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

VLIV TEPLOTY A SUCHA NA OBSAH PROTEINŮ GLIADINOVÉ A GLUTENINOVÉ FRAKCE U ČTYŘ ODRŮD PŠENICE

IMPACT OF TEMPERATURE AND DROUGHT ON GLIADINS AND GLUTENINS CONTENTS IN FOUR VARIETIES OF WHEAT

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Bc. Teresa Tomasz
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1069/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka:	**Bc. Teresa Tomasz**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce:	**PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Akademický rok:	2016/17

Název diplomové práce:

Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce u čtyř odrůd pšenice

Zadání diplomové práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu teploty a sucha na kvalitu pšeničného zrna. Zvláště se zaměřit na vliv teploty a sucha na celkový obsah dusíkatých látek v mouce, kvalitu lepku, složení a obsah lepkových bílkovin.
V experimentální části sledovat vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Teresa Tomasz student(ka)	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem vysoké teploty a nedostatku vody na obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce u čtyř odrůd pšenice ozimé: Bohemia, Tobak, Pannonia a odrůdy Syria s označením S46 (IG142780). Vzorky byly kultivovány při 26, 29, 32, 35, 38 a 41 °C v době kvetení při kontrolních zavlažovacích podmínkách (s vlhkostí půdy vyšší než 70 %) nebo při stresu sucha (s vlhkostí půdy nižší než 30 %). Pro separaci gliadinových proteinů byla použita metoda A-PAGE a gluteninové proteiny byly separovány metodou SDS-PAGE. Kvantifikace proteinů byla provedena počítačovou denzitometrií. Byl zjištěn významný vliv genotypu na lepkové proteiny. U odrůdy Pannonia byl vysoký obsah γ- a ω5-gliadinů a LMW i HMW gluteninů, ale nízký obsah ostatních gliadinových frakcí. Opačně tomu bylo u ostatních odrůd. Vlivem teploty, stejně jako vlivem sucha, došlo ke zvýšení obsahu všech lepkových frakcí, zejména HMW gluteninů, ω1,2-gliadinů a celkových gliadinů. Největší nárůst lepkových frakcí vlivem sucha byl pozorován u odrůdy Syria. U ostatních odrůd současné působení sucha a vysokých teplot způsobilo pokles obsahu gliadinů, ale nárůst obsahu gluteninů. Sucho při vysokých teplotách snížilo poměr gliadiny/gluteniny, nejvýznamněji u odrůdy Bohemia. Vlivem teploty tento poměr narůstal, zejména u odrůdy Tobak. U odrůdy Syria neměly žádné stresové podmínky vliv na poměr gliadiny/gluteniny.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with an influence of high temperature and water shortage on the protein content of gliadin and glutenin fractions in four varieties of winter wheat: Bohemia, Tobak, Pannonia and var. Syria with designation S46 (IG142780). The crop was grown at 26, 29, 32, 35, 38 and 41 °C during anthesis under control irrigation treatment (with soil moisture higher than 70 %) or under drought stress (with soil moisture lower than 30 %). To separate gliadins, the A-PAGE method was used, and glutenins were separated by SDS-PAGE method. Proteins were quantified by computer densitometry. Significant influence of genotype on the gluten proteins was found. Variety Pannonia has high content of γ-, ω5-gliadins, LMW and HMW glutenins, but low content of other gliadin fractions. It was the opposite in the other varieties. Due to temperature, as well as drought, there was an increase in the content of all gluten fractions, especially of HMW glutenins, ω1,2-gliadins and total gliadins. The largest increase in the gluten fractions due to drought was observed in Syria variety. In other varieties simultaneous exposure to drought and heat caused decrease in gliadin content, but increase in glutenin content. Drought at high temperatures reduced gliadin-to-glutenin ratio, mostly in Bohemia variety. This ratio has increased due to the temperature, especially in Tobak variety. For Syria variety, no effect of stress conditions was found on gliadin-to-glutenin ratio.

KLÍČOVÁ SLOVA

pšenice, gliadiny, gluteniny, lepek, teplo, sucho, genotyp, A-PAGE, SDS-PAGE

KEYWORDS

wheat, gliadins, glutenins, gluten, heat, drought, genotype, A-PAGE, SDS-PAGE

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.

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 Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT v Brně.

.....

podpis autora

Poděkování: Velmi ráda bych poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D., za veškerou pomoc, podporu, cenné rady a připomínky, za věnovaný čas a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Karlu Klemovi, PhD. za poskytnuté rady a užitečné konzultace při zpracování výsledků.

OBSAH

1 ÚVOD ... 7
2 TEORETICKÁ ČÁST ... 8
2.1 Globální klimatická změna ... 8
2.2 Vliv globální klimatické změny na rostliny ... 10
2.2.1 Vliv na anatomii rostlin ... 10
2.2.2 Vliv na fotosyntézu, fotorespiraci a vodivost průduchů ... 10
2.2.3 Vliv na růstové hormony ... 11
2.2.4 Vliv na metabolismus kyslíku ... 11
2.3 Pšenice a její význam pro výživu lidstva ... 12
2.4 Morfologie pšeničného zrna ... 13
2.5 Technologická jakost pšenice ... 14
2.5.1 Objemová výtěžnost (Rapid Mix Test) ... 15
2.5.2 Obsah dusíkatých látek v sušině ... 15
2.5.3 Zelenyho sedimentační test ... 15
2.5.4 Číslo poklesu ... 16
2.5.5 Objemová hmotnost ... 16
2.5.6 Vaznost mouky ... 16
2.5.7 Doplňková kritéria ... 16
2.6 Pšeničné proteiny ... 17
2.6.1 Albuminy a globuliny ... 17
2.6.2 Lepek ... 17
2.6.2.1 Gliadiny ... 19
2.6.2.2 Gluteniny ... 21
2.7 Vliv globální klimatické změny na pšenici ... 22
2.7.1 Vliv na škrob v zrnu ... 23
2.7.2 Vliv na bílkoviny v zrnu ... 23
2.7.3 Vliv na kvalitu pšenice ... 23
2.8 Metody stanovení lepkových proteinů ... 24
2.8.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ... 24
2.8.1.1 SDS-PAGE ... 25
2.8.1.2 A-PAGE ... 25
2.8.1.3 2-D elektroforéza ... 26

2.8.2 Kapilární elektroforéza ... 26
2.8.3 Chromatografické metody ... 26
2.8.4 Hmotnostní spektrometrie ... 27
2.8.5 ELISA ... 27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 28
3.1 Materiál ... 28
3.2 Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE ... 29
3.2.1 Přístroje ... 29
3.2.2 Chemikálie ... 29
3.2.3 Příprava roztoků ... 29
3.2.4 Příprava vzorků ... 30
3.2.5 Příprava polyakrylamidového gelu ... 30
3.2.6 Elektroforéza ... 30
3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin ... 31
3.3 Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE ... 31
3.3.1 Přístroje ... 31
3.3.2 Chemikálie ... 31
3.3.3 Příprava roztoků ... 32
3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů ... 32
3.3.3.2 Ostatní roztoky ... 32
3.3.4 Příprava vzorků ... 33
3.3.5 Příprava gelů ... 33
3.3.5.1 Separační gel ... 33
3.3.5.2 Zaostřovací gel ... 34
3.3.6 Elektroforéza ... 34
3.3.7 Zviditelnění bílkovin ... 34
3.4 Vyhodnocení gelů ... 35
3.5 Statistické zpracování ... 35
4 VÝSLEDKY ... 36
5 DISKUSE ... 54
6 ZÁVĚR ... 57
7 POUŽITÁ LITERATURA ... 58
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ... 69

1 ÚVOD

Současné klima je charakteristické nárůstem extrémních meteorologických jevů. Během působení těchto jevů jsou rostliny vystaveny několika stresovým podmínkám, které přímo ovlivňují jejich metabolismus. Mezi stresové faktory, u kterých se předpokládají největší následky na rozvoj rostlin, patří zejména působení vysokých teplot a sucha. Z hlediska zabezpečení výživy narůstající lidské populace je důležité sledovat vliv klimatických změn zejména na zemědělské plodiny.

Jednou z nejvýznamnějších hospodářských plodin je pšenice, která představuje hlavní zdroj živin pro většinu světové populace. Z pšeničného zrna se získává mouka – hlavní surovina pro výrobu základních potravin, jako jsou pekárenské produkty, chléb, těstoviny a nudle.

Kvalitu pšeničného těsta a potažmo i chleba významně ovlivňují pšeničné proteiny. Hlavními bílkovinami pšeničného zrna jsou lepkové proteiny, tvořené dvěma skupinami: monomerními gliadiny a polymerními gluteniny. Lepek poskytuje pšeničné mouce specifické vlastnosti pro výrobu kynutých těst. Ovlivňuje reologické a viskoelastické vlastnosti těsta, jeho objem a kvalitu konečného produktu. Na tyto parametry má rozhodující vliv vzájemný poměr gliadinů a gluteninů, jejich obsah a zastoupení jednotlivých proteinů gliadinové a gluteninové frakce.

Navzdory množství výzkumů zabývajících se vlivem klimatických změn na pšenici jsou účinky vysokých teplot a sucha na pšeničné bílkoviny stále málo známé. Výzkumy totiž často přináší protichůdné závěry.

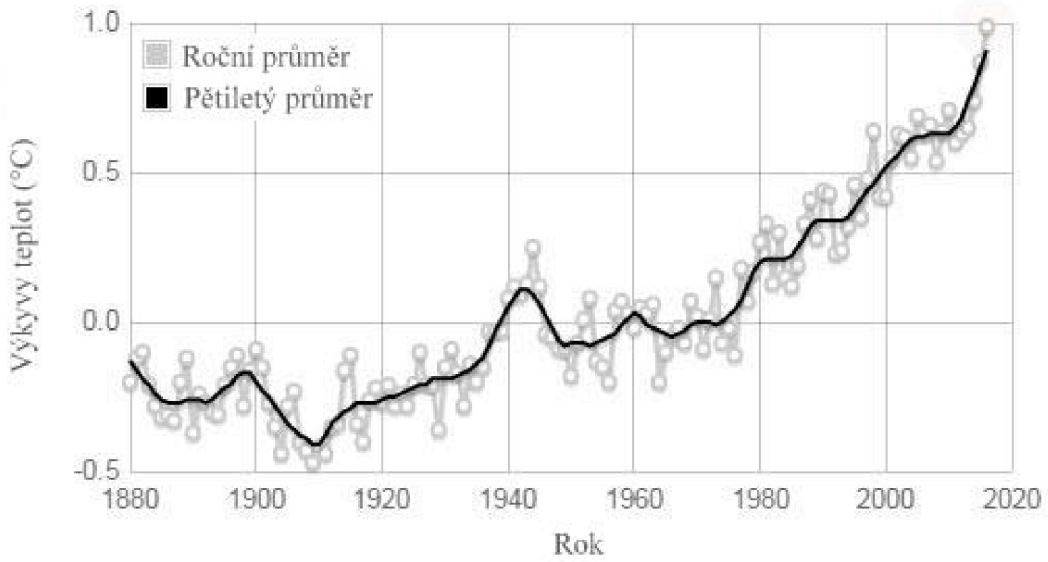
Cílem této práce je sledovat vliv limitujících faktorů teploty a sucha na lepkové bílkoviny čtyř odrůd pšenice ozimé. Pro stanovení gliadinů byla použita kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE) a gluteniny byly stanoveny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE). Tato práce se zabývá rovněž rozdíly ve frakcích lepkových bílkovin mezi čtyřmi vybranými odrůdami a odpověďmi jednotlivých odrůd na stresové podmínky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Globální klimatická změna

Globální klimatická změna může být definována jako dlouhodobá odchylka klimatických parametrů Země (jako teploty, srážek, pohybu vzdušných mas) od průměrů a trendů, kterými se vyznačovalo klima Země v minulosti. Změny klimatu jsou přirozeným jevem, v historii naší planety však tyto změny nastávaly velmi pozvolna, desítky až stovky tisíc let [1].

V současné době jsou však tyto změny viditelné za velmi krátké období a jsou způsobovány činností naší civilizace, rozvojem průmyslu, zemědělství, lesnictví a transportu. Podle údajů Mezivládního panelu pro změny klimatu IPCC se teplota na Zemi za období 1880–2012 zvýšila o 0,85 °C [2]. Tento nárůst je více citelný při denních minimech než maximech, což vede ke snížení denního rozpětí teplot [3]. Vývoj teplot na Zemi v posledních letech je graficky znázorněn na obrázku 1. Od začátku 20. století došlo také ke zvýšení dešťových srážek ve středních a větších zeměpisných šířkách, ale naopak ke snížení srážek v tropických a subtropických oblastech. Vzhledem k tomu lze očekávat změny i v extrémních meteorologických jevech, což by mělo obávaný dopad na hospodářský, sociální a přírodní systém [4].

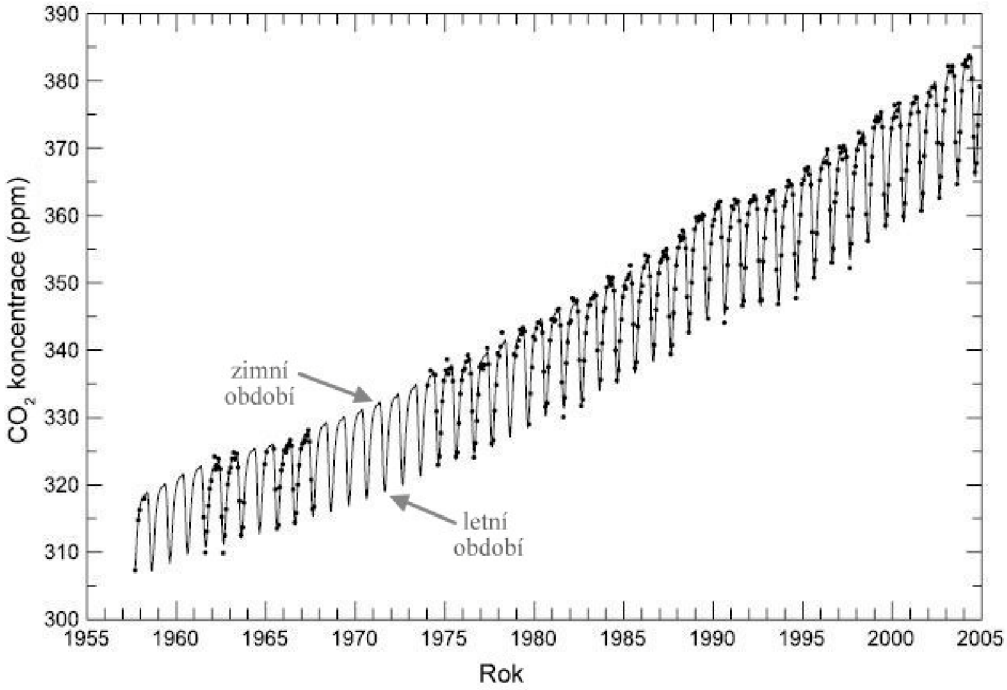


Obr. 1: Graf znázorňující teplotní změny na Zemi vzhledem k průměrným teplotám v letech 1951-1980. Převzato a upraveno podle [5].

Podnebí na Zemi je podstatně ovlivňováno tzv. skleníkovými plyny. Mezi skleníkové plyny s největším dopadem na radiační bilanci Země patří hlavně oxid uhličitý (47 %) spolu s methanem (27 %), freony (10 %), oxidem uhelnatým a dalšími sloučeninami uhlíku (9 %) a oxidy dusíku (4 %) [6]. Tyto plyny v atmosféře propouští krátkovlnnou složku slunečního záření, ale jsou méně propustné pro dlouhovlnné infračervené záření emitované zemským povrchem. Tato dlouhovlnná složka záření je tak zadržována v nižších hladinách atmosféry a nedochází k jejímu úniku do vesmíru. Přirozeně tento proces udržuje teplotu na Zemi kolem +15 °C, bez něj by se teplota na Zemi pohybovala okolo −18 °C. Pokud je ale v současné době narušována přirozená koncentrace skleníkových plynů a jejich zastoupení, dochází k oteplování přízemních vrstev ovzduší, pevnin a oceánů [1]. Ohřevem oceánů a pevnin

dochází k odpařování vody a ke zvýšení obsahu vody v atmosféře. Efekt se tímto ještě zvyšuje, jelikož má vodní pára stejné účinky a funkci jako ostatní skleníkové plyny [7].

Mezi mnohé vědecké skupiny, které se zabývají problematikou globálního oteplování a jeho přímého spojení s lidskou činností, patří Keeling a kol. [8] s dlouhodobým mezinárodním výzkumem. V období posledních padesáti let minulého století došlo ke zvýšení emisí CO_2 spalováním fosilních paliv z 2,3 miliard tun uhlíku za rok (údaje z roku 1953) na 7,3 miliard tun uhlíku za rok (v roce 2003). Od začátku průmyslové revoluce vzrostla koncentrace CO_2 v atmosféře o 40 % na současných 405,92 ppm ($\mu mol \cdot mol^{-1}$) a je nejvyšší za posledních 650 tisíc let a stále stoupá [5]. To dokazují hodnoty meziročního nárůstu koncentrace CO_2 v atmosféře, které v 80. a 90. letech minulého století činily průměrně 1,5 $\mu mol \cdot mol^{-1}$ za rok, zatímco mezi lety 2000 až 2006 se koncentrace CO_2 v atmosféře zvyšovala průměrně až o 1,93 $\mu mol \cdot mol^{-1}$ za rok [9]. Na obrázku 2 lze pozorovat systematický nárůst koncentrace CO_2 v atmosféře i její pravidelné kolísání v průběhu roku. S nástupem jara na severní polokouli dochází k rozvoji vegetace a tím k poklesu obsahu CO_2 v ovzduší a naopak v průběhu podzimu na severní polokouli se zpomaluje fotosyntéza u rostlin a obsah CO_2 v atmosféře stoupá [10].



Obr. 2: Sezónní koncentrace CO_2 v letech 1957-2003 v oblasti Point Barrow na Aljašce. Převzato a upraveno podle [8].

Ale znatelný není jen nárůst oxidu uhličitého v atmosféře. Od průmyslové revoluce, kdy koncentrace methanu v ovzduší činila kolem 722 ppb ($nmol \cdot mol^{-1}$), vzrostl obsah methanu v atmosféře o 150 %, na 1803 ppb (v roce 2011) a koncentrace oxidu dusného se zvýšila o 20 %, z 270 ppb (v roce 1750) na 324,2 ppb (v roce 2011) [2]. V průběhu 80. let 20. století se koncentrace freonů (CFC) zvýšila o 40 % [11], ale díky úspěšným opatřením vyplývajícím z Montrealského protokolu se podařilo nárůst CFC zastavit [2].

I v dávné minulosti planety docházelo ke globálním klimatickým změnám v důsledku změn koncentrace CO_2 v atmosféře. Přechod mezi dobou ledovou a meziledovou byl spojen s nárůstem koncentrace CO_2 a naopak nástup doby ledové byl doprovázen poklesem obsahu CO_2 v atmosféře. Tyto změny nebyly neobvyklé, souvisely s pomalými změnami biologické produktivity, alkality a pohybů oceánů, se stupněm pokrytí ledovců a s kvalitou a změnami korálových útesů. V dnešní době tedy nenastává neznámý jev. Problémem je ale rychlost, s jakou nastupuje a neustálé pokračování uvolňování CO_2 do ovzduší v důsledku lidské činnosti [10].

2.2 Vliv globální klimatické změny na rostliny

Předpokládá se, že v důsledku klimatických změn budou vysoké teploty a období sucha představovat čím dál tím větší nároky na produkci potravin, jelikož přímo ovlivňují metabolismus rostlin.

