	-
48M	modrá	+	+	+
Skorpion (RU 440-6)	modrá	+	+	+
RU 440-5	modrá	+	+	+
Barevná 9	modrá	+	+	-
Barevná 25	modrá	+	+	+
Xiao Yian	modrá	+	+	+
EF 02-54/9	modrá	+	+	+
H 90-15-2	modrá	+	+	+
Heroldo	bílá	+	+	+
<b>Výskyt nulové alely [%]</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>

Vysvětlivky: + přítomnost produktu, - absence produktu



Obr. 12 PCR produkty *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1*

Vysvětlivky: 14. – UC66049, 15. – *Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen*, 16. – *Tschermaks Blaukörniger*, 17. – 48M, 18. – *Skorpion (RU 440-6)*, 19. – RU 440-5, 20. – Barevná 9, 21. – Barevná 25, 22. – *Xiao Yan*, 23. – EF 02-54/9, 24. – H 90-15-2, 25. – *Heroldo*, 1. – *Novosibirskaja 67*, šipky ukazují velikost příslušných produktů.

Výsledky alel *Wx-D1* byly shodné s našimi a u alel *Wx-B1* byly výsledky podobné. U íránských genotypů byl výskyt nulové alely v lokusu *Wx-B1* menší (4,2 %) (Khaniani et al., 2012).

Projev nulové alely závisí na geografickém původu daného genotypu. Nulová alela A je častěji přítomna v genotypech pocházejících z Turecka. Oproti tomu genotypy pocházející z Koreje, Japonska a Austrálie častěji nesou nulovou alelu *Wx-B1*. Nulová alela *Wx-D1* je velmi vzácná (Urbano et al., 2002).

Pšenice obsahující škrob vzniklý deficiencí *Wx-B1* vykazuje odlišné funkční vlastnosti lepivosti škrobu (Hansen et al., 2010). Tyto genotypy by mohli mít širší využití v asijských zemích v produkci speciálních typů nudlí např. „udon“ nebo „ramen“ (Nagao, 1996).

## 6 ZÁVĚR

Již od rané historie lidstva, je pšenice neodmyslitelnou součástí lidské výživy. V dnešní době začínají být využívány odrůdy pšenice, které mají odlišné zbarvení obilky. Příslibem do budoucna je především pěstování těchto odrůd pro výživu člověka, zejména díky jejich kladným účinkům na lidský organismus.

Veškeré experimenty probíhaly v laboratoři molekulární biologie Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně a při vypracování bakalářské práce byly využity metody molekulární biologie, jako je například izolace genomové DNA a detekce polymorfizmu DNA na základě reakce PCR.

Práce byla zaměřena na výzkum alelové variability LMW-GS lokusu *Glu-A3* pomocí STS markerů, detekci *Pina* a *Pinb* genů pro tvrdost obilky a také na studium výskytu nulových alel zodpovědných za tvorbu *Waxy* proteinů v kolekci jedenácti genotypů modré a dvou genotypů bílé pšenice s nestandardním zbarvením obilky.

Při studiu alelové variability LMW-GS lokusu *Glu-A3* byla zjištěna frekvence výskytu jednotlivých alel, mezi kterými převažovala *Glu-A3f* (39 %), jmenovitě Novosibirskaja 67, RU 440-5, Barevná 9, Barevná 25, Xiao Yian. Následně alely *Glu-A3c* (8 %) EF 02-54/9 a *Glu-A3d* (15 %), přesněji pak H 90-15-2 a Heroldo. U genotypů UC66049 a 48M byly pozorovány dvě varianty alel. U UC66049 to byla varianta *Glu-A3d/f* a u 48M *Glu-A3c/f*. Důvodů se zde nabízí několik. Buď se jedná o heterozygotní projevy genu, nebo o příměs v testovaném materiálu. Proto by zde byly vhodné doplňující analýzy pro upřesnění výsledků. Tyto alely (*Glu-A3c*, *Glu-a3d* a *Glu-A3f*) zvyšují potenciál pekárenské kvality, a proto jsou testované genotypy možnými zdroji při vývoji nových odrůd.

Experiment, ve kterém jsme detekovali přítomnost *Pina* a *Pinb* genů odhalil výskyt všech forem genů kromě *Pinb-D1c*. U všech genotypů s výjimkou Novosibirskaja 67 (žádný PCR produkt u všech variant) byla odhalena přítomnost varianty genu *Pina-D1a*. Lokus *Pinb* obsahoval varianty genu *Pinb-D1a* (23 %), *Pinb-D1b* (46 %) a *Pinb-D1d* (23 %). Znalosti genetické determinace *Pina* a *Pinb* genů u pšenice s nestandardním zbarvením obilky by mohly být využity při markery asistované selekci při šlechtění pro pekárenské účely.