Působením velmi vysokých teplot dochází k vážným poškozením buněk a dokonce k rychlé buněčné smrti. Při mírně vysokých teplotách dochází k těmto změnám až při dlouhodobém vystavení nepříznivým podmínkám. Mezi přímé následky působení vysokých teplot patří denaturace a agregace proteinů a zvýšená propustnost lipidových membrán. Nepřímo je ovlivněna aktivita enzymů v chloroplastech a mitochondriích jejich inaktivací, dále dochází k inhibici syntézy proteinů, k jejich degradaci a ke ztrátě membránové integrity. Krátká expozice rostlin vysokým teplotám v průběhu fáze plnění semena může urychlit stárnutí, snížit počet a váhu semen a zredukovat výtěžnost. Když jsou rostliny vystaveny vysokým teplotám krátce před nebo během kvetení, může být následkem sterilita rostlin. Jen pár dnů vysokých teplot (30–35°C) během fáze kvetení luštěnin může způsobit velké ztráty vlivem opadu květů a zhroucení lusků. Podobně u obilovin dochází vlivem teplot k narušení reprodukční fáze, což vede ke snížení výnosů. Podle dostupných studií se zdá, že odpovědi rostlin na vysoké teploty se liší podle druhu rostlin a genotypu, jak rovněž stádia, ve kterém se rostliny nachází během působení teplotního stresu [12].

2.2.1 Vliv na anatomii rostlin

Změny v anatomii rostlin jsou podobné při působení vysokých teplot i sucha. Na úrovni celé rostliny dochází ke zmenšování velikosti buněk, uzavírání průduchů a omezení vodních ztrát. Zvyšuje se hustota průduchů a trichomů a velikost xylémových cév kořínků i výhonků [13]. Uvnitř buněk dochází k modifikacím chloroplastů, což vede k významným změnám ve fotosyntéze. Mění se struktura thylakoidů, snižuje se jejich počet v granech nebo dochází k jejich bobtnání. Tyto změny narušují anténní strukturu fotosystému II a je tak omezena aktivita fotosyntézy a respirace [12].

2.2.2 Vliv na fotosyntézu, fotorespiraci a vodivost průduchů

Je známo, že při působení vysokých teplot dochází k inhibici fotosyntézy. Tento jev nastává běžně u rostlin v tropických a subtropických oblastech a periodicky u rostlin rostoucích v mírném podnebí. Inhibice fotosyntézy je reverzibilní při teplotách mírně vyšších od optimálních teplot. Ale poškození fotosyntetického aparátu vlivem těžkého teplotního stresu je nevratné. Za nejvíce termolabilní složku fotosyntetického aparátu je považován fotosystém II, což je nejspíše způsobeno vlastnostmi thylakoidních membrán, kde se fotosystém II

nachází. Teplota ovlivňuje rovněž aktivitu enzymu Rubisco a to tak, že snižuje aktivovaný stav Rubisco, čímž dochází k inhibici fixace CO_2 a tedy inhibici fotosyntézy [12, 14].

Enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa) katalyzuje první krok ve dvou kompetitivních drahách: fotosyntéze a fotorespiraci, jejichž rychlost závisí na aktivitě karboxylasy, resp. oxygenasy. Aktivita karboxylasy, která katalyzuje fixaci CO_2 na substrát ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP), se s teplotou zvyšuje, ale afinita Rubisco k CO_2 a rozpustnost CO_2 se snižuje. Aktivita oxygenasy, katalyzující oxidaci RuBP, s teplotou roste, jelikož dochází ke snížení specifity Rubisco k CO_2 v porovnání k O_2, stejně jako ke snížení rozpustnosti CO_2, ale ne O_2 [14, 15]. Při vysokých teplotách navíc dochází ke ztrátě CO_2 z fotorespirace, což přispívá ke snížení čisté fotosyntézy. Mění se také schopnost regenerace RuBP narušením elektronového transportu a inaktivací enzymů zapojených ve tvorbě O_2 ve fotosystému II. Samotná vysoká koncentrace CO_2 redukuje aktivovaný stav Rubisco bez ohledu na teplotu. Teplotní šok způsobuje snížení obsahu chlorofylů, rozpustných proteinů a proteinů vážících Rubisco [12, 14].

Teplotní stres je často doprovázen stresem sucha. Deficit vody ovlivňuje průběh fotosyntézy stejně jako vysoké teploty. Navíc inhibuje fotosyntézu uzavíráním průduchů. Obsah vody v listech koreluje s vodivostí průduchů a vše je regulováno signální molekulou – kyselinou abscisovou (ABA), která je při nedostatku vody transportována z kořenů do listů, kde uzavírá průduchy, aby tak nedocházelo k dalšímu úbytku vody odpařováním [16].

2.2.3 Vliv na růstové hormony

Rostliny mají své mechanizmy pro aklimatizaci na sucho a vysoké teploty v podobě hormonálních regulací [12].

Kyselina abscisová (ABA) a ethylen patří mezi stresové hormony a jsou zapojeny v regulacích metabolismu jako signální molekuly. Různé stresové podmínky z prostředí, včetně vysokých teplot, vedou ke zvýšení množství ABA. Účinkem ABA v odpovědi na stres je modifikace genové exprese. ABA také zprostředkovává adaptaci rostlin při vysychání pomocí regulace několika genů. Zajišťuje rostlinám termotoleranci svým zapojením do biochemických drah nezbytných pro přežití při působení stresových faktorů sucha a vysokých teplot. Teplotní stres působí na produkci ethylenu různě podle druhu rostliny. Ethylen reguluje mnoho procesů zapojených v růstu či dozrávání – od klíčení až po kvetení a vývoj plodu. Jeho působení zvyšuje toleranci na stresové podmínky prostředí. Mezi další hormony zapojené v odezvách rostlin na teplotní stres patří kyselina salicylová (SA) a její deriváty [12]. SA zvyšuje termotoleranci rostlin, čehož se někdy využívá při aplikaci postřiku kyseliny sylicylové na listy [17].

Účinky giberelinů a cytokininů na termotoleranci rostliny jsou opačné než účinky ABA. Vysoká teplota a sucho způsobují snížení obsahu giberelinů a cytokininů v rostlině [12].

2.2.4 Vliv na metabolismus kyslíku

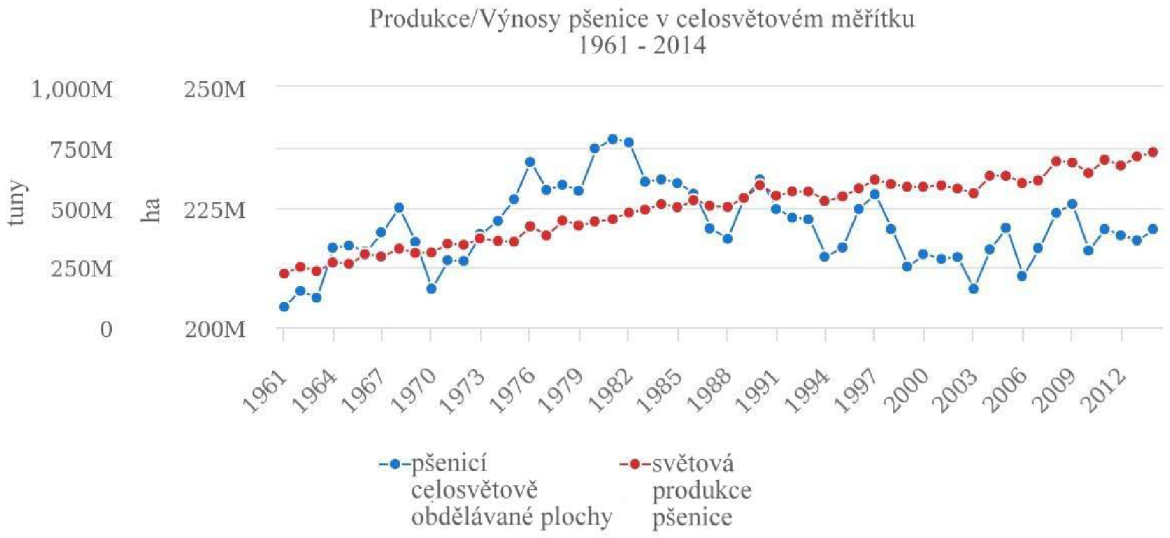
Při dehydrataci tkání může tedy teplotní stres vyvolat oxidativní stres. Dochází při tom k poruchám metabolismu kyslíku při elektronovém transportu ve fotosyntetickém řetězci a ke vzniku aktivních forem kyslíku (AFK), jako jsou sigletový kyslík $^1O_2$, superoxidový radikál O^{2-}, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál OH^-. Aktivní formy kyslíku způsobují oxidaci lipidových membrán a pigmentů, což vede ke ztrátě membránové semipermeability

a modifikaci membránových struktur. AFK reagují také s DNA, aminokyselinami a proteiny. Dochází nejen k narušení jejich struktur, ale rovněž ke vzniku dalších reaktivních produktů: peroxidů lipidů a thiolových radikálů. Při intenzivních stresových podmínkách může dojít ke kaskádovým reakcím vedoucím až k buněčné smrti [12, 16].

Rostliny si vyvinuly ochranné detoxikační mechanizmy, které se dělí na enzymatické a neenzymatické. Mezi enzymatické antioxidanty patří enzymy jako je superoxid dismutasa, askorbát peroxidasa, glutation reduktasa, monodehydroaskorbát reduktasa, peroxidasa a katalasa. Neenzymatickými antioxidanty jsou např. flavonoidy, antokyany, karotenoidy a kyselina askorbová. Tyto detoxikační systémy jsou u vyšších rostlin rozloženy mezi všemi fotosyntetizujícími buňkami, aby je chránily před škodlivými oxidačními pochody. Například nadměrná exprese superoxid dismutasy ovlivňuje celou řadu fyziologických jevů, zahrnujících odstranění H_2O_2, oxidaci toxických redukčních činidel, biosyntézu a degradaci ligninů v buněčné stěně, katabolismus auxinů, ochranné reakce na poranění, obranu před patogeny nebo hmyzem a některé respirační procesy. Exprese a aktivace askorbát peroxidasy je spojena s odezvami rostlin na teplotní stres. Snížení antioxidační aktivity při stresových podmínkách vede k vyšším hladinám aktivních forem kyslíku a k poškození buněk [12, 16].

2.3 Pšenice a její význam pro výživu lidstva

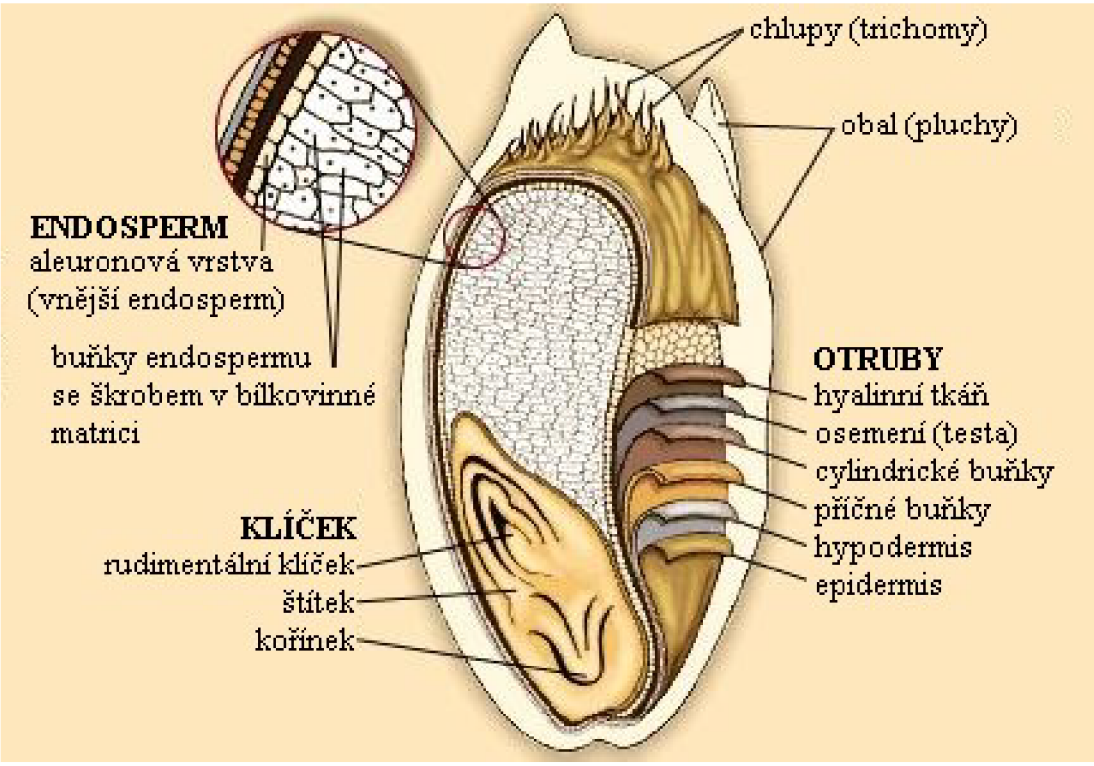
Pšenici lze považovat za jednu z nejdůležitějších plodin pro výživu lidstva a hospodářských zvířat. Její zrna mohou být rozemleta na mouku, semolinu atd. a tvořit tak základní ingredience chleba a dalších pekárenských produktů, těstovin a dalších potravin. Pšenice proto představuje hlavní zdroj živin pro většinu světové populace. Nelze se proto divit, že se její produkce neustále zvyšuje. Od zelené revoluce, kdy se v roce 1961 celosvětově vypěstovalo 222 milionů tun pšenice, stoupla celosvětová produkce pšenice na 729 milionů tun pšenice v roce 2014, jak dokládá graf na obrázku 3 [18].



Obr. 3: Celosvětová produkce pšenice v letech 1961 až 2014. Převzato a upraveno podle [18].

2.4 Morfologie pšeničného zrna

Zrna obilovin se liší hlavně tvarem, podílem jednotlivých vrstev a tím, zda má zrno pluchy nebo je nahé. Pluchatá zrna mají přirostlé pluchy, musí se tedy před zpracováním loupat, obrušovat a pluchy se odstraňují i s klíčky. Mlácením nahých zrn lze jednoduše oddělit obal od samotného zrna. Pšenice patří mezi obilovinu s nahými zrny, spolu s žitem a kukuřicí. Pluchatá zrna mají ječmen, oves nebo rýže [19]. Skladba pšeničného zrna je znázorněna na obrázku 4.



Obr. 4: Morfologie pšeničného zrna – vnější obalové vrstvy a vnitřní struktura zrna. Upraveno podle [20].

Nejvrchnější obalové vrstvy pšeničného zrna, nazývané oplodí, jsou tvořeny nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály, převážně celulosou. Díky tomu představují pro zrno ochrannou vrstvu před mechanickým poškozením a krátkodobými účinky vody a škodlivých látek. Pod oplodím se nachází osemení, které ve svých buňkách obsahuje barviva, a udává tak vnější barevný vzhled zrna. Některé následující vrstvy obsahují polysacharidy, které jsou schopné bobtnat a vázat vodu a udržovat tak rovnováhu vlhkosti zrna. Všechny tyto zmíněné vrstvy se při mletí stávají součástí otrub [19].

Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází aleuronová vrstva, označována někdy jako vnější endosperm. Je to jednoduchá vrstva velkých buněk, které obsahují vysoký podíl bílkovin (téměř trojnásobek obsahu bílkovin v endospermu) a také nejvyšší obsah minerálních látek ze všech buněk zrna. Proteiny a enzymy obsažené v aleuronové vrstvě hrají důležitou roli při procesu klíčení. Podle podmínek mletí zůstává aleuronová vrstva ulpělá na otrubách nebo přechází do mouk a zvyšuje tak obsah bílkovin a minerálii (popela) v mouce. Stanovení obsahu popela v mouce je jednou z hlavních metod kontroly vymletí zrna ve mlýně [19, 21].

Uvnitř zrna se nachází klíček a hlavní zásobní tkáň – endosperm. Klíček obsahuje vysoké množství proteinů, lipidů, minerálních látek a vitamínů, a rychle podléhá oxidačním a enzymatickým změnám. Proto se vždy před mletím odstraňuje tzv. broušením a špicováním, aby nedošlo ke zhoršení senzorické kvality mouky a pekařského výrobku [19, 22]. Endosperm tvoří největší část zrna a je zdrojem zásobních látek pro klíčící rostlinu. Kromě škrobu (75 %) se v endospermu nachází také proteiny (10–13 %), lipidy (1,5 %) a nízké množství minerálních látek a vlákniny [21, 23].

2.5 Technologická jakost pšenice

Kvalita rostlinných produktů záleží nejen na druhu a odrůdě rostliny, ale také na působení vnějších podmínek během vegetace, sklizně a skladování. U zrna rozeznáváme kvalitu hygienickou, danou přípustnými limity látek, které mohou ohrozit zdraví organizmu, a dále nutriční kvalitu, charakterizovanou přítomností výživově pozitivních složek zrna nebo zpracované mouky. O zařazení odrůdy pšenice do kategorie pšenice potravinářské rozhoduje technologická kvalita. Spolu se senzorickými vlastnostmi specifikuje využitelnost pšeničného zrna pro jednotlivé finální produkty [24, 25]. Podle ČSN 46 1100-2 [26] se pšenice potravinářská podle užití rozděluje na pšenici pekárenskou a pšenici pečivárenskou, které musí odpovídat hodnotám jakostních ukazatelů uvedených v tabulce 1. Pšenice pekárenské jsou vhodné zejména pro výrobu kynutých těst, pšenice pečivárenské pro výrobu keksů a sušenek. Ostatní pšenice mohou sloužit pro speciální použití, např. k výrobě škrobu a lihu, nebo pro krmné účely [25].

Tab. 1: Hodnoty jakostních ukazatelů podle ČSN 46 1100-2 [26].

Jakostní ukazatele	**Pšenice pekárenská**	**Pšenice pečivárenská**
vlhkost v % (*m/m*)	nejvýše 14,0	nejvýše 14,0
objemová hmotnost v $kg \cdot hl^{-1}$	nejméně 76,0	nejméně 76,0
obsah N-látek v sušině (N x 5,7) v % (*m/m*)	nejméně 11,5	nejvýše 11,5
sedimentační index – Zelenyho test (SEDI test) v ml	nejméně 30	nejvýše 25
číslo poklesu (ze zkušebního vzorku o hmotnosti 7 g) v s	nejméně 220	nejméně 220
příměsi celkem v % (*m/m*)	nejvýše 6,0	nejvýše 6,0
nečistoty celkem v % (*m/m*)	nejvýše 0,5	nejvýše 0,5

Podle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského se potravinářská pšenice rozděluje do 4 kategorií podle požadavků uvedených v tabulce 2 [24]:

- E – elitní pšenice,
- A – kvalitní pšenice,
- B – chlebová pšenice,
- C – pšenice nevhodná pro výrobu kynutých těst.

Kvalita pšenice bývá vyhodnocována podle platných metodik ČSN, ISO a ICC. Pro hodnocení pšenice se používají hodnotící kritéria rozdělená na hlavní a doplňková. Mezi hlavní parametry pro stanovení pekařské jakosti pšenice patří objemová výtěžnost (Rapid Mix Test), obsah dusíkatých látek v sušině, Zelenyho test (sedimentační index), číslo poklesu, objemová hmotnost a vaznost mouky. Doplňkovými parametry jsou obsah mokrého lepku

(nebo Gluten Index na přístroji Glutomatic), farinografické údaje (vývin těsta, stabilita těsta, pokles stability těsta), obsah popele v zrně pšenice, tvrdost zrna, hmotnost tisíce zrn a výtěžnost mouky T-550 [25, 27].

Tab. 2: Minimální požadavky na zařazení odrůd pšenice do skupin jakosti. Převzato z [24].

Jakostní skupina	**E – elitní**		**A – kvalitní**		**B – chlebová**	
Vyjádření hodnoty	absolutně	body (9-1)	absolutně	body (9-1)	absolutně	body (9-1)
Objemová výtěžnost (ml)	530	8	500	6	470	4
Obsah hrubých bílkovin (%)	12,6	6	11,8	4	11	2
Zelenyho test (ml)	49	7	35	5	21	3
Číslo poklesu (s)	286	6	226	4	196	3
Objemová hmotnost ($g \cdot l^{-1}$)	790	7	780	6	760	4
Vaznost mouky (%)	55,4	7	53,2	5	52,1	4

2.5.1 Objemová výtěžnost (Rapid Mix Test)

Objemová výtěžnost je hlavním a nejdůležitějším kritériem pro posuzování kvality potravinářských odrůd pšenice. Pro stanovení objemové výtěžnosti se provádí tzv. pekařský pokus pomocí Rapid Mix Testu (RMT), který je specifický velmi intenzivním a krátkým hnětením těsta a pokusným pečením chleba. Základem tohoto testu je měření objemu pečiva, získaného přesně definovaným postupem podle evropské směrnice ECC 2062/81 [25, 28]. Objemová výtěžnost je pak vyjádřena v ml pečiva na 100 g těsta nebo mouky [29]. V dnešní době se často používá tzv. MiniRMT zejména z důvodů snížení nákladů klasické metody [28].

2.5.2 Obsah dusíkatých látek v sušině

Obsah dusíkatých látek nebo také obsah hrubých bílkovin lze stanovit vícero způsoby. Pro rychlé stanovení je využívána nepřímá metoda blízké infračervené spektrometrie (NIR), založena na korelaci absorpce monochromatického infračerveného záření s obsahem primárních chemických vazeb (C-N, C-H, apod.) [28]. Dále lze hrubou bílkovinu stanovit pomocí Kjehldalovy metody podle ČSN ISO 1871 [29] nebo Dumasovou spalovací metodou podle ICC standardu č. 167 [27]. V obou případech se obsah hrubé bílkoviny určí jako celkový obsah dusíku vynásobený faktorem 5,7. Čím vyšší je hodnota hrubé bílkoviny, tím kvalitnější je těsto a následně i pekařský výrobek [25].

2.5.3 Zelenyho sedimentační test

Kromě obsahu bílkovin jsou ještě důležitějším faktorem pro kynutá těsta tzv. viskoelastické vlastnosti pšeničných bílkovin, umožňující fermentační procesy v těstě [25]. Sedimentační test podle Zelenyho indikuje kvalitu lepku na základě schopnosti bílkovin vázat kyselinu mléčnou, tedy bobtnat v kyselém prostředí. Metodika pro provedení Zelenyho testu je popsána v ČSN EN ISO 5529 [30]. Ze zkoušené pšeničné mouky připravené za přesně stanovených podmínek, se připraví suspenze v roztoku kyseliny mléčné a propan-2-olu s přídavkem barviva. Po určené době protřepávání a klidu se stanoví objem sedimentu vzniklého sedimentací částeček mouky. Získané výsledné číslo je sedimentační index a vyjadřuje se v mililitrech [28, 30].

V minulosti se pro hodnocení jakosti pšenice používal tzv. SDS test, tedy sedimentační test v prostředí dodecyl síranu sodného. Dnes je už méně populární, ale lze pomocí něj stanovit odolnost lepku k denaturaci v prostředí SDS [25, 28].

2.5.4 Číslo poklesu

Stanovením čísla poklesu, tedy čísla pádu dle Hagberga, lze zjistit zejména enzymatické poškození zásobních látek endospermu pšeničného zrna. Nízké hodnoty čísla poklesu indikují vysokou enzymatickou aktivitu α-amylasy, která může vyústit až v poškození lepkového komplexu, což se projevuje těžko zpracovatelným, lepivým těstem s malým objemem. Příliš vysoké hodnoty čísla poklesu také negativně ovlivňují pekařskou kvalitu mouky, jelikož indikují nízkou enzymatickou aktivitu, která vede k nízkému objemu vyschlého pečiva [25, 28]. Metodika pro stanovení čísla poklesu je popsána v normě ČSN EN ISO 3093. Aktivita α-amylasy se odhadne použitím škrobu přítomného ve vzorku jako substrát. Stanovení je založeno na schopnosti vodní suspenze mouky rychle zmazovatět ve vroucí vodní lázni a na měření ztekucení škrobu působením α-amylasy přítomné ve vzorku. Ztekucení ovlivňuje tekutost škrobového gelu a jeho odpor vůči viskozimetrickému míchadlu, a tedy čas, uváděný v sekundách, potřebný k poklesu míchadla o určenou vzdálenost [31].

2.5.5 Objemová hmotnost

Objemová hmotnost je ukazatelem mlynářské jakosti a souvisí s výtěžností mouky. Závisí na pěstitelských podmínkách, zdravotním stavu a odrůdě [25]. Stanovení objemové hmotnosti se provádí podle normy ČSN EN ISO 7971-3. Měří se hmotnost přesně definovaného objemu obilniny pomocí litrového obilního zkoušeče a vah. Objemová hmotnost se vyjadřuje v $kg \cdot hl^{-1}$ [32].

2.5.6 Vaznost mouky

Vaznost mouky udává, kolik procent vody je mouka schopna vázat. Závisí na obsahu bílkovin, poškozených škrobových zrn a polysacharidů neškrobového typu – pentosanů. Je ovlivněna také tvrdostí zrna. Odrůdy s tvrdým zrnem vykazují vyšší úroveň mechanického poškození škrobových zrn, která poté vážou větší množství vody než škrobová zrna měkkých odrůd [24, 25]. Stanovení vaznosti mouky se provádí pomocí farinografu podle ČSN ISO 5530-1. Farinograf měří točivý moment během míchání malého množství těsta dvěma protiběžnými lopatkami ve tvaru Z. Vaznost mouky se stanovuje během míchání, přidáváním vody k mouce v množství, jaké je potřebné k vytvoření těsta pevné konzistence [33].

2.5.7 Doplňková kritéria

Často se pro vyhodnocení kvality pšenice zjišťuje přítomnost příměsí či nečistot, většinou postupným ručním vytřiďováním [27]. Termíny, definice a požadavky pro příměsi a nečistoty specifikuje ČSN 46 1100-1 [34] a ČSN 46 1100-2 [26]. Dále se provádí stanovení obsahu popela v zrně pšenice, buď pomocí metody NIR nebo spalováním v peci [28, 35]. Principem stanovení hmotnosti tisíce zrn je zvážení alikvotního počtu náhodně vybraných zrn a přepočet [36]. Postupy jsou rovněž popsány v normách.

2.6 Pšeničné proteiny

Pekařská kvalita mouky a nutriční hodnota zrna jsou silně ovlivněny složením a množstvím pšeničných bílkovin [37]. Ve zralém pšeničném zrnu nachází 10 až 15 % proteinů [38]. DuPont [39] zase uvádí 8 až 20 % bílkovin v pšeničném zrnu. Rozdíly závisí zejména na odrůdě pšenice nebo na podmínkách růstu a dalších faktorech [40].

Podle studie z roku 1924 provedené Osbornem [41], rozdělujeme proteiny obsažené v zrnu podle rozpustnosti na albuminy rozpustné ve vodě, globuliny rozpustné ve zředěných roztocích soli, gliadiny rozpustné ve vodném roztoku alkoholu a gluteniny rozpustné v kyselých a alkalických roztocích. Asi 80 % pšeničných proteinů tvoří lepkové proteiny, tedy gliadiny a gluteniny, výhradně zásobní proteiny. Zbylou část pak vyplňují albuminy a globuliny, plnící převážně metabolickou funkci, ale i funkci zásobních proteinů [38, 42]. Mezi pšeničné proteiny literatura někdy zařazuje pátou frakci, tzv. amfifilní proteiny vázané na lipidy a tvořící složku buněčných membrán a hydrofobních vrstev [43].

2.6.1 Albuminy a globuliny

Albuminy a globuliny patří mezi nelepkové bílkoviny. Ze všech proteinů pšeničného zrna přispívají přibližně z 50 % k celkovému obsahu lysinu, což je u obilovin limitní esenciální aminokyselina [44]. Dále mají také vysoký obsah argininu a histidinu [45]. Většinou jsou zapojeny jako enzymy v metabolických procesech. Některé bílkoviny z této skupiny byly identifikovány jako transferasy lipidů nebo inhibitory trypsinu a α-amylasy s obrannou funkcí rostliny. Kromě toho některé vysokomolekulární albuminy a některé globuliny, např. triticiny, jsou považovány za zásobní proteiny [46, 47].

V této skupině bílkovin jsou známi původci potravinových alergií způsobující průjmy a zvracení. Inhibitory trypsinu a α-amylasy vyvolávají astma postihující zejména pekaře a mlynáře [47].

2.6.2 Lepek

Pšeničný lepek byl vyizolován už v roce 1754 J. B. Beccarim a od té doby je předmětem mnoha výzkumů [48].

Ze všech obilovin může pouze pšeničná mouka tvořit s vodou trojrozměrné viskoelastické těsto. Charakteristické reologické vlastnosti poskytuje pšeničné mouce právě lepkový komplex. Často se jako lepek označují pšeničné bílkoviny gliadiny a gluteniny, které tvoří asi 75–85 % lepku, ale kromě nich jsou v lepku obsaženy i další látky: 3,5–6,8 % lipidů, 0,5–0,9 % minerálií a 7,0–16,0 % sacharidů [49, 50]. V rostlině mají lepkové proteiny funkci zásobních proteinů, a ty jsou definovány jako proteiny hromadící se ve fázi plnění zrna a sloužící jako zdroj dusíku během procesu klíčení [51]. Z hlediska technologického je lepek zodpovědný za elasticitu a roztažnost těsta, soudržnost a schopnost zadržovat vodu [49, 52]. Elasticita určuje pružnost těsta, když je vystaveno síle, a schopnost návratu do původního tvaru po působení síly. Naopak roztažnost je vlastnost těsta založena na protahování ve směru aplikované síly a schopnosti setrvat v koncové poloze bez narušení struktury. Tyto dvě vlastnosti lepku tvoří z pšenice ten nejvhodnější materiál pro pekárenství [52].

Lepkové proteiny rozdělujeme na dvě hlavní frakce podle jejich rozpustnosti ve vodném roztoku alkoholu, na rozpustné gliadiny a nerozpustné gluteniny [49]. Obě tyto frakce jsou bohaté zejména na prolin a glutamin a mají nízký obsah nabitých aminokyselin, což omezuje

výskyt odpudivých sil a podporuje tvorbu agregátů [45]. Gliadiny se vyskytují jako monomerní proteiny a bývají klasifikovány podle různých parametrů, většinou do pěti skupin: ω5-, ω1,2-, α-, β- a γ-gliadiny. Gluteniny tvoří proteinové agregáty spojené disulfidickými vazbami. Jejich velikosti se pohybují mezi 500 kDa a 10 MDa. Některé gluteniny tak patří mezi největší proteiny v přírodě. Po redukci disulfidických vazeb se polymery rozpadnou na gluteninové podjednotky, které rozlišujeme na vysokomolekulární (HMW) a nízkomolekulární (LMW) [49].

I když je celková distribuce lepkových bílkovin závislá na kultivaru pšenice a růstových podmínkách jako jsou půda, klima a hnojení, obecně může být řečeno, že mezi gliadiny převažují α/β- a γ-gliadiny a mezi gluteniny LMW gluteninové podjednotky. Každá tato skupina představuje 20–30 % ze všech lepkových proteinů [42, 53]. Detailnější hodnoty procentuálního zastoupení lepkových proteinů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3: Charakteristika lepkových proteinů podle [49].

Frakce lepkových proteinů	**Zastoupení mezi celkovými lepkovými proteiny (%)**	**Částečné aminokyselinové složení (%)**				
		Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω5-gliadiny	3-6	56	20	9	1	1
ω1,2-gliadiny	4-7	44	26	8	1	1
α/β-gliadiny	28-33	37	16	4	3	2
γ-gliadiny	23-31	35	17	5	1	3
x-HMW-gluteninové podjednotky	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-gluteninové podjednotky	3-4	36	11	0	5	18
LMW-gluteninové podjednotky	19-25	38	13	4	1	3

Důležitou roli v lepkových proteinech sehrává aminokyselina cystein. Ačkoli je v nich obsažena pouze z 2 % všech aminokyselin, je nesmírně důležitá pro strukturu a funkčnost lepku. Většina cysteinu se vyskytuje v oxidovaném stavu a tvoří disulfidické vazby buď uvnitř jednotlivých proteinů, nebo mezi proteiny spojujíc je tak do řetězců. Malé množství gliadinů obsahuje kvůli bodovým mutacím neobvyklý počet cysteinů a jsou díky tomu společně vázány nebo jsou spojeny s gluteniny. Většinou jsou součástí gluteninové frakce ve formě polymerů nerozpustných v alkoholu nebo tvoří gliadinové oligomery rozpustné ve vodném roztoku alkoholu [49].

Disulfidické vazby jsou hlavními reakčními místy ve většině redoxních reakcí probíhajících při zrání zrna, mletí, přípravě těsta a pečení. Při procesu přípravy chleba se tvoří další kovalentní vazby, kterých se účastní zejména aminokyselina tyrosin. Může dojít rovněž ke spojení dvou lepkových proteinů vazbou tyrosin-tyrosin nebo k navázání arabinoxylanů a lepkových proteinů přes tyrosin a dehydroferulovou kyselinu, vytvářejíc tak další síťovou strukturu v těstě [49, 54, 55]. Kovalentní struktura lepku je ještě spojena iontovými vazbami a slabými nekovalentními interakcemi, jako například vodíkovými můstky a hydrofobními interakcemi. Tyto vazby jsou zapojeny ve strukturách proteinových agregátů a nakonec i ve struktuře samotného těsta. Vodíkové vazby mohou být ovlivněny přídavkem činidel štěpících tyto vazby, ke kterým patří močovina, což se projeví oslabením těsta. Naopak použitím těžké vody (oxidu deuteria D_2O) docílíme posílení těsta. Přítomnost iontových vazeb ve struktuře

těsta lze dokázat přídavkem soli NaCl nebo bipolárních iontů jako jsou aminokyseliny a dikarboxylové kyseliny, což rovněž zesílí těsto. Hydrofobní interakce se liší od ostatních vazeb, jelikož při rostoucí teplotě dochází ke zvýšení jejich vazebné energie a tím stabilizaci lepkové struktury, což se projeví stabilizací konečného produktu v průběhu pečení [49].

Frakce lepkových bílkovin se odlišně podílí na reologických vlastnostech pšeničného těsta. Hydratované gliadiny mají malou elasticitu a jsou méně kohezivní než gluteniny. Podílí se zejména na viskozitě a roztažnosti těsta. Zato hydratované gluteniny jsou zodpovědné za pevnost i pružnost těsta [49]. Viskoelastické vlastnosti gluteninů jsou závislé na poměru vysokomolekulárních a nízkomolekulárních gluteninových podjednotek [50]. Největší gluteninové polymery, nazývané gluteninové makropolymery (GMP), se nejvíce podílí na vlastnostech pšeničného těsta a jejich množství v mouce (okolo 20 až 40 mg/g) přímo ovlivňuje sílu těsta a objem pečiva [49].

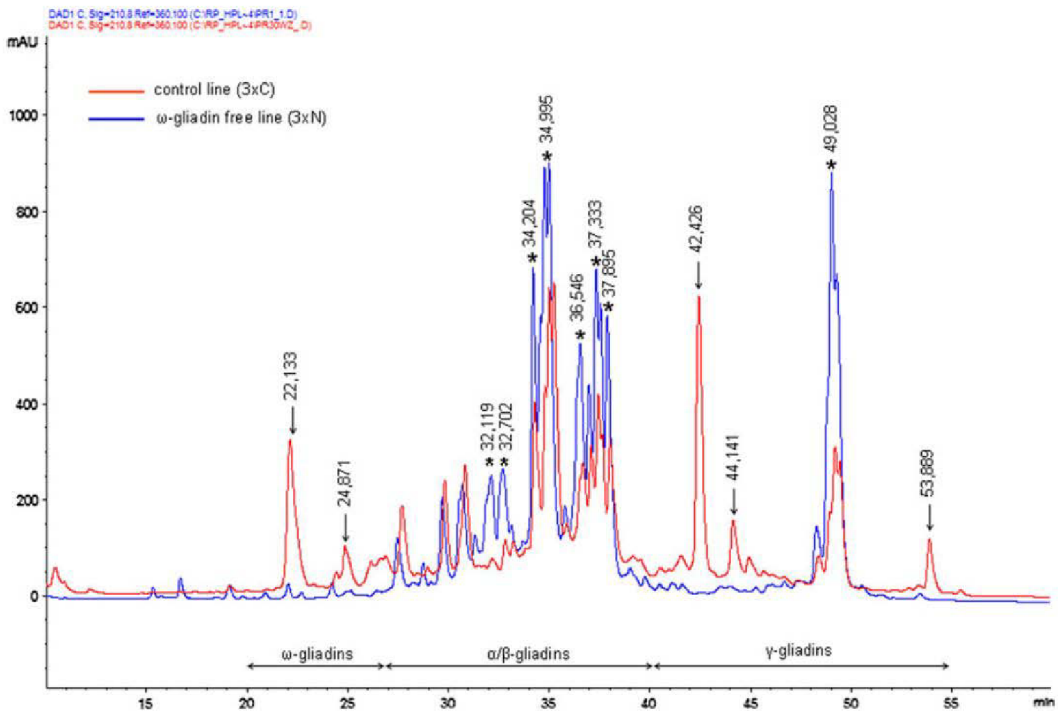
Lepkové bílkoviny jsou častými původci potravinových alergií a intolerancí. Všechny gliadinové a gluteninové frakce jsou považovány za alergeny pšeničného zrna. Mezi nejčastější alergeny způsobující atopickou dermatitidu nebo astma patří α/β- a γ-gliadiny, zatímco ω5-gliadiny mohou vést zejména k anafylaxi nebo vyrážkám, v menší míře mohou zapříčinit atopickou dermatitidu či astma. Anafylaxi mohou přivodit rovněž LMW gluteninové podjednotky. Méně časté jsou alergie na HMW gluteniny [47]. U některých osob mohou proteiny lepku způsobovat intoleranci ve formě choroby celiakie. Odpovědí imunitního systému na tuto poruchu jsou chronické záněty tenkého střeva, které mohou vést až k jeho poškození [56].