Studie zaměřená na detekci nulových alel *Waxy* genů, kódujících tvorbu amyulózy a amylopektinu v endospermu obilky prokázala, absenci tohoto genu na lokusu *Wx-B1* u tří analyzovaných genotypů. Jmenovitě Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger a Barevná 9. Tyto genotypy jsou potenciálními kandidáty pro další šlechtitelské účely, zejména pro asijský trh, kde je o takový typ pšenice zvýšený zájem.

Obečně lze konstatovat, že hodnocený materiál prokázal zajímavé vlastnosti v rámci hodnocených znaků a proto je vhodný do zařazení šlechtitelských programů. Dále je potřeba poukázat na užitečnost aplikace PCR v institucích, zabývajících se šlechtěním pšenice.

Závěrem bych rád dodal, že všechny mé zkušenosti nabyté během vypracování bakalářské práce bych chtěl využít při zpracování práce diplomové.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABDEL-AAL E. S. & HUCL P., 1999: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheat. *Cereal Chemistry*, 76(3): 350–354. ISSN 0009-0352.
2. ABDEL-AAL E. S. M., ABOU-ARAB A. A., GAMEL T. H., HUCL P., YOUNG J. C. & RABALSKI I., 2008: Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23): 1117–11177. ISSN 0021-8561.
3. ANTONOV A. & GRODECKÝ V., 1958: *Atlas obilnin*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 278 s.
4. ARBUZOVA V. S. & MAYSTRENKO O. I., 2000: Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Research Communications*, 28(3): 235–237. ISSN 0133-3720.
5. 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(1): 39–46. ISSN 0133-3720.
6. BELLIL I., KHELIFI D., CHEKARA BOUZIANI M., 2012: Genetic diversity of high and low molecular weight glutenin subunits in Saharan bread and durum wheats from Algerianoases. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48(1): 23–32. ISSN 1212-1975.
7. BOTH Z. & CHLOUPEK O., 2005: Seed vitality of wheat and bread making quality, s. 22. In: RYANT P., CERKAL R., STŘEDA T., VEJRAŽKA K. (eds): *MendelNet<sup>05</sup> Agro. Sborník abstraktů z konference posluchačů postgraduálního doktorského studia 29. Listopadu 2005*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 139 s. ISBN 80-7157-905-X.
8. BRADOVÁ J., ŠTOČKOVÁ L., 2010: Evaluation of winter beat collection in terms of HMW- and LMW-Glutenin Subunits. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1): 96–99. ISSN 1212-1975.

9. BRANLARD G., DARDEVET M., AMIOUR N., IGREJAS G., 2003: Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in Frenchbreadwheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(7): 669–679. ISSN (electronic) 1573-5109.
10. BRANLARD G., DARDEVET M., SACCOMANO R., LAGOUTTE F. & GOURDON J., 2001: Genetic diversity of wheat storage proteins and breadwheat quality. *Euphytica*, 119(1-2), 59-67. ISSN (electronic) 1573-5060.
11. CASTAÑEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNÁNDEZ L. M., PÁEZ-HERNÁNDEZ M. E., RODRÍGUES J. A. & GALÁN-VIDAL C. A., 2009: Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4): 859–871. ISSN 0308-8146.
12. CORNELL H. J., HOVERING H. J., CHRISS A. W. A. & ROGERS M., 1994: Particle-size Distribution in beat-starch and its importance in processing. *Starch-Starke*, 46 (1): 203–207. ISSN (electronic) 1521-379X
13. DELGADO-VARGAS F., JIMÉNEZ A. R. & PAREDES-LÓPEZ O., 2000: Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3): 173–289. ISSN (electronic) 1549-7852.
14. DOLEŽEL, J., 2014: Genom pšenice. *Akademický bulletin akademie věd ČR*, Praha, 2, 12 (2): 2–5 s. ISSN 1210-9525.
15. DUBCOVSKY J., LUO M. C., ZHONG G. Y., BRANSTEITTER R., DESAI A. J., KILIAN A., KLEINHOF S. A. & DVORAK J., 1996: Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum*, and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L.. *Genetics*, 143 (2): 983–999. ISSN 0016-6731.
16. ESCRIBANO-BAILÓN M. T., SANTOS-BUELGA C. & RIVAS-GONZALO J., 2004: Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054 (1): 129–141. ISSN (electronic) 1873-3778.