2.6.2.1 Gliadiny

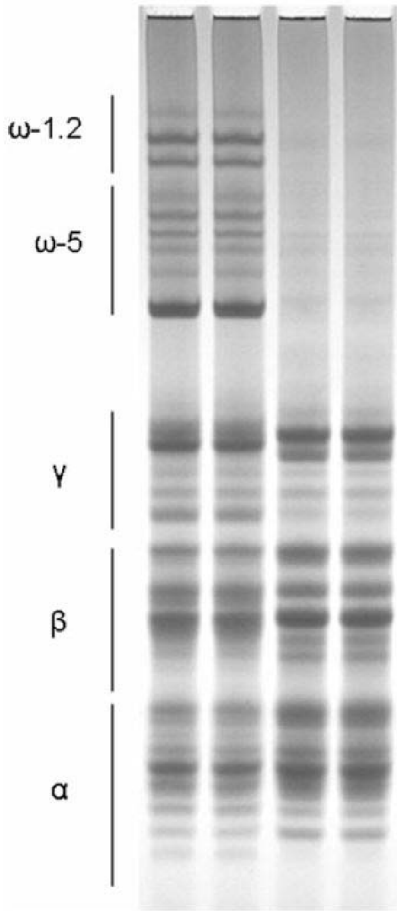
Gliadiny se vyskytují většinou ve formě monomerů, výjimečně tvoří agregáty, jak bylo popsáno výše. Gliadiny lze dělit podle elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu v kyselém pH na α-gliadiny s nejvyšší mobilitou, a další s postupně nižší mobilitou: β-, γ- a ω-gliadiny. Další dělení se nabízí podle molekulárních hmotností a aminokyselinového složení – tehdy mají α- a β-gliadiny tak podobné vlastnosti, že spadají do jedné skupiny α/β-gliadinů, a spolu s γ-gliadiny mají podobné hmotnosti, které se pohybují mezi 28 kDa a 35 kDa. Zato ω-gliadiny se rozlišují na ω5-gliadiny s molekulovou hmotností okolo 49–55 kDa a ω1,2-gliadiny s hmotností cca 39–44 kDa [49, 57].

Aminokyselinové složení jednotlivých frakcí lepkových bílkovin je uvedeno v tabulce 3. ω-gliadiny jsou charakteristické nejvyšším obsahem glutaminu, prolinu a fenylalaninu, což představuje až 80 % z celkového složení. Naopak téměř vůbec neobsahují cystein, a proto ani netvoří disulfidické vazby. U α/β- a γ-gliadinů je obsah glutaminu a prolinu mnohem nižší, mají ale vyšší obsah tyrosinu a glycinu. Na rozdíl od ω-gliadinů, ostatní gliadiny jsou schopny tvořit disulfidické můstky – u α/β-gliadinů to umožňuje šest cysteinů a u γ-gliadinů osm cysteinů umístěných na C-terminálním konci [58].

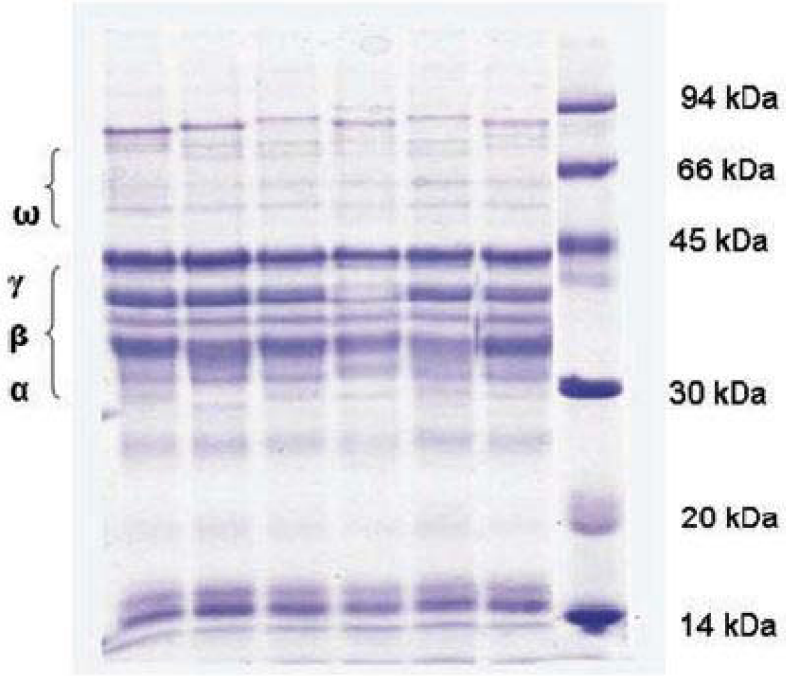
Moderními analytickými metodami lze gliadinovou frakci rozdělit a stanovit více než 100 jejích komponent. Vhodnými metodami pro separaci jsou zejména dvojrozměrná elektroforéza nebo vysoko účinná kapalinová chromatografie s reverzní fází [57]. Nejvýznamnější metodou pro analýzu gliadinů je MALDI-TOF, pomocí které lze stanovit přesné molekulární hmotnosti proteinů [59]. Výsledné záznamy z rozdělení gliadinů pomocí různých metod jsou uvedeny na obrázcích 5, 6, 7.



Obr. 5: RP-HPLC gliadinů podle [60].



Obr. 6: A-PAGE gliadinů podle [60]. *Vpravo hybridní linie pšenice bez ω-gliadinů.*



Obr. 7: SDS-PAGE gliadinů podle [61].

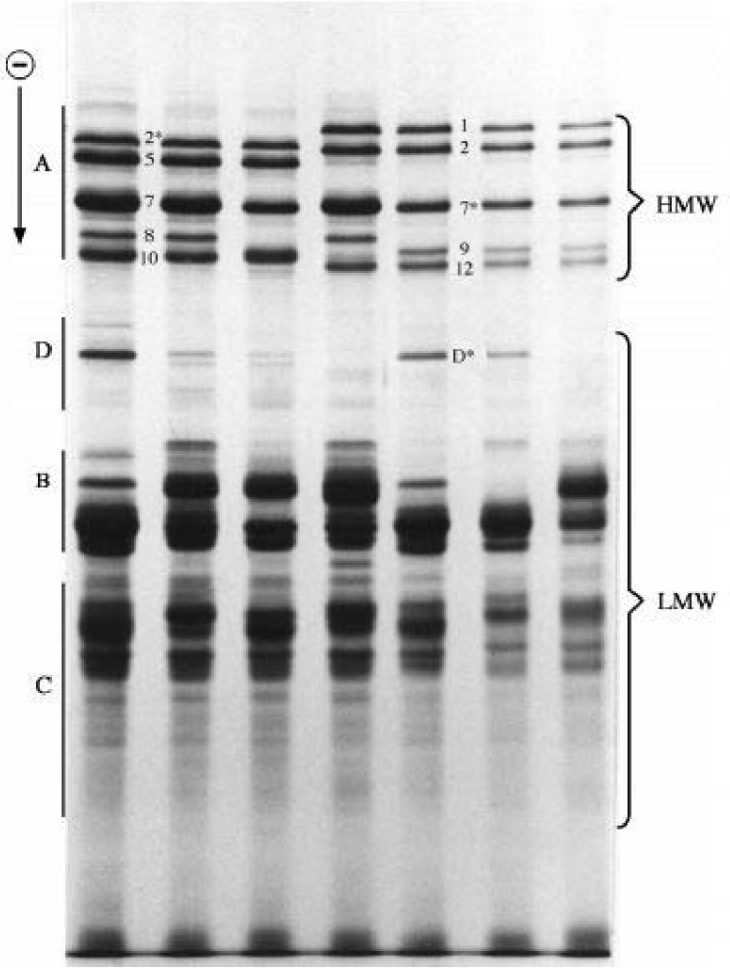
2.6.2.2 Gluteniny

Gluteninová frakce tvoří agregované proteiny spojené disulfidickými vazbami, po jejichž redukci získáme gluteninové podjednotky, které jsou rozpustné v alkoholu podobně jako gliadiny [49]. Z tabulky 3 je jasně zřejmé, že hlavní složku gluteninů tvoří z 19–25 % nízkomolekulární gluteninové podjednotky (LMW) a v menším podílu (cca 10 %) jsou pak zastoupeny vysokomolekulární gluteninové podjednotky (HMW) [49, 53].

Molekulová hmotnost LMW podjednotek se pohybuje mezi 32 kDa a 39 kDa, čímž se podobají α/β- a γ-gliadinům, a podobné mají i aminokyselinové složení (viz tabulka 3). LMW gluteninové podjednotky obsahují ve své struktuře osm cysteinů, z nichž šest tvoří intramolekulární disulfidické vazby a pomocí zbylých dvou cysteinů jsou vytvářeny intermolekulární vazby s jinými proteiny lepkového komplexu [49, 58].

HMW podjednotky se dělí do dvou skupin: *x*-HMW s molekulovými hmotnosti 83–88 kDa a *y*-HMW s molekulovými hmotnostmi 67–74 kDa. Názvosloví vysokomolekulárních gluteninů je založeno na kódující části genomu (A, B, D), typu (*x*, *y*) a mobilitě při SDS-PAGE [49]. HMW gluteniny se v mouce ani v těstě nevyskytují v podobě monomerů, jelikož jsou jejich řetězce spojeny vzájemně disulfidickými můstky. *x*-HMW má ve své struktuře čtyři cysteiny, z toho dva jsou zapojeny v intramolekulárních vazbách a zbylé dva se podílí na mezořetězcových disulfidických můstcích. Výjimku tvoří podjednotka Dx5, která obsahuje pět cysteinů. *y*-HMW obsahuje sedm cysteinů, ale mezořetězcové vazby jsou zatím známy jen u tří z nich. Dva cysteiny se pojí s paralelně s další podjednotkou typu *y* a třetí cystein je zapojen ve vazbě s LMW podjednotkou [49, 62]. Pro dosažení výhodných vlastností pšeničného těsta jsou důležitější podjednotky *x*-HMW než podjednotky typu *y*. Je znám příspěvek na kvalitu těsta a objem chleba u konkrétních podjednotek: Dx5 s cysteinem navíc a Bx7 podjednotky, která se vyskytuje v největším množství [53, 63].

Gluteniny se rozdělují na základě elektroforetických mobilit na polyakrylamidovém gelu při elektroforéze v přítomnosti dodecylsíranu sodného do čtyř skupin: A, B, C a D. Do skupiny A patří HMW gluteninové podjednotky. LMW podjednotky se rozdělují do skupin B (molekulová hmotnost 42–51 kDa), C (M_r 30–74 kDa) a D (vysoce kyselé LMW gluteniny o M_r 52–74kDa) [64]. Rozdělení gluteninů lze vidět na obrázku 8, tedy záznamu z nejpoužívanější metody separace gluteninů: SDS-PAGE.



Obr. 8: SDS-PAGE gluteninů podle [59].

2.7 Vliv globální klimatické změny na pšenici

Měnící se klima má odlišné následky na různé druhy rostlin. Podle Daryanto a kol. [65], kteří provedli meta analýzu studií týkajících se vlivu sucha na obiloviny, luštěniny, hlíznaté a kořenové plodiny, jsou obiloviny nejvíce odolné na stres sucha mezi uvedenými skupinami rostlin. Ale pouze u obilovin, konkrétně u pšenice, byla zjištěna citlivost na nedostatek vody jak v průběhu reprodukčního vývoje (plnění zrna), tak i během vegetativní fáze. V porovnání s luštěninami nebo hlíznatými či kořenovými plodinami má sucho také nejmenší vliv na výtěžek u obilovin díky jejich rozsáhlému a hlubokému kořenovému systému.

Balla a kol. [40] se blíže zabývali vlivy sucha a horka na pšenici po fázi kvetení a porovnávali tyto faktory zvlášť a při společném působení. Velmi negativní vliv na výnos a kvalitu pšenice byl zaznamenán při spojených stresových faktorech sucha a vysokých teplot, kdy výtěžnost klesla o 76 %. Lepších výsledků bylo dosaženo při samotném působení stresu

sucha, ale i přesto došlo ke snížení výnosu až o 57 %. Při teplotě 35 °C se výnos snížil pouze o 31 % a na kvalitu zrna neměl teplotní stres vliv nebo došlo dokonce k vylepšení poměru bílkovinných frakcí.

2.7.1 Vliv na škrob v zrnu

Mnohé literární zdroje [45, 66, 67] se shodují na tom, že při stresových podmínkách během vývoje pšenice dochází ke zvýšení obsahu bílkovin v zrnu spojeném se snížením výtěžku, což Balla a kol. [40] vysvětlují snížením produkce škrobu. Vlivem působení vysokých teplot dochází k inaktivaci škrobové syntasy, klíčového enzymu v dráze syntézy škrobu [68]. Vysoké teploty po období kvetení mají také výrazný dopad na distribuci škrobových zrn v pšeničném zrnu. Působením vysokých teplot se snižuje počet malých β-granulí a naopak se zvyšuje množství velkých α-granulí. Vlivem sucha dochází ke zmenšení povrchu β-granulí. Uvedenými změnami je ovlivněna absorpce vody škrobovými zrny a elasticita těsta, závislá na poměru amylosy k amylopektinu a na distribuci škrobových zrn [40].

2.7.2 Vliv na bílkoviny v zrnu

Skladba pšeničných bílkovin je rozhodujícím faktorem kvality těsta, potažmo chleba a je ovlivňována různými druhy stresu. Lepkové bílkoviny (gliadiny a gluteniny) ovlivňují elasticitu a tažnost těsta, albuminy a globuliny nemají velký vliv na kvalitu těsta, ale mají velký nutriční význam díky vysokému obsahu esenciálních aminokyselin [40].

Většinou je v literatuře uvedeno [69, 70], že při zvýšení obsahu pšeničných bílkovin vlivem vysokých teplot dochází ke zvýšení gliadinové frakce a snížení gluteninové frakce, ale mezi albuminy a globuliny nedochází ke změnám. Nárůst teploty způsobuje zvýšení obsahu gliadinů v mouce spojeném s nárůstem ω-, α- a β- gliadinů, ale současně s poklesem γ-gliadinové frakce [70]. Podle Blumenthala a kol. [71] způsobují teploty nad 35 °C zvýšení poměru gliadinů ke gluteninům a podle Wardlawa a kol. [72] dochází ke snížení obsahu vysokomolekulárních gluteninových podjednotek. Garcia del Moral a kol. [45] uvádí pokles obsahu albuminů a globulinů, což dokládají i výsledky pro konkrétní aminokyseliny. Při stresových podmínkách sucha a tepla zjistili zvýšení obsahů aminokyselin fenylalaninu, prolinu a glutaminu přímo úměrné nárůstu dusíkatých látek v zrnu. Naopak u ostatních aminokyselin zaznamenali nepřímo úměrný vztah ke zvýšenému obsahu dusíku v zrnu. Při vysokých teplotách a suchých podmínkách dochází přednostně k ukládání gliadinů (proteinů bohatých na glutamin a prolin) na úkor albuminů a globulinů (bohaté na threonin, lysin, methionin, valin a histidin).

Ohledně vlivů sucha na obsah bílkovin v pšeničném zrnu už není v literatuře taková shoda. Podle Zhanga a kol. [73] faktor stresu z nedostatku vláhy způsobil významný nárůst koncentrace albuminů a gliadinů, ale neznatelné rozdíly u globulinů a gluteninů. Flagella a kol. [74] zase nezaznamenali žádný rozdíl mezi dostatkem a deficitem vody u gliadinů a LMW gluteninových podjednotek, ale při stresových podmínkách z nedostatku vody zjistili významný nárůst obsahu gluteninů, způsobeném nárůstem HMW gluteninů. Rozdíly mohou být způsobeny použitím různých odrůd pšenice a odlišné metodiky.

2.7.3 Vliv na kvalitu pšenice

Mnozí autoři [75, 76, 77] uvádí, že teploty do 35 °C mají pozitivní vliv na vlastnosti těsta, ale vlivem vyšších teplot dochází k efektu oslabování těsta. Flagella [74] ve svém výzkumu

v průběhu tří sklizňových sezón zjistil, že vliv nedostatku vláhy na technologickou kvalitu pšenice a bílkovinné složení záleží na síle stresového faktoru a období jeho působení. Deficit vody v průběhu růstu způsobuje nízkou výtěžnost zrna. Stejné stresové podmínky ve fázi plnění zrna zlepšily sílu lepku, pravděpodobně kvůli nárůstu obsahu gluteninů. Při nedostatku vody v zimě s následujícími hojnými srážkami na jaře byl zjištěn vhodný obsah proteinů bez ovlivnění výtěžku.

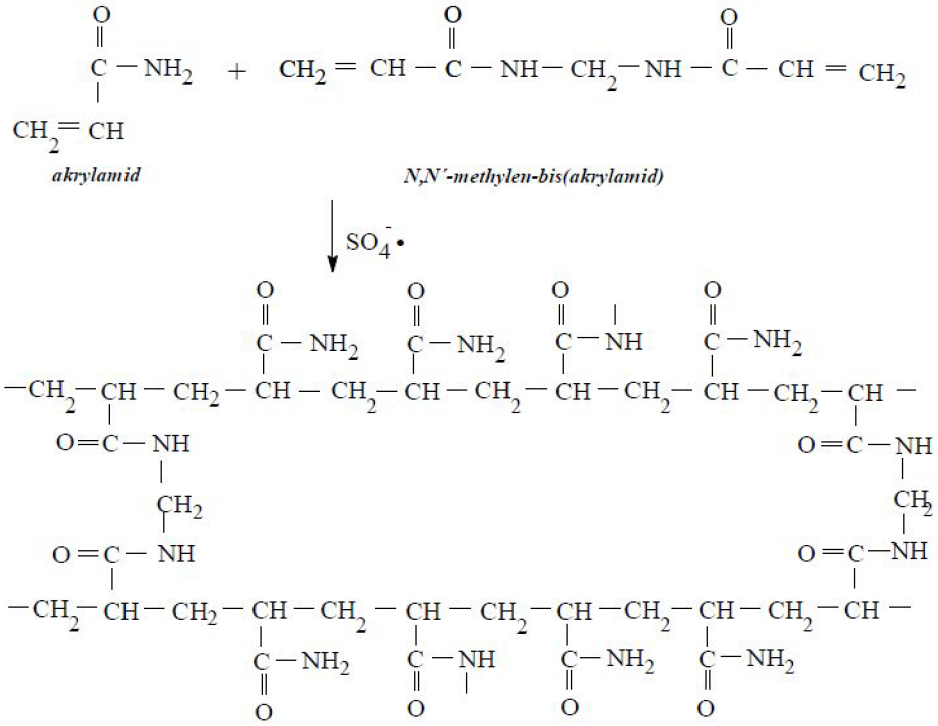
Stresové podmínky sucha a velmi vysokých teplot obecně vedou k nižším výtěžkům, většinou vyjádřeným v podobě hmotnosti tisíce zrn, a ke zvýšenému obsahu proteinů. Podle Rharrabtia a kol. [78] způsobuje sucho během plnění zrna zhoršení kvality zrna snížením hmotnosti a SDS sedimentační hodnoty, a zvýšením obsahu popela. Li a kol. [79] došli k závěrům, že kvantitativní parametry jakosti pšenice jsou ovlivněny spíše podmínkami prostředí (stresy sucha a tepla), kdežto síla lepku záleží od genotypu pšenice. Obecně suché podmínky zlepšují sílu lepku a vysoké teploty ji snižují.

2.8 Metody stanovení lepkových proteinů

2.8.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu se řadí mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody pro separaci makromolekul. Dělení probíhá podle elektroforetické pohyblivosti dělených látek, je tedy založeno na principu pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Nabité molekuly – kationty a anionty se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí úměrné velikosti náboje ke katodě, resp. anodě. Použitím porézních gelů probíhá navíc dělení molekul na základě síťového efektu. Velké molekuly se pohybují pomaleji než malé, jelikož gel úplně vyplňuje vymezený prostor. Nejčastěji je jako nosič používán kompaktní polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a lze z něj tvořit nosiče s různými požadovanými vlastnostmi (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu). Je kopolymerem dvou monomerů: akrylamidu a N,N´-methylen-bis(akrylamidu). Jejich vzájemný poměr ovlivňuje fyzikální vlastnosti gelu, jako např. velikost pórů, křehkost a tvrdost gelu. Kopolymerace musí probíhat v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru peroxodisíranu amonného nebo riboflavinu. Působením světla dochází k rozkladu molekul iniciátoru za vzniku volných radikálů, které zahájí vlastní polymerační reakci. Jako katalyzátor je používán tetramethylethylendiamin (TEMED) pro stabilizaci volných radikálů [80]. Struktura polyakrylamidového gelu je znázorněna na obrázku 9.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu může být provedena diskontinuálně, přičemž získáme velmi ostré zóny rozdělených bílkovin. Princip spočívá v použití dvou různých gelů, horního zaostřovacího, který bílkoviny zkoncentruje, a spodního dělícího, ve kterém dochází k separaci bílkovin podle elektroforetických pohyblivostí. K detekci látek po elektroforéze se používá barvení pro zviditelnění rozdělených zón analytu. Nejčastěji se proteiny barví alkoholovým roztokem s barvivem Coomassie blue. Použitím tohoto roztoku se proteiny fixují, denaturují a tvoří se komplexy barvivo-protein, které vydrží i vymývání přebytku barviva kyselým roztokem nebo elektroforetickým odbarvením. Pro detekci menších koncentrací bílkovin (až 0,1 ng) se volí barvení stříbrem [80].



Obr. 9: Chemická struktura polyakrylamidového gelu. Převzato z [79].

2.8.1.1 SDS-PAGE

Nejběžnější metodou pro separaci bílkovin je SDS-PAGE, tedy elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS), který překrývá vlastní náboj proteinu a uděluje jim uniformní, záporný náboj. Bílkoviny s navázaným SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmotnosti a podobný, válcovitý tvar, a proto se bílkoviny při SDS-PAGE dělí na základě rozdílných molekulových hmotností. Použitím SDS, který štěpí vodíkové můstky, spolu s dalšími redukčními činidly štěpícími i disulfidické můstky, můžeme stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek. Nejčastěji používanými činidly pro redukci disulfidických vazeb jsou dithiothreitol (DTT) nebo 2-merkaptoethanol. Tato varianta gelové elektroforézy ale nepodává informace o nativním stavu bílkovin [80].

Množství výzkumů [59, 81, 82, 83] využívajících tuto metodu dokazuje, že SDS-PAGE je vhodná pro všechny lepkové bílkoviny, ale častěji se využívá při stanoveních gluteninů. Bradová a Matějová [84] použily pro separaci a identifikaci HMW gluteninů elektroforézu na čipu a dosáhly stejných reprodukovatelných výsledků jako při klasické SDS-PAGE za mnohem kratší čas a s nižším objemem vzorku i reakčních činidel.

2.8.1.2 A-PAGE

Elektroforéza v kyselém prostředí (A-PAGE) probíhá za nativních podmínek. Nedochází tak k denaturaci molekul a zůstává zachována sekundární a terciární struktura. Je tedy možné separovat molekuly jak podle velikosti, tak podle jejich tvaru a velikosti náboje. Pro separaci proteinů touto metodou je pH systému udržováno kolem hodnoty 3, většinou použitím pufru s kyselinou octovou a glycinem [85]. V tak kyselém prostředí dochází k protonaci postranních řetězců aminokyselin a všechny proteiny mají kladný náboj. Na rozdíl od SDS-PAGE se proto pohybují ke katodě [86]. Důležitým faktorem je teplota gelu, jelikož pKa pufrových iontů

a analytů se mění s různou teplotou [85]. Pro vylepšení systému se přidává močovina, která ruší vodíkové vazby v proteinech a zvyšuje koeficient tření proteinů a mění tak jejich elektroforetické mobility [87].

Nejčastěji se tato metoda používá pro separaci monomerních gliadinů [59, 61, 82, 88, 89]. Morel [90] použil tuto metodu i pro separaci gluteninů.

2.8.1.3 2-D elektroforéza

Dvojdimenzionální elektroforéza je metoda vhodná pro definování proteinového složení vysoce heterogenních směsí, využívaná zejména v proteomice. Vyniká svou vysokou rozlišovací schopností [59]. Skylas a kol. [91] pomocí 2-D elektroforézy detekovali na 1 300 polypeptidů v pšeničném endospermu.

Metoda je založena na kombinaci isoelektrické fokusace a gelové elektroforézy [59]. V prvním kroku se proteiny rozdělí podle svých izoelektrických bodů v gradientu pH. Molekuly proteinů se pohybují podle svého náboje ke katodě nebo anodě. V místě, jehož pH odpovídá izoelektrickému bodu proteinu, se náboj molekuly změní na nulový a migrace se zastaví. Rozdělené zóny se aplikují na polyakrylamidový gel s SDS a provedením elektroforézy dojde k rozdělení podle molekulové hmotnosti [85, 92].

Jiné provedení 2-D elektroforézy může kombinovat metody A-PAGE a SDS-PAGE. Morel [90] takto provedl analýzu gluteninů.

2.8.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří rovněž mezi elektromigrační analytické metody. Elektroforéza probíhá v křemenných, skleněných nebo plastových kapilárách. Díky malému průměru kapilár (<100 μm) se lehce odvádí teplo a mohou se tak použít elektrická pole s vysokým napětím, čímž se sníží čas pro rozdělení vzorku [93].

Pro separaci a analýzu lepkových bílkovin se využívá volná elektroforéza při použití pufru nebo kapilární elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-CE) [94]. Yan a kol. [95] použili pro svoji studii kapilární elektroforézu v kyselém pufru (A-CE) s použitím fosfát-glycinového pufru, acetonitrilu a hydroxypropylmethylcelulosy. Spolu s dalšími autory [94, 96] se shodují na tom, že je tato metoda vhodná pro efektivní separaci zásobních proteinů, zejména gluteninových podjednotek, s výhodami jako jsou jednoduchost, rychlost, vysoká rozlišovací schopnost, reprodukovatelnost a nízká spotřeba vzorku.

2.8.3 Chromatografické metody

Mezi nejvíce využívané chromatografické metody v oblasti analýzy obilných proteinů patří vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) – reverse-phase high-performance liquid chromatography [97]. RP-HPLC je považována za účinnou metodu pro separaci a kvantifikaci jednotlivých gluteninových podjednotek z pšeničné mouky [98].

V posledních letech vychází do popředí ultra účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-UPLC). Podle Hana a kol. [99] může být RP-UPLC považována za ideální metodu pro proteomické a genetické studie pšeničného zrna.

2.8.4 Hmotnostní spektrometrie

V analýze pšeničných proteinů se z hmotnostních spektrometrických technik nejvíce využívá MALDI-TOF MS (z angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Touto metodou lze zjistit jak množství přítomných proteinů ve vzorku, tak jejich přesné molekulové hmotnosti [59, 100]. Pro zjednodušení komplexní proteinové směsi se před MALDI-TOF MS zařazují separační metody jako např. RP-HPLC. Je tak dosaženo minimálních nejistot a maximální reprodukovatelnosti [100]. MALDI-TOF lze využít pro identifikaci gliadinového složení pšeničného zrna a stanovení vztahů mezi genotypy [101].

Další využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu pšeničných proteinů je ve spojení s chromatografickými metodami a použitím ionizace elektrosprejem (ESI). Visioli a kol. [100] zapojili před LC-ESI-MS/MS (s analyzátorem orbitrapem) dvojdimenzionální elektroforézu a získali tak kompletní identifikaci různých LMW podjednotek.

2.8.5 ELISA

ELISA (z ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zkráceně označována EIA (Enzyme ImunoAssay – enzymová imunoanalýza) umožňuje stanovit analyt v množství 10^{-12} až 10^{-9} g. Patří mezi neprecipitační imunochemické metody, které detekují velice nízké koncentrace antigenu a protilátky, které netvoří precipitáty a nemohou být tedy stanoveny jinými, precipitačními technikami. Vysoká citlivost stanovení je možná díky navázání vhodné značky na jeden z imunoreaktantů ještě před uskutečněním interakce antigen-protilátka. Ke značení se nejčastěji používají kovalentně navázané enzymy, např. peroxidasa a alkalická fosfatasa, které katalyzují přeměnu substrátu přidaného do reakční směsi. Změna lze změřit spektrofotometrickým nebo fluorimetrickým stanovením. Nejčastěji se při ELISA používá pevného nosiče v podobě stěn jamek mikrotitračních destiček z tvrzeného polystyrenu, které jsou vhodné pro analýzu většího souboru vzorků [80].

Enzymová imunoanalýza může být provedena jako přímá kompetitivní, nepřímá kompetitivní nebo nekompetitivní. Při nekompetitivní (sendvičové) enzymové imunoanalýze nejprve dochází k interakci protilátky zakotvené na pevné fázi s antigenem v analyzovaném vzorku a po ustavení rovnováhy se systém promyje a na protilátkou zachycený antigen se naváže další protilátka značená enzymem. Po promytí se změří enzymová aktivita zachycená na pevnou fázi. U přímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy spolu soutěží neznačený a značený antigen o vazbu na protilátku vázanou na pevném nosiči. Po ustavení rovnováhy a po promytí se měří enzymová aktivita zachycená na pevnou fázi. U nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy je první fáze kompetitivní, kdy spolu soutěží antigen zakotvený na pevný nosič se stanovovaným antigenem ze vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky, která se přidává do systému v roztoku spolu se stanovovaným antigenem. Čím více antigenu je obsaženo v analytu, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen a opačně. Až se ustaví rovnováha, systém se promyje a v druhé fázi, která je nekompetitivní, se zjišťuje množství zprostředkovaně zakotvené protilátky použitím přidávané značené protilátky [80].

Tato metoda je často využívána k detekci a ke kontrole obsahu gliadinů v bezlepkových potravinách [102]. Khan a kol. [103] provedli imunoanalýzu s využitím polyklonálních látek pro předpověď technologické kvality některých genotypů pšenice jarní na základě analýzy LMW a HMW gluteninových podjednotek.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Příprava materiálu byla provedena Ústavem výzkumu globální změny Akademie věd České republiky. Pro experiment byly použity čtyři genotypy pšenice ozimé: Bohemia, Tobak, Pannonia a genotyp syrského původu S46 (IG142780), který je dále v práci označován jako Syria. Osivo bylo zaseto v říjnu 2014 do černých plastových nádob s vnitřními rozměry 10,5 × 10,5 × 21,5 cm v množství dvou zrn na jednu nádobu. Půda použitá do nádob pocházela z experimentální stanice v Polkovicích na Moravě v České republice. Půdní typ byl na základě měření kvalifikován na Luvickou černozem s půdotvorným substrátem spraš. Nádoby byly v hale Mendelovy univerzity v Brně vystaveny okolním meteorologickým podmínkám až do dosažení fáze naduřování horní listové pochvy, která předchází fázi metání. Jako ochrana před zmrznutím byl okolo nádob použit keramzit. Hnojení proběhlo jednorázově v březnu 2015 vodným roztokem dusičnanu amonného v koncentraci 0,29 g dusičnanu ve 14 ml vody na jednu nádobu (dávka 90 kg dusíku na ha). Vzorky byly ošetřeny fungicidy PROSARO® 250 EC a Fandango® 200 EC a insekticidy Plenum (Syngenta) a KARATE se ZEON technologií 5 CS. Vzorky byly v květnu 2015 převezeny do Ústavu výzkumu globální změny AV ČR a byly umístěny do kultivačních komor pro aklimatizaci na jednotlivé teploty.

Pro hodnocení vlivu vysoké teploty a nedostatku půdní vláhy v období kvetení byly v komorách simulovány podmínky stresu teplem s teplotními maximy: 26 °C v kontrolní komoře, 29 °C, 32 °C, 35 °C, 38 °C a 41 °C. V tabulce 4 jsou uvedeny podmínky v jednotlivých komorách: teploty byly různé v každé komoře, kdežto fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a relativní vlhkost (RV) byly udržovány stejné ve všech komorách. V každé komoře byla ustanovena varianta stresovaná suchem, při které byla vlhkost půdy udržována pod 30 %, a varianta optimálně zalévaná s kontrolní vlhkostí půdy nad 70 %. Rostliny byly po 14 dnech stresového režimu vyjmuty z komor a do období plné zralosti byly vystaveny vlivům aktuálního počasí. Po sklizni byly vzorky zrn rozemlety na mouku a byly dále zpracovány v rámci experimentální části této diplomové práce.

Tab. 4: Podmínky v kultivačních komorách (K) – denní teploty (Komora 1 = kontrolované podmínky), fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a relativní vlhkost (RV)

Čas	**K 1 t (°C)**	**K 2 t (°C)**	**K 3 t (°C)**	**K 4 t (°C)**	**K 5 t (°C)**	**K 6 t (°C)**	**FAR ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)**	**RV (%)**
0:00	20	20	20	20	20	20	0	85
4:00	18	18	18	18	18	18	0	90
6:00	18	18	18	18	18	18	0	90
12:00	26	29	32	35	38	41	1500	45
14:00	26	29	32	35	38	41	1500	45
20:00	22	22	22	22	22	22	0	75
24:00	20	20	20	20	20	20	0	85

3.2 Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle metody Polišenské a kol. [104] a ČSN 46 1085-2.

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD
Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF
Vortex – stuart, firma MERCI
Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE
Aparatura pro vertikální elektroforézu s možností chlazení - Owl Seperation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA
Zdroj – Major Science MP-500P
Třepačka KS 130 BASIC, firma IKA

3.2.2 Chemikálie

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)
2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)
Pyronin Y (SIGMA ALDRICH)
Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)
Glycin (SIGMA ALDRICH)
Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)

3.2.3 Příprava roztoků

Extrakční roztok pro gliadiny: 25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu Y bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

0,15% vodný roztok síranu železnatého: 0,014 g heptahydrátu síranu železnatého bylo rozpuštěno v 5,0 ml destilované vody. Roztok byl připraven vždy čerstvý před každým použitím.

10% vodný roztok peroxodisíranu amonného: 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1,0 ml destilované vody. Roztok byl připraven vždy čerstvý těsně před každým použitím.

Gelový tlumivý roztok: K 20 ml ledové kyseliny octové a 1,00 g glycinu bylo přidáno 1 000 ml destilované vody. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Elektrodový tlumivý roztok: 8,0 ml ledové kyseliny octové a 0,8 g glycinu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 2 000 ml a baňka byla doplněna destilovanou

vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C. Elektrodový tlumivý roztok nelze používat pro elektroforézu opakovaně.

Fixační roztok: 100 g kyseliny trichloroctové bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1 000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

Barvicí roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna ethanolem po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

3.2.4 Příprava vzorků

Pro extrakci gliadinů bylo do mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml naváženo cca 50 mg pšeničné mouky, což zhruba odpovídá hmotnosti jednoho zrna. K navážce bylo přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny. Obsah byl důkladně promíchán na vortexu a v uzavřené mikrozkumavce byl ponechán přes noc v chladničce. Druhý den byla směs odstředěna při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkumavky a použit pro elektroforézu. Hotové extrakty byly uchovávány v mrazničce při teplotě –18 °C.

3.2.5 Příprava polyakrylamidového gelu

Do asi 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo v následujícím pořadí přidáno 10,00 g akrylamidu, 0,40 g bisakrylamidu, 6,00 g močoviny, 0,10 g kyseliny askorbové a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna do objemu 100 ml gelovým tlumivým roztokem. Poté byla směs vychlazena v mrazicí části chladničky na teplotu cca 6 °C. Do vychlazeného roztoku bylo přidáno současně 0,2 ml roztoku peroxodisíranu amonného a 0,3 ml TEMED. Tímto roztokem byla ihned naplněna až po okraj gelová kazeta, předem vychlazená také na teplotu 6 °C. Do horní části kazety byl umístěn hřeben, sloužící pro vytvoření prohlubní pro dávkování vzorku. Polymerace probíhá rychle, asi během 5 minut. Gel je možné použít cca po 60 minutách od zpolymerování gelu v kazetě nebo je možné jej uchovat do druhého dne v chladničce.

3.2.6 Elektroforéza

Hřeben byl vytažen z gelu a prohlubně pro dávkování vzorku byly promyty elektrodovým tlumivým roztokem. Aparatura na elektroforézu byla naplněna elektrodovým tlumivým roztokem. Zdroj byl připojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody, kterou je anoda, k záporné elektrodě ve spodní části aparatury. Byla spuštěna elektroforéza na prázdno (tzv. „předelektroforéza“) po dobu 60 minut při konstantním napětí 480 V. Po uplynutí této doby byla elektroforéza vypnuta a do jamek byly nadávkovány připravené extrakty v množství 5 µl. Přístroj byl znovu zapnut, přičemž elektroforéza probíhala za stejných podmínek po dobu dvojnásobné doby běhu barviva pyroninu Y v čele. Vzhledem k velikosti vloženého napětí bylo nutné elektrodový tlumivý roztok v průběhu elektroforézy chladit.

3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin

Po skončení elektroforézy byl gel uvolněn do misky s destilovanou vodou. Voda z misky byla vylita a gel byl převrstven 300 ml fixačního roztoku, ke kterému bylo přidáno 15 ml barvicího roztoku. Gel musí být během barvení zcela ponořen. Miska s gelem byla umístěna na třepačku a barvení probíhalo 24 hodin. Delší čas nemá na barvení vliv. Po ukončení barvení byl gel promyt vodou z vodovodu pro odstranění nadbytečného barviva. Gel byl uchováván na skle zabalený do potravinářské fólie, která jej chrání před vyschnutím, v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3 Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE

3.3.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD
Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF
Vortex – stuart, firma MERCI
Vortex – Genie 2, firma SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.
Termoblok TDB-100, firma BIOSAN
Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE
Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN, firma BIO-RAD
Zdroj Power Pac HC, firma BIO-RAD
Třepačka KS 130 BASIC, firma IKA

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)
N,N´-Methylenbisakrylamid (SIGMA ALDRICH)
Coomasie Brilliant Blue G-250 (SERVA)
Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)
Butanol (LACH-NER)
DTT – dithiothreitol (SIGMA ALDRICH)
Ethanol
Glycerol (SIGMA ALDRICH)
Glycin (SIGMA ALDRICH)
Isopropanol (LACH-NER)
Kyselina chlorovodíková (LACH-NER)
Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)
2-Merkaptoethanol (SIGMA ALDRICH)
Methanol (SIGMA ALDRICH)
Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)
SDS-dodecylsulfát sodný (SIGMA ALDRICH)
TEMED – N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (SIGMA ALDRICH)

3.3.3 Příprava roztoků

3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

Roztok A: 29,2 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn vodou po rysku. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn vodou po rysku. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D: 10 g SDS bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok se uchovává v temnu při laboratorní teplotě.

Roztok E: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxodisíranu amonného. Roztok je nutné připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10 mg bromfenolové modři. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.3.3.2 Ostatní roztoky

Elektrodový pufr: V 2000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12 g TRIS, 4 g SDS a 37,6 g glycinu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

50% vodný roztok isopropanolu: Isopropanol byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:1. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Roztok pro extrakci gluteninů: 0,6057 g TRIS bylo rozpuštěno ve 100 ml 50% vodného roztoku isopropanolu, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 7,5. Tímto roztokem bylo převedeno 0,25 g DTT do odměrné baňky na 25 ml a doplněno po rysku. Roztok je nutné připravit čerstvý pro každé stanovení, krok s přidáním DTT musí být proveden těsně před použitím extrakčního roztoku.

Vzorkový pufr: Bylo smícháno 9,6 ml roztoku C, 8 ml roztoku D, 0,4 ml roztoku F, 12 ml glycerolu, 9,6 ml vody a 2 ml merkaptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 150 ml methanolu a 600 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je používán opakovaně.