17. GAINES CS, RAEKER MÖ, TILLEY M, FINNEY PL, WILSON JD, BECHTEL DB, MARTIN RJ, SEIB PA, LOOKHART GL, DONELSON T., 2000: Associations of starch gel hardness, granule size, waxy allelic expression, thermal pasting, milling quality, and kernel texture of 12 soft wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 77(1): 163–168. ISSN 0009-0352..
18. GONCHAROV N. P., GOLOVNINA B., GLUSHKOV, BLINKOV A., SHUMNY V. K., 2008: Evolutionary history of wheats– the main cereal of mankind. *Biosphere Origin and Evolution*, 25(1): 407–419. ISSN 0172-6218.
19. GRAYBOSH R. A., 1998: Waxy wheats: Origin, properties, and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4): 135-142. ISSN 0924-2244.
20. HANSEN L. E., JACKSON D. S., WEHLING R. L., WILSON J. D., GRAYBOSH R. A., 2010: Functionality of native tetraploid wheat starches: Effects of waxy loci alleles and amylose concentration in blends. *Journal of Cereal Science*, 52(1): 39-45. ISSN (electronic) 1095-9963.
21. HE J. & GIUSTI M. M., 2010: Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1): 163–187. ISSN (electronic) 1941-1421.
22. HOSSEINIAN F. S., WENDE L. & TRUST B., 2008: Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*, 109(4): 916–924. ISSN 0308-8146.
23. HUANG S., SIRIKHACHORNKIT A., SU X., FARIS J., GILL B., HASEKORN R., GORNICKI P., 2002: Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1): 8133–8138. ISSN (electronic) 1091-6490.
24. HUANG X-Q & BRÛLÉ-BABEL A., 2011: Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 53(3): 277-284. ISSN (electronic) 1095-9963.

25. CHABINOVÁ J., ZÍTKA O., HÚSKA D., KLEJDUS B., KIZEK R., 2011: Optimization chromatographic isolation of anthocyanins, s. 1003–1004. In: ŠKARPA P. (eds): *MendelNet 2011, Faculty of Agronomy. Sborník abstraktů z konference posluchačů postgraduálního doktorského studia 23. Listopadu 2011*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 1060 s. ISBN 80-7157-905-X.
26. CHAO S., SHARP P. J., WORLAND A. J., WARHAM E. J., KOEBNER R. M. D. & GALE, M. D., 1989: RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 78(4): 495–504. ISSN (electronic) 1432-2242.
27. CHEN F., ZHONGHU H., CHEN D., ZHANG C., ZHANG Y & XIA X., 2007: Influence of puroindoline allele on milling, steamed bread, noodles and pan bread in common spring wheat. *Journal Cereal Science*, 45(1): 59-66. ISSN (electronic) 1095-9963.
28. JAAFAR S., SHARIFAH N., BARON J., SIEBENHANDL-EHN S., ROSENAU T., BÖHMDORFER, S., GRAUSGRUBER H., 2013: Increased anthocyanin content in purple pericarp×blue aleurone wheat crosses. *Plant Breeding*, 132(6): 546–552. ISSN (electronic) 1439-0523.
29. KADLEC P., et al. (ed.), 2002: *Technologie potravin I*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 300 s. ISBN 978-80-7080-509-1
30. KHANIANI B. H., DARVISH F., BIHAMTA M. R., HASSANI M. E., NAJAFIAN G., 2012: Identification of a null allele at the Wx-B1 locus in some of Iranian bread wheat genotypes. *Advances in Environmental Biology*, 6(10): 2586–2589. ISSN 1995-0756.
31. KLUMPLER T., 2006: *Studium polymorfizmu DNA markerů využitelných k identifikaci nových genů rezistence ječmene k padlí travnímu*. Diplomová práce (in MS), Masarykova univerzita v Brně, Brno, 46 s.