Barvící roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomasie Blue G-250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je používán opakovaně.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

3.3.4 Příprava vzorků

Do mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo naváženo 200 mg pšeničné mouky. K navážce byl přidán 1 ml 50% vodného roztoku isopropanolu a směs byla protřepávána po dobu 30 minut pomocí vortexu Genie 2. Následně byla směs odstředěna při 2 500 g po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a sediment byl stejným postupem ještě dvakrát extrahován 50% vodným roztokem isopropanolu. Tímto způsobem byly vyextrahovány gliadiny. Ze sedimentu po extrakci gliadinů byly extrahovány gluteniny. Sediment byl důkladně rozmíchán v 1 ml extrakčního roztoku pro gluteniny a směs byla inkubována v termobloku při teplotě 60°C po dobu 30 minut s průběžným protřepáváním co 5 až 10 minut. Poté byla směs odstředěna při 10 000 g 10 minut. 0,5 ml supernatantu obsahujícího gluteniny bylo odpipetováno do čisté mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru. Hotové extrakty byly uchovávány v mrazničce při teplotě –18 °C.

3.3.5 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou a odmašťovacím přípravkem, následně byla opláchnuta destilovanou vodou a vyčištěna buničinou namočenou v ethanolu. Dále byla skla upevněna do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem svrchu byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

3.3.5.1 Separační gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 5.

Tab. 5: Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu (30 ml – 6 gelů)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	11,9
A	10,0
B	7,5
D	0,3
E	0,3
TEMED	0,012

Roztok E a roztok TEMED byly přidány těsně před nalitím roztoku mezi skla. Následně byl roztok nalit mezi skla, do výšky asi 2 cm od horního okraje. Zbylý roztok byl ponechán v kádince pro kontrolu ztuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven asi 5 mm vrstvou butanolu, aby došlo k vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody. Po ztuhnutí separačního gelu byl butanol slit a gel byl několikrát promyt destilovanou vodou a přebytek vody se odsál buničinou.

3.3.5.2 Zaostřovací gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 6.

Tab. 6: Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu (10 ml)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	6,8
A	1,7
C	1,25
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,01

Po přidání roztoku E a TEMED byl zaostřovací gel rovnoměrně nalit na vrstvu ztuhlého separačního gelu až po okraj a do prostoru mezi skly byl ihned vložen elektroforetický hřebínek tak, aby se v gelu nevytvořily bublinky. Hřebínek byl odstraňován po zatuhnutí gelu, až před nanášením vzorků, aby nedocházelo k vysýchání gelu. Hotový gel je možné uchovávat v lednici, nejdéle však do druhého dne.

3.3.6 Elektroforéza

Ze skel s připraveným a dokonale ztuhlým gelem byly odstraněny elektroforetické hřebínky, skla byla vytažena ze stojanu, očištěna od zbytků gelu a upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodovým roztokem a vnější prostor byl naplněn po rysku na vaně. Před dávkováním na gel byly vzorky odstředěny při 10 000 g po dobu 2 minut pro usazení sraženin, které by mohly bránit bílkovinám v průchodu gelem. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou byly do jamek nadávkovány odstředěné vzorky v množství 5 µl. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji a byla spuštěna elektroforéza, která probíhala prvních 10 minut při konstantním napětí 50 V, a po uplynutí této doby bylo změněno konstantní napětí na 100 V a elektroforéza probíhala ještě 110 minut. V průběhu elektroforézy bylo nutné kontrolovat, jestli elektrodový pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a případně pufr doplňovat.

3.3.7 Zviditelnění bílkovin

Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická skla s gelem vyjmuta ze stojanu tak, aby pufr odtekl do vnější nádoby a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo spodní sklo odlepeno od gelu a gel byl pod vodou sejmut z horního skla. Voda byla vylita z misky a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Poté byl stabilizační roztok slit a gel byl protřepáván 30 minut s barvícím roztokem. Po uplynutí této doby byl gel na třepačce promýván odbarvovacím roztokem po dobu 90 minut do dostatečného odbarvení. Po slití použitého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chránila před vysycháním. Hotové gely byly skladovány v chladničce při 4 °C. Při práci s gely bylo nutné po celou dobu používat ochranné gumové rukavice z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

3.4 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace gliadinových podjednotek byla provedena počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Kvůli nedostupnosti standardu nebyly tyto plochy píků přepočteny na koncentraci. Pro porovnání jednotlivých variant byly tedy použity příslušné plochy píků.

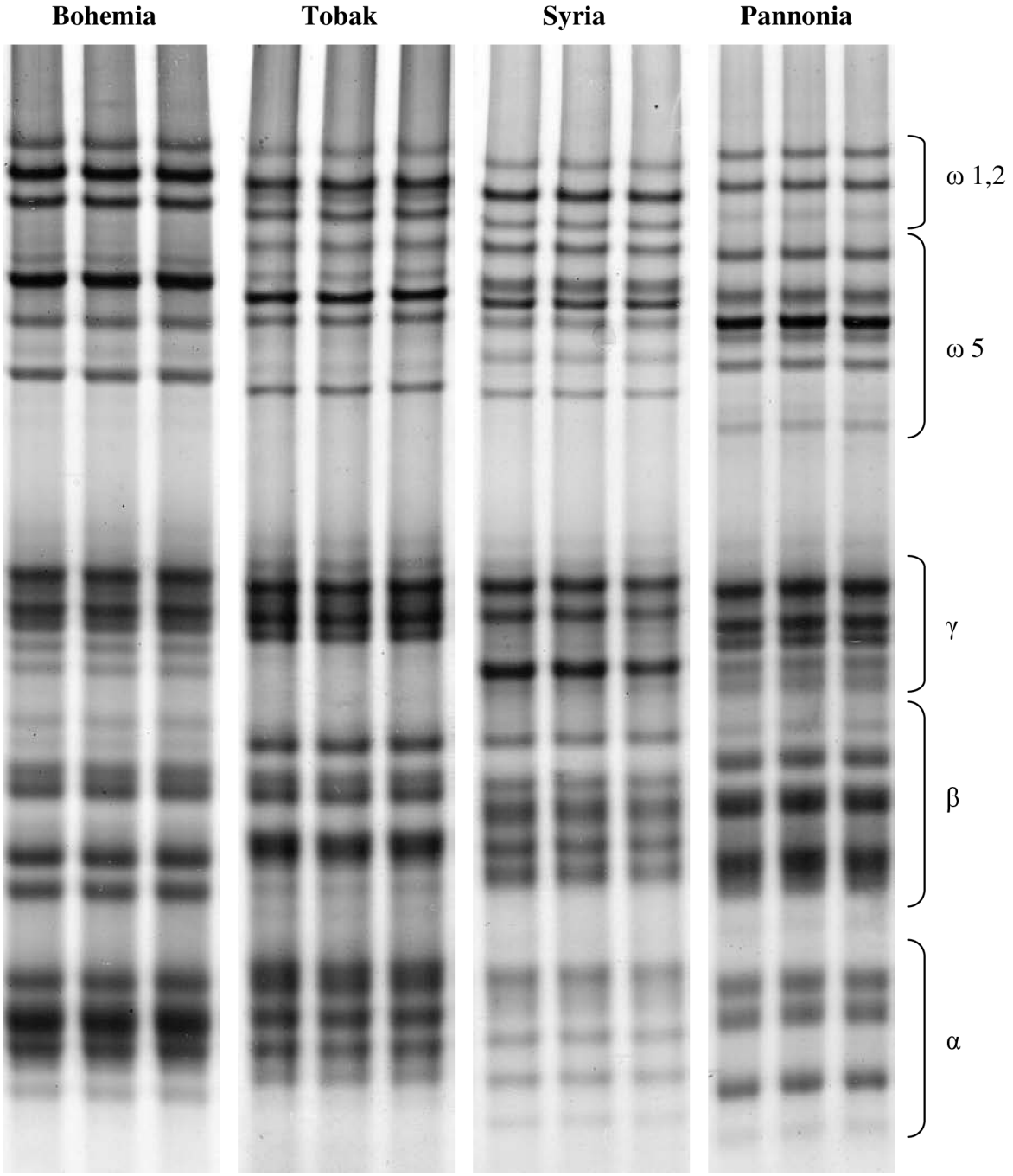
3.5 Statistické zpracování

Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického software Statistica 12 (StatSoft, USA). Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů, tj. vlivu teploty, stresu sucha, odrůdy a jejich vzájemných interakcí bylo použito vícefaktorové analýzy variance (ANOVA). Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry jednotlivých variant pak bylo využito následného (post-hoc) testování s použitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$. Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry pak byly varianty zařazeny do homogenních skupin, které jsou v grafech vyznačeny pomocí malých písmen nad, resp. pod body. Rozdílná písmena vyjadřují průkazný rozdíl při hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$. Výsledky byly graficky zpracovány v programu SigmaPlot 11 (SysStat, USA) ve formě bodových grafů s chybovými úsečkami znázorňujícími směrodatné odchylky.

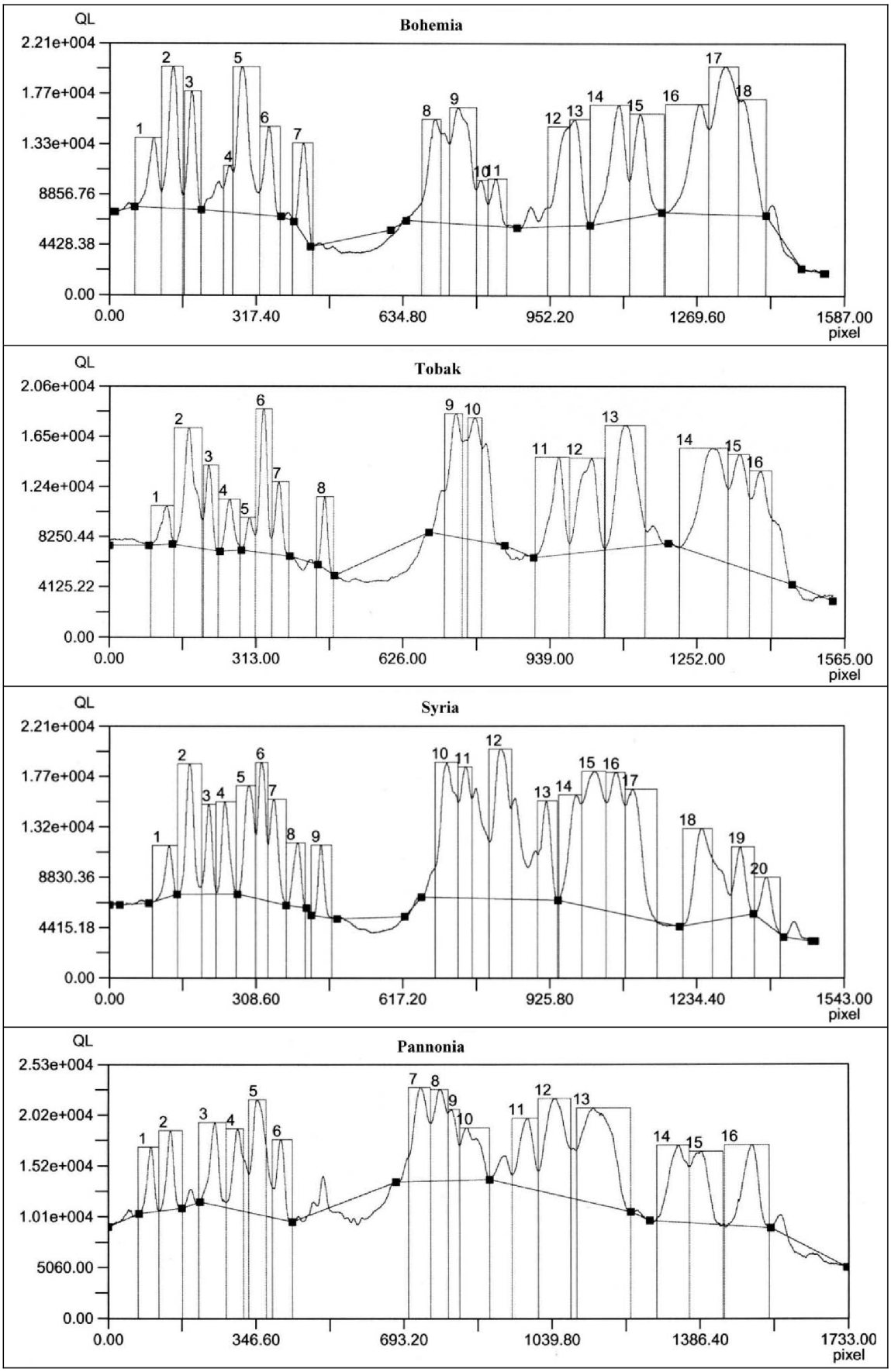
V programu Canoco 5 byla provedena vícerozměrná analýza hlavních komponent PCA (principal component analysis), resp. redundanční analýza (RDA analýza), pro zjištění vlivu sledovaných faktorů na jednotlivé gliadinové a gluteninové frakce.

4 VÝSLEDKY

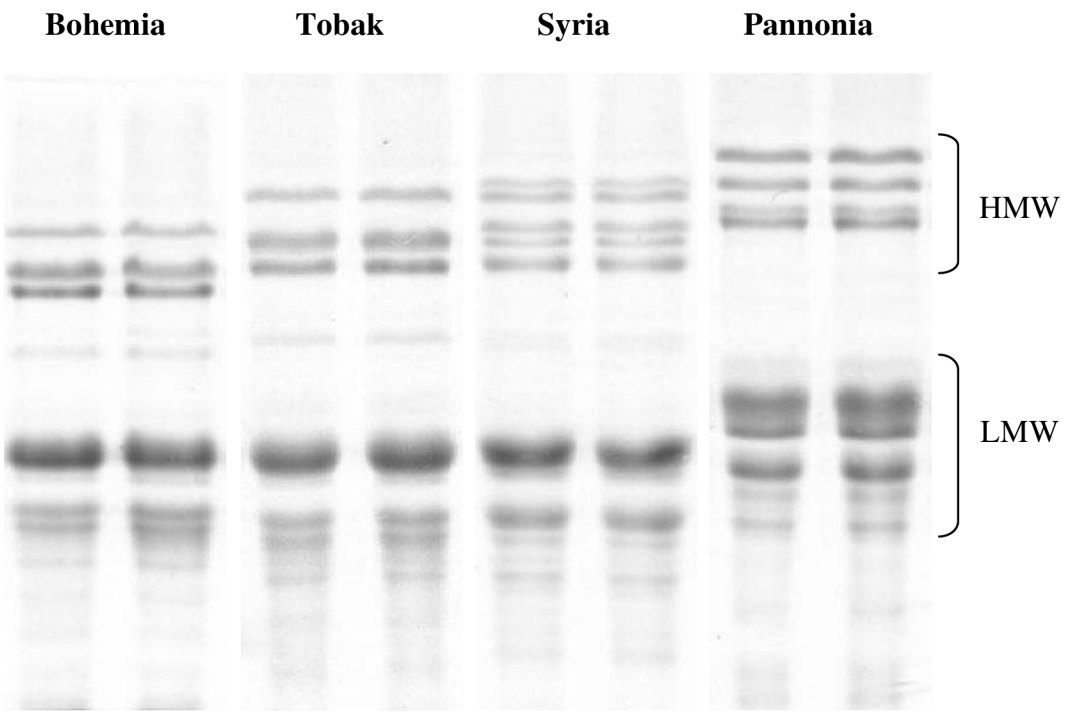
Na obrázcích 10 a 12 jsou znázorněny gely, které byly získány při experimentální části této diplomové práce. Představují spektrum gliadinů a gluteninů čtyř odrůd pšenice ozimé: Bohemia, Tobak, Syria a Pannonia. Převedení jednotlivých zón gelů na píky, jejichž plochy byly dále použity k vyhodnocení, je uvedeno na obrázcích 11 a 13. Některé slabé zóny poskytovaly píky o malých plochách a mohlo by docházet k velkým odchylkám, proto tyto hodnoty nebyly použity pro vyhodnocení.



Obr. 10: A-PAGE gliadinových proteinů čtyř odrůd pšenice ozimé – Bohemia, Tobak, Syria, Pannonia – s popisem gliadinových frakcí.



Obr. 11: Převedení zón na píky v rámci A-PAGE gliadinové frakce jednotlivých odrůd pšenice ozimé.

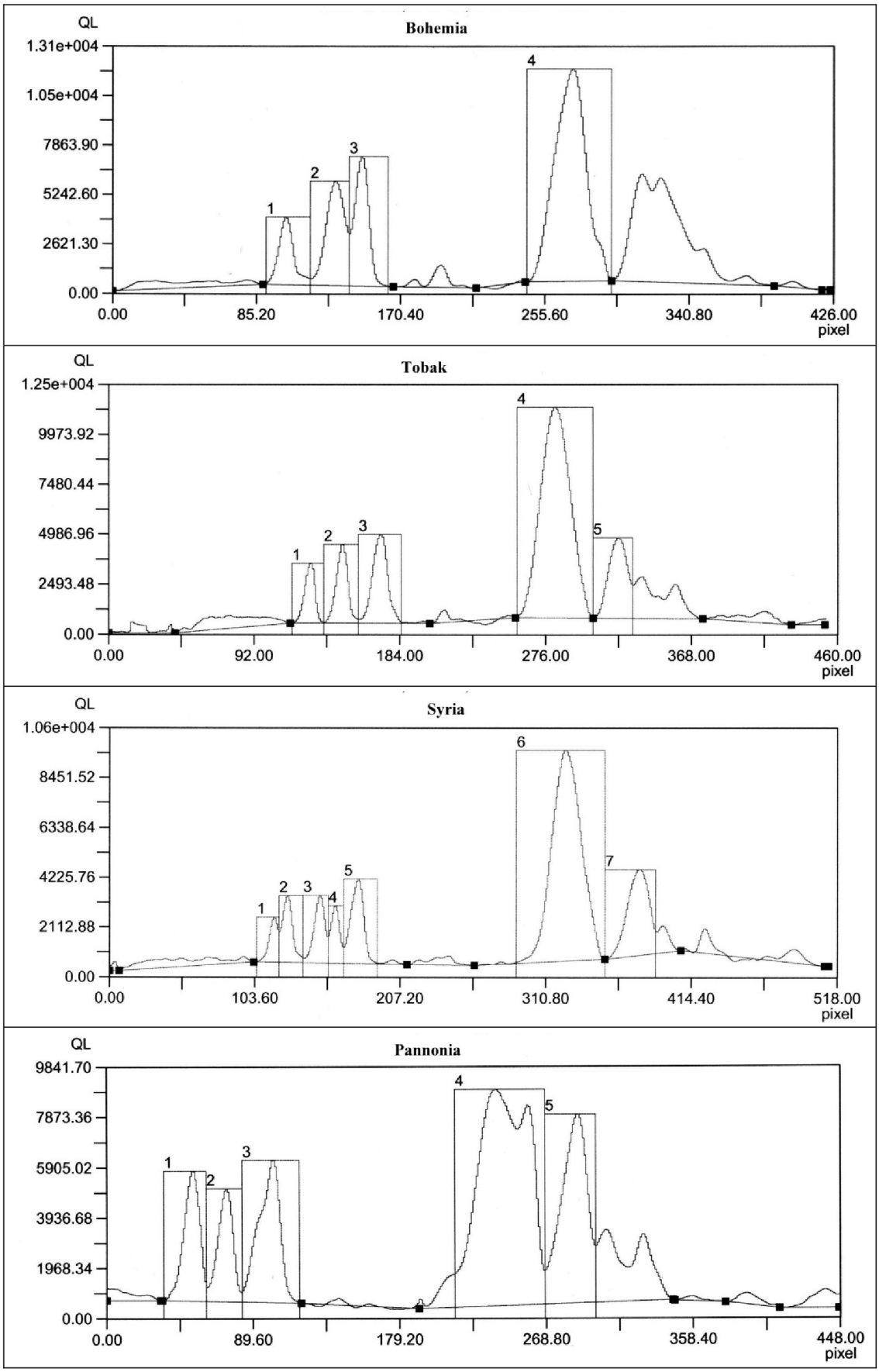


Obr. 12: SDS-PAGE gluteninových proteinů čtyř odrůd pšenice ozimé – Bohemia, Tobak, Syria, Pannonia – s popisem gluteninových frakcí.