32. KONCZAK I. & ZHANG W., 2004: Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5): 239–240. ISSN (electronic) 1110–7251.
33. KUČEROVÁ J., 2004: *Technologie cereálií*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 141 s. ISBN 9788071578116.
34. MARTINEK P. & VYHNÁNEK T., 2014: Barevné zrno pšenice jako zdroj antioxidantů. *Úroda*. 2014, 7(1): 68–70. ISSN 0139-6013.
35. MARTINEK P., COUFALOVÁ O., KUREČKA R., NOVÁKOVÁ E. & MIKULCOVÁ J., 2006: Netradiční barva obilok pšenice (*Triticum aestivum* L.), její genetická podmíněnost a možnost využití v potravinářství, s. 95–96. In: UŽÍK M. (eds): *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin 2006. Sborník z 13. konference 14.–15. listopad 2006*. Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, 203 s. ISBN 80-213-0903-2.
36. MCLAUHLAN A., OGBONNAYA, F. C., HOLLINGSWORTH B., CARTER M., GALE, K. R., HENRY R. J. & APPELS R., 2001: Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Australian Journal of Agriculture Research*, 52(12): 1409-1416. ISSN 0004–9409.
37. MITAS M., YU A., DILL J., KAMP T. J., CHAMBERS E. J. & HAWORTH I. S., 1995: Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat:(CTG) *15. Nucleic acids research*. 23(6): 1050–1059. ISSN (electronic) 1362–4962.
38. NAGAO S., 1996: Processing technology of noodle products in Japan. Pasta and Noodle Technology. *American Association of Cereal Chemists*, 20(12): 1-10. ISSN (electronic) 0009-0352.
39. OLSON M., HOOD L., CANTOR C. & BOTSTEIN D., 1989: A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245 (4925), 1434–1435. ISSN (electronic) 1095-9203.

40. PARKER G. D. & LANGRIDGE P., 2000: Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 6(2), 169-174. ISSN (electronic) 1572-9788.
41. PELIKÁN M. 1996: *Zpracování obilnin a olejnin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 148 s. ISBN 8071575259.
42. PODHORNÁ J., 2010: *Analýza barviv pšeníc s netradičním zabarvením obilky*. Bakalářská práce (in MS), Mendelova univerzita v Brně, Brno, 62 s.
43. PRUGAR J., et al. (ed.), 2008: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. Tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.
44. PŘÍHODA J., SKŘIVAN P. & HRUŠKOVÁ M., 2004: *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 203 s. ISBN 80-7080-530-7.
45. QIAGEN, 2012: *DNeasy Plant Handbook*. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>
46. QUALSET C. O., SOLIMAN K. M., DVORAK J. J. & VOGT H. E., 1983: Release of wheat germplasm: A blue aleurone translocation stock-UC66049. *Agronomy Progress*, 139(1): 1-8. ISSN 1052-6137.
47. RATHJEN J. R., STROUNINA E. V., MARES D. J., 2009: Water movement into dormant and non-dormant wheat (*Triticum aestivum*) grains. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1619-1631. ISSN (electronic) 1460-2431.
48. RÜCKSCHLOSS L., HANKOVÁ A. & VALČUHOVÁ D., 2011: *Quo vadis šlachtenie pšenice*. Pôdohospodársky poradenský systém, [cit. 2015-03-20], dostupné na: [http://old.agroporadenstvo.sk/rv/obilniny/psenica\\_slachtenie.htm](http://old.agroporadenstvo.sk/rv/obilniny/psenica_slachtenie.htm)
49. ŠÁRKA E. & BUBNÍK Z., 2010: Morfologie, chemická struktura vlastnosti a možnost využití pšeničného B-škrobu. *Chemické listy*, 104: 318-325. ISSN 1213-7103.

50. ŠIPLÁKOVÁ T., 2008: *Ozimá pšenice – vliv podmínek pěstování na výnos vybraných odrůd*. Bakalářská práce (in MS, dep. Knihovna MENDELU v Brně.), Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 73 s.
51. ŠKORPÍK M. & ŠAŠEK A., 1980: Charakteristika vybraných linií barevné pšenice elektroforézou bílkovin. *Sborník ÚVTIZ Genetika a Šlechtění*, 16 (3): 193–200. ISSN 0036-5378.
52. ŠTIASNA K., PRESINSZKÁ M., VYHNÁNEK T., TROJAN V., MRKVICOVÁ E., HŘIVNA L. & HAVEL L., 2014: Alelická variabilita lokusu *Glu-A3* pre nízkomolekulárne podjednotky glutenínov pšenice, s. 237–240. In: BADALÍKOVÁ B., BARTLOVÁ J., (eds): *Úroda 12/2014. Odborná příloha časopisu*. Agrární komora ČR: 532 s. ISSN 0139-6013.
53. TRANQUILLI G., HEATON J., CHICAIZA O., DUBCOVSKY J., 2002: Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Science*, 42(6): 1812-1817. ISSN 0011-183X.
54. TROJAN V., MUSILOVÁ M., VYHNÁNEK T., HAVEL L., 2010: The genetic variability of coloured grain wheat collection, s. 845. In: ŠKARPA P. (eds): *MendelNet 2010. Proceedings of International Ph.D. Students Conference 24th of November 2010*, Agronomická fakulta Mendelovi univerzity v Brně, Brno, 1013 s. ISBN 978-80-7375-453-2.
55. TSUDA T., HORIO F. & OSAWA T., 1998: Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33(6): 576–583. ISSN 0024-4201.
56. URBANO M., MARGIOTTA B., COLAPRICO G. & LAFIANDA D., 2002: Waxy proteins in diploid, tetraploid and hexaploid wheats, *Plant Breeding*, 121(6): 465-469. ISSN (electronic) 1439-0523.
57. VANZETTI L. S., PFLÜGER L. A., RODRÍGUEZ-QUIJAMO M., CARRILLO J. M. & HELGUERA M., 2009: Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(1): 1-9. ISSN 0717-3458.