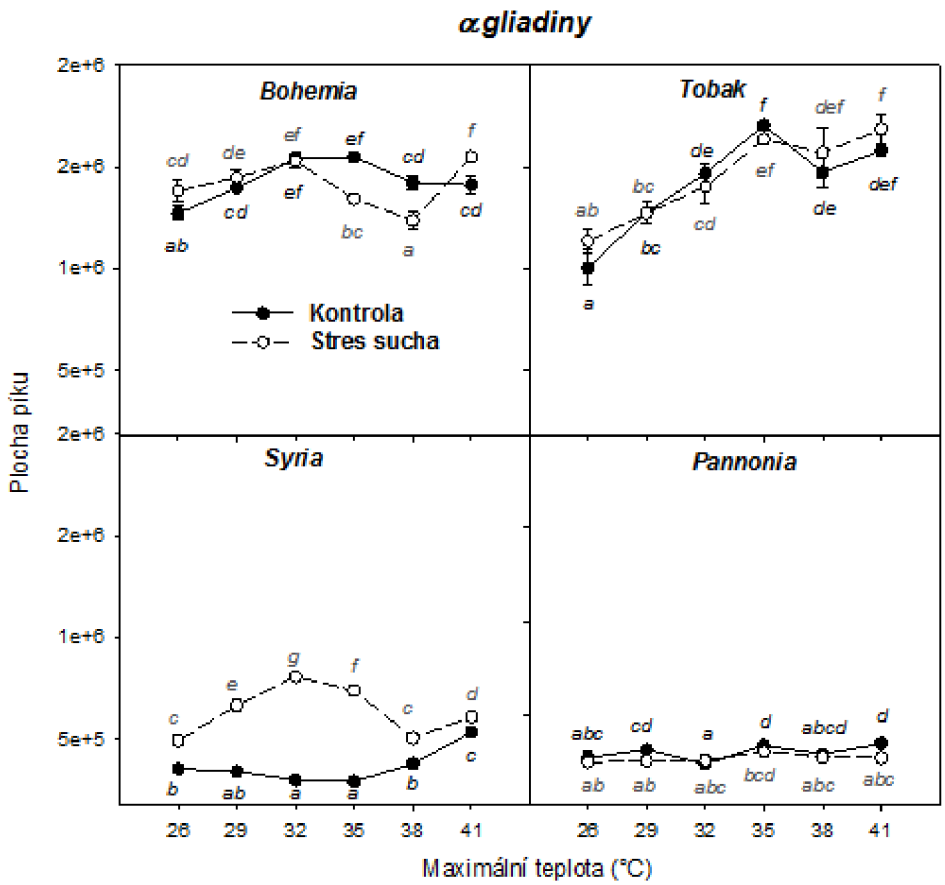
Jak lze vidět na obrázcích 10 a 12, už na gelech jsou mezi odrůdami viditelné rozdíly v jednotlivých gliadinových i gluteninových frakcích. Spektra píků na obrázcích 11 a 13 toto přehledně potvrzují.

Nejbohatší na jednotlivé gliadinové i gluteninové frakce je odrůda Syria. Od ostatních odrůd se liší zejména vysokým počtem jednotlivých frakcí ω5-gliadinů, β-gliadinů a vysokomolekulárních gluteninů. Má až šest frakcí ω5-gliadinů, pět frakcí β-gliadinů a HMW gluteninů a celkově až dvacet frakcí gliadinů. Rovněž odrůda Tobak má vysoký počet ω5-gliadinů, konkrétně pět, ale má pouze tři frakce γ-gliadinů, z toho dvě v koeluci na gelu. Spolu s odrůdou Pannonia má Tobak nejnižší počet jednotlivých β-gliadinů, jak i celkových gliadinových frakcí, a to šestnáct. U odrůdy Bohemia bylo detekováno osmnáct frakcí gliadinů. Metodou SDS-PAGE byly na gelech rozlišeny tři frakce HMW gluteninů u odrůd Bohemia, Tobak a Pannonia. Větší rozdíly jsou mezi LMW gluteniny, se kterými mohla být na gelu přítomna rezidua ω5-gliadinů, proto se pro další výpočty používaly pouze nejvýraznější zóny.

Grafy na obrázcích 14 až 23 znázorňují srovnání vlivu teploty a sucha na gliadinové a gluteninové frakce, jejich celkové množství a na poměr gliadiny/gluteniny. Body v grafech jsou označeny malými písmeny, která určují statisticky významný rozdíl mezi variantami na základě následného testování ANOVA Tukeyho testem při hladině významnosti $p = 0{,}05$. Pokud jsou porovnávané body označeny stejným písmem, není mezi nimi statisticky významný rozdíl.

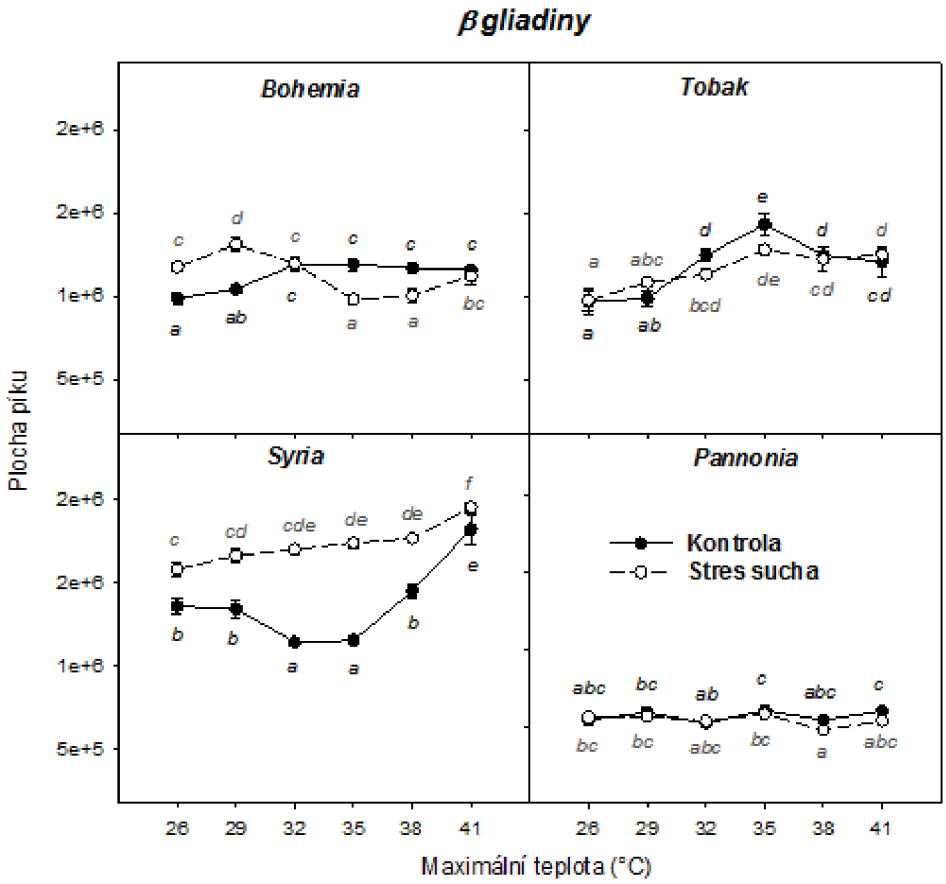


Obr. 13: Převedení zón na píky v rámci SDS-PAGE gluteninové frakce jednotlivých odrůd pšenice ozimé.



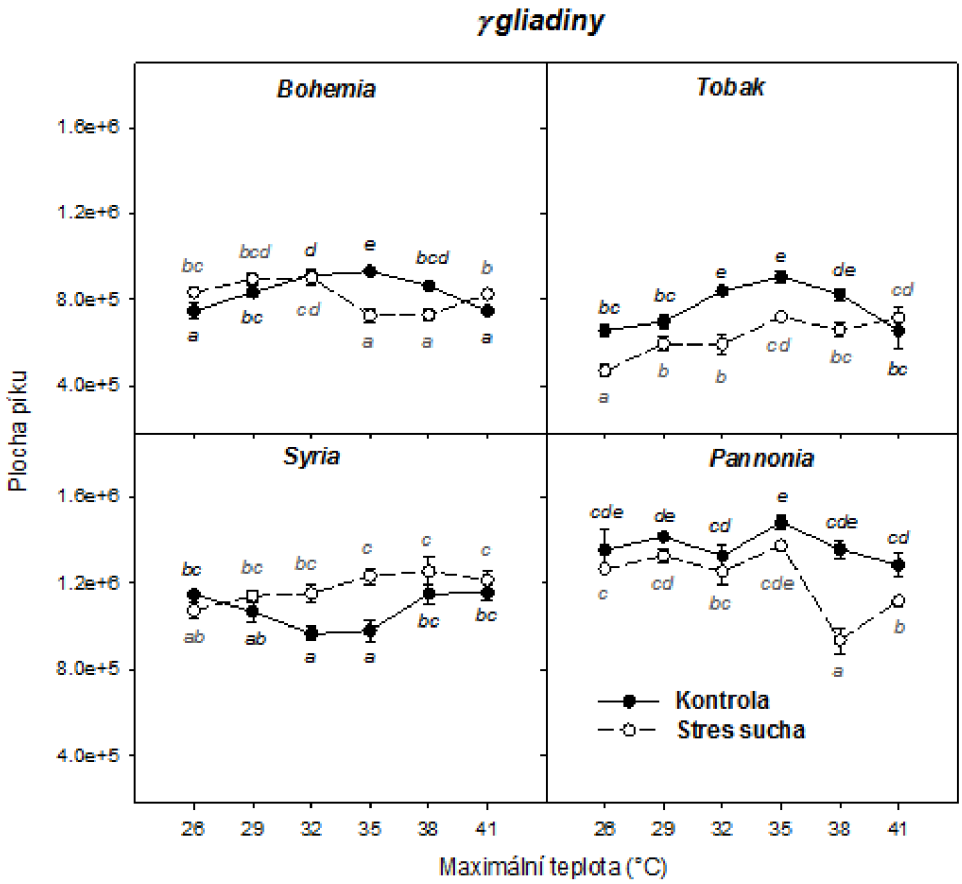
Obr. 14: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah α-gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Obsah α-gliadinů v zrně pšenice vykazuje značné rozdíly mezi odrůdami. Zatímco odrůdy Bohemia a Tobak vykazují vyšší obsahy α-gliadinů, u odrůdy Syria a především Pannonia je tento obsah obecně malý. Odrůdy Bohemia a Tobak také vykazují podobný charakter odezvy na teplotu a stres sucha. Se zvyšující se teplotou se obsah α-gliadinů zvyšuje, a to až do teploty 35 °C, u odrůdy Tobak pro obě varianty zásobení vodou a u odrůdy Bohemia jen u kontrolní varianty. U odrůdy Bohemia dochází k nárůstu α-gliadinů při stresu sucha jen do teploty 32 °C. Tyto nárůsty obsahu α-gliadinů s teplotou jsou statisticky průkazné, většinou ale až při srovnání rozdílů teplot o 6 °C. Vliv sucha na obsah α-gliadinů je u obou odrůd velmi malý, u odrůdy Tobak rovněž statisticky neprůkazný napříč všemi teplotami, u odrůdy Bohemia stres sucha průkazně snižuje obsah α-gliadinů při teplotách 35 a 38 °C. Naopak při teplotách 26 °C a 41 °C vlivem sucha obsah α-gliadinů průkazně stoupá. U odrůdy Syria je na rozdíl od předchozích dvou odrůd patrný významný vliv sucha. Stres sucha u této odrůdy průkazně zvyšuje obsah α-gliadinů s maximem při 32 °C. Naopak při dostatku vláhy není tento trend vlivu teploty pozorován a nárůst obsahu α-gliadinů se projevuje až při teplotách nad 38 °C. Ačkoliv jsou u odrůdy Pannonia v některých případech rozdíly statisticky průkazné, obecně je vliv jak teploty, tak i stresu sucha na obsah α-gliadinů minimální. Obsah α-gliadinů je u odrůdy Pannonia spíše mírně nižší při stresu sucha.



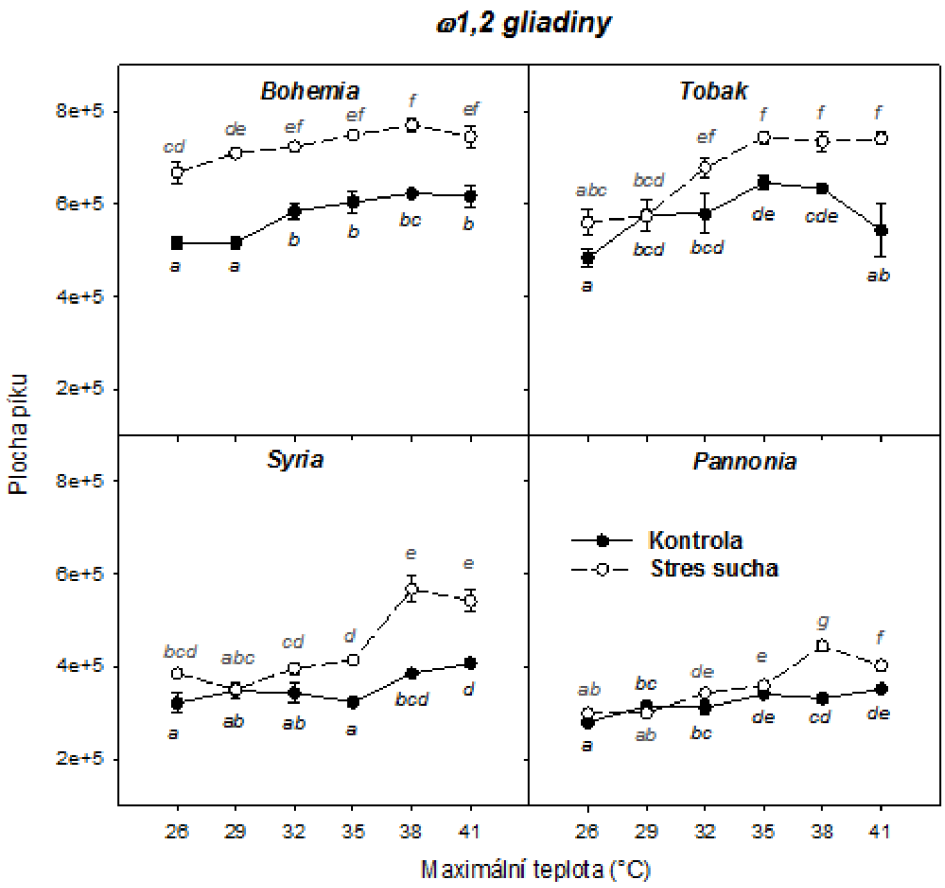
Obr. 15: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah β-gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Odrůdy Bohemia, Tobak a Syria vykazují vyšší obsah β-gliadinů v zrně oproti odrůdě Pannonia. U odrůdy Bohemia roste obsah β-gliadinů pouze do teploty 32 °C u kontrolní varianty. Při stresu sucha dochází k nárůstu obsahu β-gliadinů při teplotě 29 °C a k poklesu obsahu β-gliadinů při teplotách 35 a 38 °C. U odrůdy Tobak dochází k nárůstu obsahu β-gliadinů až do teploty 35 °C u obou variant zásobení vodou. Tyto nárůsty obsahu β-gliadinů jsou výraznější u kontrolní varianty, při stresu sucha jsou statisticky průkazné až při srovnání rozdílů teplot o 6 °C. U obou odrůd Bohemia i Tobak je vliv sucha na obsah β-gliadinů podobný jako na obsah α-gliadinů. U odrůdy Bohemia je statisticky průkazný zvýšený obsah β-gliadinů při teplotách 26 a 29 °C vlivem sucha, a naopak při teplotách 35 a 38 °C dochází ke snížení obsah β-gliadinů vlivem působení sucha. U odrůdy Tobak je vliv sucha opět statistický neprůkazný napříč všemi teplotami. Vliv teploty na obsah β-gliadinů u odrůdy Syria je významný zejména u kontrolní varianty, u které dochází ke snížení obsahu β-gliadinů při teplotách 32 a 35 °C. U obou variant pak dochází k výraznému zvýšení obsahu β-gliadinů při teplotě 41 °C. Stres sucha u této odrůdy průkazně zvyšuje obsah β-gliadinů, stejně jako tomu je u α-gliadinů. U odrůdy Pannonia je vliv teploty na obsah β-gliadinů minimální a vliv sucha není u této odrůdy vůbec pozorován.



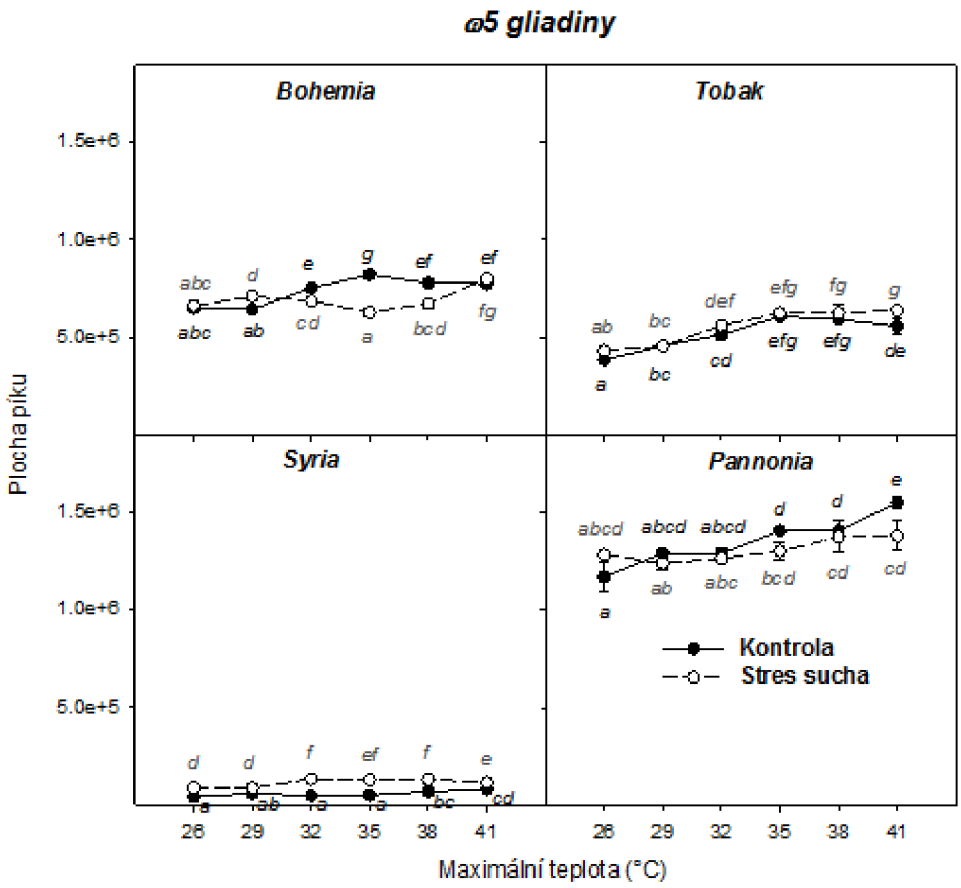
Obr. 16: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah γ-gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Odrůdy Bohemia a Tobak vykazují malý obsah γ-gliadinů v porovnání s ostatními odrůdami, zejména s odrůdou Pannonia, u které je obsah γ-gliadinů nejvyšší. U odrůd Bohemia a Tobak je u kontrolních variant pozorována teplotní závislost s maximálním obsahem γ-gliadinů při 35 °C. Při stresu sucha dochází u odrůdy Bohemia k výraznému snížení obsahu γ-gliadinů při teplotách 35 a 38 °C, zatímco u odrůdy Tobak se obsah γ-gliadinů při stresu sucha zvyšuje až do 35 °C. Vlivem sucha dochází u odrůdy Bohemia ke snížení obsahu γ-gliadinů při teplotách 35 a 38 °C, a naopak ke zvýšení obsahu γ-gliadinů při krajních teplotách 26 a 41 °C. Stres sucha průkazně snižuje obsah γ-gliadinů u odrůdy Tobak, pouze při teplotě 41 °C je vliv sucha na γ-gliadiny statisticky neprůkazný. U odrůdy Syria lze pozorovat opačný charakter odezvy na teplotu u kontrolní varianty než u předchozích odrůd. Dochází k poklesu obsahu γ-gliadinů do teploty 32 °C a k následnému zvýšení obsahu γ-gliadinů při teplotách 38 a 41 °C. Při nedostatku vody lze pozorovat pouze mírný nárůst obsahu γ-gliadinů, statisticky průkazný jen při porovnání rozdílů mezi teplotami 26 a 35 °C. Vlivem sucha dochází ke zvýšení obsahu γ-gliadinů u této odrůdy pouze při teplotách 32 a 35 °C. U odrůdy Pannonia je vliv teploty i sucha většinou statisticky neprůkazný. Dochází pouze ke snížení obsahu γ-gliadinů vlivem sucha při teplotách 38 a 41 °C.