58. WANG L., LI G., PENA R. J., XIA X. & HE Z., 2010: Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 51 (3): 305-312. ISSN (electronic) 1095-9963.
59. WHITE J. & COOKE R. J., 1992: A standard classification system for the identification of barley varieties by electrophoresis. *Seed Science Technology*, 20(1): 663–676. ISSN (electronic) 1819-5717.
60. WILLIAMS J. G., KUBELÍK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. & TINGEI. S. V., 1990: DNA polymorphism amplified arbitrary primer useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531–6535. ISSN (electronic) 1362-4962.
61. YAMAMORI M. & QUYNH N. T., 2000: Differential effects of Wx-A1,-B1 and-D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1): 32-38, ISSN 0040-5752.
62. ZEVEN, A. C., 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56(3): 243–258. ISSN (electronic) 1573-5060.
63. ZHANG X., JIN H., LIU D., LI G., XIA X., HE Z., ZHANG A., 2012: Composition and functional analysis of low-molecular-weight glutenin alleles with Aroona near-isogenic lines of bread wheat. *BMC Plant Biology*, 12(1): 243–258. ISSN 1471-2229.
64. ZHENG Q., LI B., MU S., ZHOU H. & LI Z., 2006: Physical mapping of the blue-grained gene(s) from *Thynopirum ponticum* by GISH and FISH in a set of translocation lines with different seed colors in wheat. *Genome*, 49(9): 1109–1114. ISSN (electronic) 1480-3321.
65. ZIMOLKA J., et al. (ed.) 2005: *Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna*, 1. Vyd., Profi press, s. r. o., Praha 5, 180 s. ISBN 80-86726-09-6.
66. ZIMOLKA, J. et al. (ed.), 2000: *Speciální produkce rostlinná – Rostlinná výroba: (Polní a zahradní plodiny, základy pícninářství)*. 1. vyd., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 245 s. ISBN 80-7157-451-1.

## 8 SEZNAM OBRÁZKU

Obr. 1 <i>Fylogeneze pšenice seté</i> .....	13
Obr. 2 <i>Model zrna pšenice ukazující primární strukturu obilky</i> .....	16
Obr. 3 <i>Struktura antokyanidinu</i> .....	20
Obr. 4 <i>Purpurová pšenice s vysokým obsahem antioxidantů</i> .....	22
Obr. 5 <i>Zrno modré pšenice</i> .....	24
Obr. 6 <i>Chleba upečený z celozrnné mouky červené a bílé pšenice</i> .....	25
Obr. 7 <i>PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3f</i> .....	37
Obr. 8 <i>PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3g</i> .....	37
Obr. 9 <i>PCR produkty Pina-D1a</i> .....	39
Obr. 10 <i>PCR produkty Pinb-D1a (423 bp) a Pinb-D1b (232 bp)</i> .....	39
Obr. 11 <i>PCR produkty Pinb-Da (236 bp) a Pinb-Dd (423 bp)</i> .....	39
Obr. 12 <i>PCR produkty Wx-A1, Wx-B1 a Wx-D1</i> .....	42

## 9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 <i>Přehled genotypů Triticum aestivum použitých pro analýzy</i> .....	29
Tab. 2 <i>Alelově specifické PCR markery pro identifikaci Glu-A3</i> .....	31
Tab. 3 <i>Primery a velikost jejich produktů pro analýzu lokusu Pina a Pinb</i> .....	32
Tab. 4 <i>Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu Waxy</i> .....	32
Tab. 5 <i>Složení mastermixu (složení pro jeden vzorek)</i> .....	32
Tab. 6 <i>Komponenty pro přípravu 1% agaróзовého gelu</i> .....	33
Tab. 7 <i>Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Glu-A3</i> .....	36
Tab. 8 <i>Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Pina a Pinb</i> .	38
Tab. 9 <i>Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Wx-B1, Wx-D1 a Wx-A1</i> .....	41