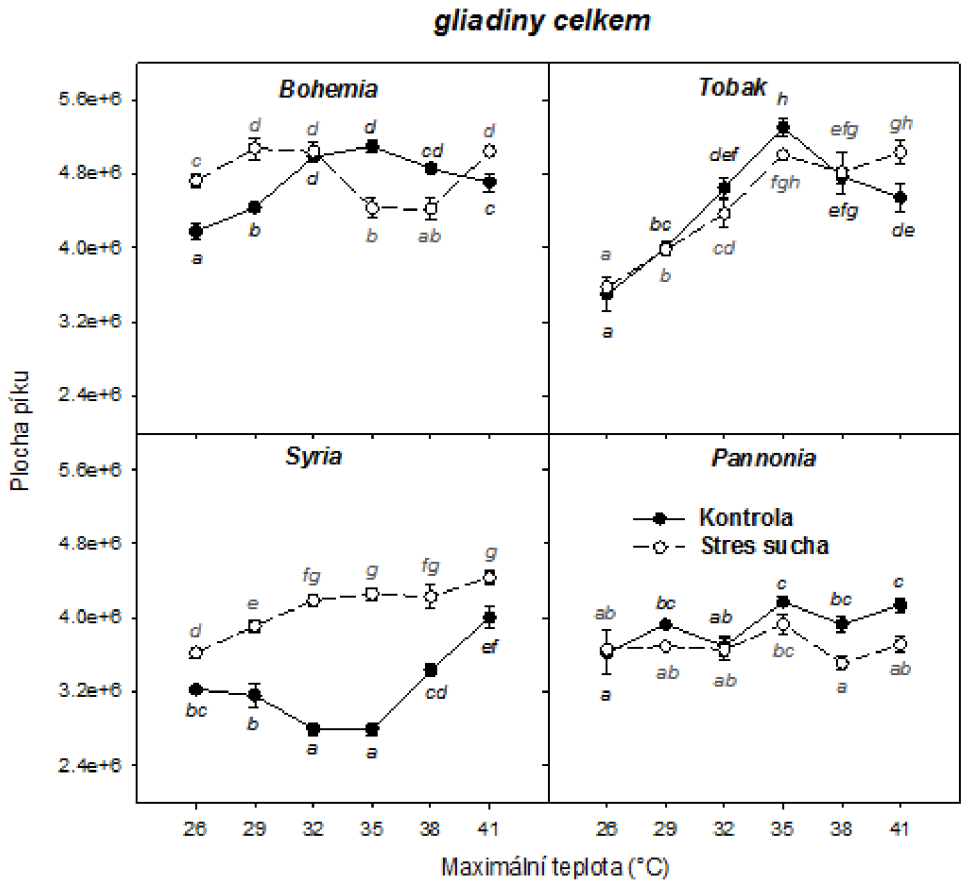
Obr. 17: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah ω1,2-gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Obsah ω1,2-gliadinů v zrně je podobně jako u α- a β-gliadinů nejvyšší u odrůd Bohemia a Tobak a nejnižší u odrůdy Pannonia. U odrůdy Bohemia se obsah ω1,2-gliadinů s rostoucí teplotou mírně zvyšuje u obou variant zásobení vodou, statisticky významný je nárůst obsahu ω1,2-gliadinů do teploty 32 °C u kontrolní varianty. Při suchu dochází ke zvýšení obsahu ω1,2-gliadinů zejména při teplotách 29 a 38°C. U této odrůdy je patrný významný vliv sucha, který průkazně zvyšuje obsah ω1,2-gliadinů v zrnu. U odrůdy Tobak dochází k nárůstu ω1,2-gliadinů při obou variantách zásobení vodou až do teploty 35 °C. Tyto nárůsty jsou statisticky průkazné až při srovnání rozdílů mezi teplotami o 6 °C. Kontrolní varianta této odrůdy vykazuje pokles obsahu ω1,2-gliadinů při teplotě 41 °C. Vlivem sucha obsah ω1,2-gliadinů u této odrůdy průkazně stoupá při teplotách nad 32 °C. U odrůdy Syria se obsah ω1,2-gliadinů statisticky významně zvyšuje až od 38 °C u obou variant. Stres sucha průkazně zvyšuje obsah ω1,2-gliadinů při všech teplotách kromě 29 °C. U odrůdy Pannonia dochází vlivem teploty k mírnému nárůstu obsahu ω1,2-gliadinů, statisticky významnému většinou až při porovnání rozdílů teplot o 6 °C. U kontrolní varianty se obsah ω1,2-gliadinů zvyšuje s rostoucí teplotou pouze do 35 °C. Při stresu sucha dochází k významnému zvýšení obsahu ω1,2-gliadinů až do 38 °C a při 41 °C obsah ω1,2-gliadinů průkazně klesá. U této odrůdy stres sucha zvyšuje obsah ω1,2-gliadinů při teplotách nad 38 °C.



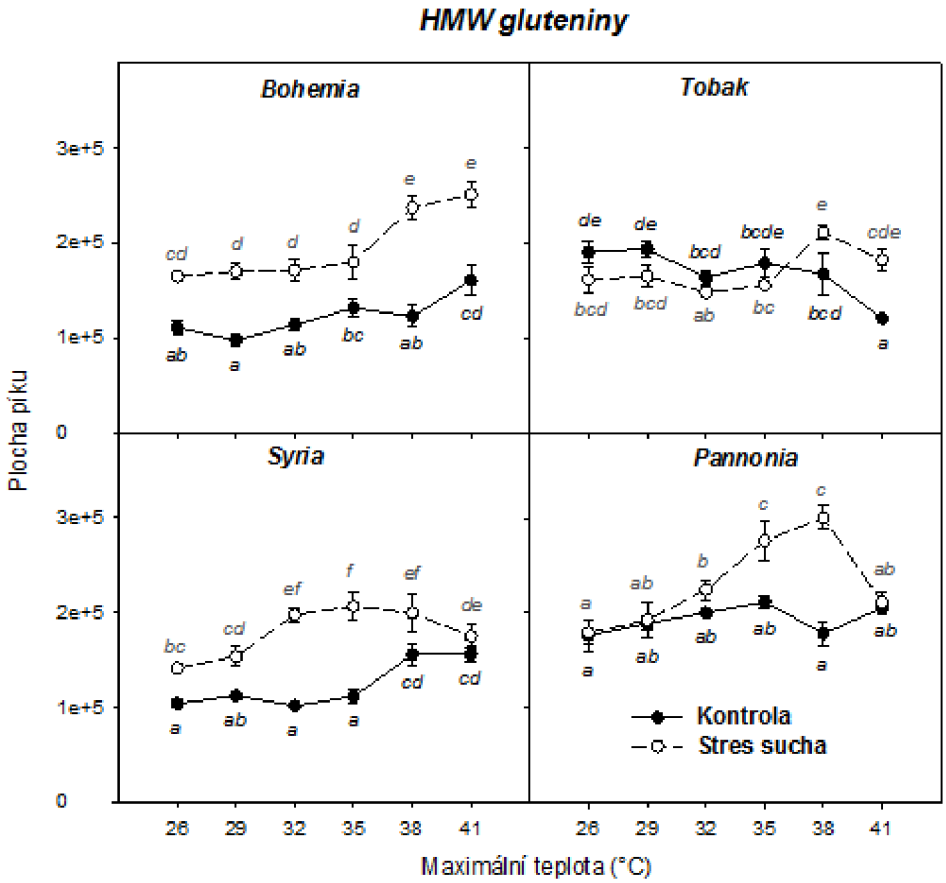
Obr. 18: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah ω5-gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Porovnáním obsahů ω5-gliadinů mezi odrůdami jsou patrné velké rozdíly. Obsah ω5-gliadinů v zrnu je nejnižší u odrůdy Syria a nejvyšší u odrůdy Pannonia. Odrůdy Bohemia a Tobak mají podobné obsahy ω5-gliadinů a také vykazují obdobný charakter odezvy na teplotu a stres sucha. Vlivem teploty dochází k nárůstu obsahu ω5-gliadinů do 35 °C, u odrůdy Tobak pro obě varianty zásobení vodou, u odrůdy Bohemia jen u kontrolní varianty. Při nedostatku vláhy se u odrůdy Bohemia obsah ω5-gliadinů mírně zvyšuje do 29 °C a další nárůst obsahu ω5-gliadinů je patrný mezi teplotami 35 až 41 °C. Vliv sucha u odrůdy Bohemia zvyšuje obsah ω5-gliadinů při 29 °C, a naopak snižuje při teplotách 35 a 38 °C. U odrůdy Tobak je vliv sucha statisticky průkazný pouze při teplotě 41 °C, kdy dochází k mírnému zvýšení obsahu ω5-gliadinů v zrnu. Ačkoliv jsou u odrůdy Syria v některých případech rozdíly statisticky průkazné, obecně je vliv teploty na obsah ω5-gliadinů minimální a vlivem sucha je obsah ω5-gliadinů pouze mírně vyšší. I u odrůdy Pannonia je vliv teploty na obsah ω5-gliadinů minimální, hlavně u varianty při nedostatku vláhy. U kontrolní varianty dochází k mírnému zvýšení obsahu ω5-gliadinů s rostoucí teplotou. Vliv sucha se projevuje pouze při 41 °C poklesem obsahu ω5-gliadinů v zrnu.



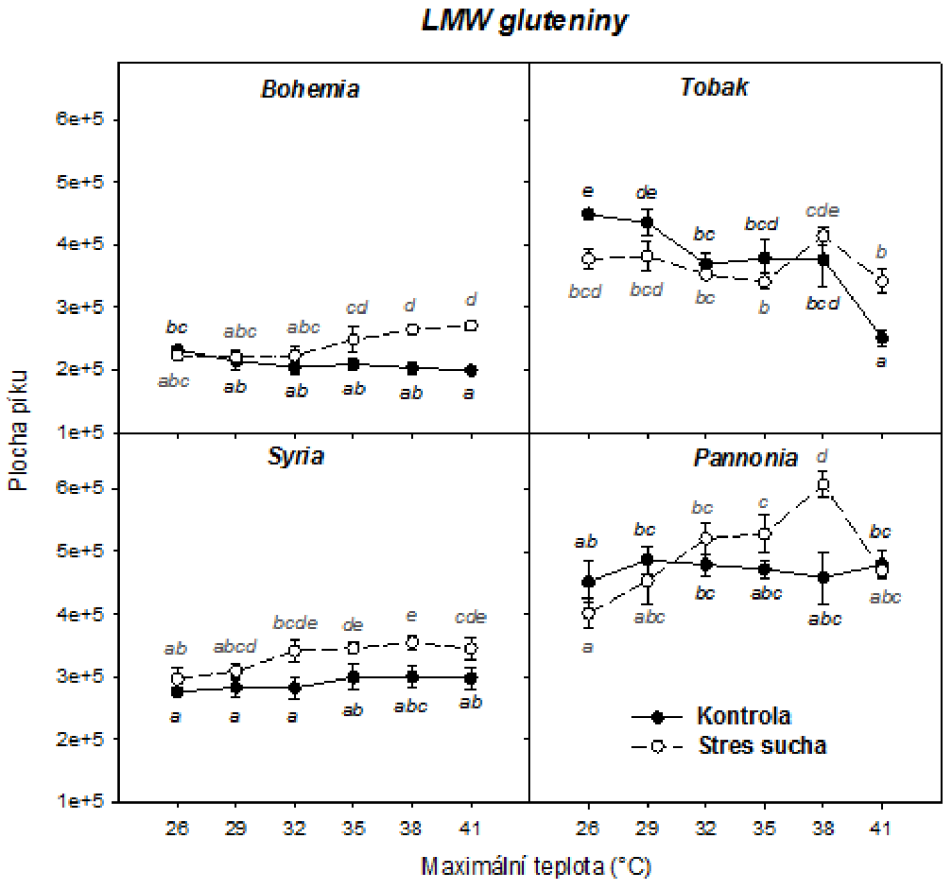
Obr. 19: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na celkový obsah gliadinů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Porovnáním celkového obsahu všech frakcí gliadinů lze vidět jednoznačné rozdíly vlivu teploty i sucha mezi jednotlivými odrůdami. Odrůdy Bohemia a Tobak vykazují podobný charakter odezvy na teplotu u kontrolních variant s typickou teplotní závislostí s maximem při 35 °C. U odrůdy Bohemia dochází při stresu sucha k nárůstu celkového množství gliadinů jen do teploty 29 °C. Stres sucha u této odrůdy významně snižuje celkový obsah gliadinů při teplotách 35 a 38 °C, a naopak zvyšuje při krajních teplotách: 26 až 29 °C a 41 °C. U odrůdy Tobak narůstá obsah gliadinů intenzivněji než u odrůdy Bohemia, a to jak u kontrolní varianty, tak při stresu sucha. Vliv sucha je u této odrůdy statisticky průkazný jen při nejvyšší teplotě 41 °C, kdy celkový obsah gliadinů stoupá. U odrůdy Syria je jasně patrný významný vliv sucha na celkový obsah gliadinů, který je průkazně vyšší než u kontrolní varianty. U této odrůdy se při stresu sucha rovněž projevuje nárůst celkového množství gliadinů se zvyšující se teplotou až do 32 °C. Naopak při dostatku vláhy dochází při teplotách 32 a 35 °C ke snížení celkového obsahu gliadinů a nárůst obsahu gliadinů je významný až při teplotách nad 38 °C. U odrůdy Pannonia je vliv teploty minimální, u obou variant zásobení vodou dochází k malému nárůstu celkového obsahu gliadinů do teploty 35 °C. Vliv sucha na celkový obsah gliadinů je u této odrůdy až do 35 °C neprůkazný a při vyšších teplotách 38 a 41 °C dochází k poklesu celkového množství gliadinů při nedostatku vláhy.



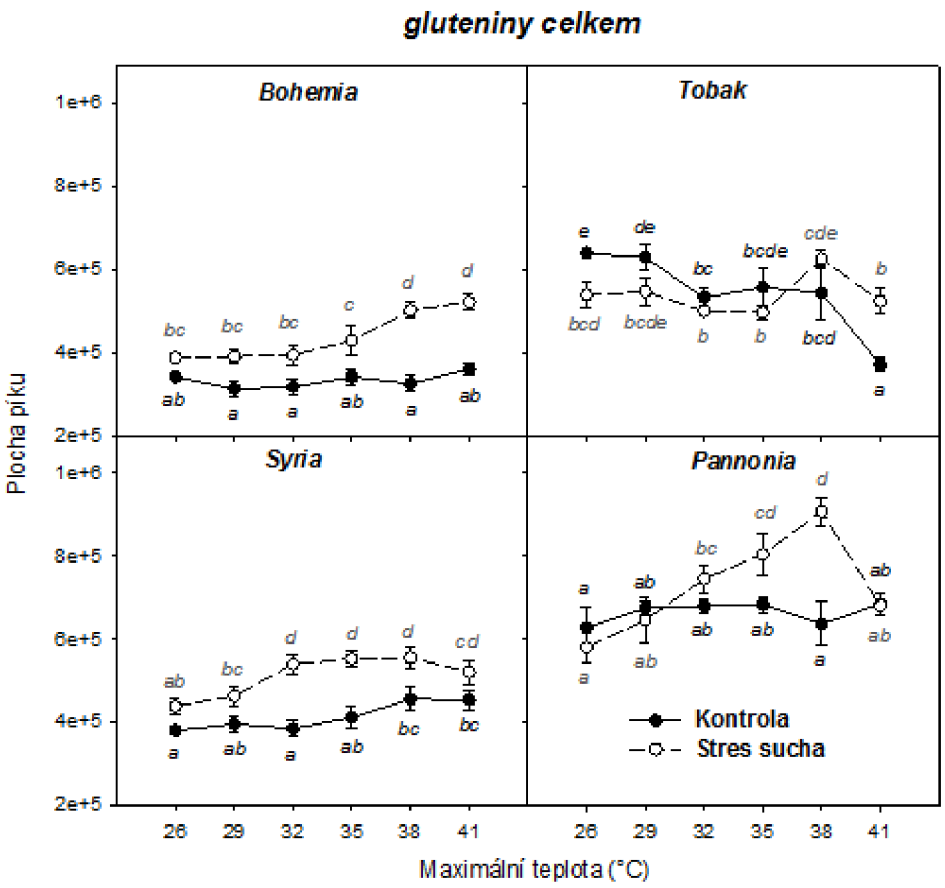
Obr. 20: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah vysokomolekulárních gluteninů (HMW) v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Obsah HMW gluteninů v zrnu je u všech čtyř odrůd obecně stejný. Vliv teploty je u většiny odrůd statisticky průkazný až při vysokých teplotách. U odrůdy Bohemia je významný nárůst obsahu HMW gluteninů až při teplotě 41 °C u kontrolní varianty. Při stresu sucha u odrůd Bohemia a Tobak obsah HMW gluteninů stoupá při teplotách nad 38 °C, stejně jako u odrůdy Syria při dostatku vláhy. Naopak u odrůdy Tobak dochází při teplotě 41 °C k poklesu obsahu HMW gluteninů u kontrolní varianty. Odrůdy Syria a Pannonia vykazují podobný charakter odezvy na teplotu při stresu sucha. Se zvyšující se teplotou se obsah HMW gluteninů zvyšuje až do teploty 35 °C (resp. 32 °C u odrůdy Syria), ale při nejvyšší teplotě 41 °C obsah HMW gluteninů klesá. U odrůdy Pannonia je vliv teploty u kontrolní varianty neprůkazný. Vliv sucha obecně zvyšuje obsah HMW gluteninů u všech odrůd. U odrůdy Bohemia je obsah HMW gluteninů při suchu vyšší napříč všemi teplotami, podobně jako u odrůdy Syria, u které je vliv sucha statisticky neprůkazný pouze při teplotě 41 °C. U odrůdy Tobak sucho zvyšuje obsah HMW gluteninů při teplotách 38 a 41 °C, a u odrůdy Pannonia při teplotách 35 a 38 °C.



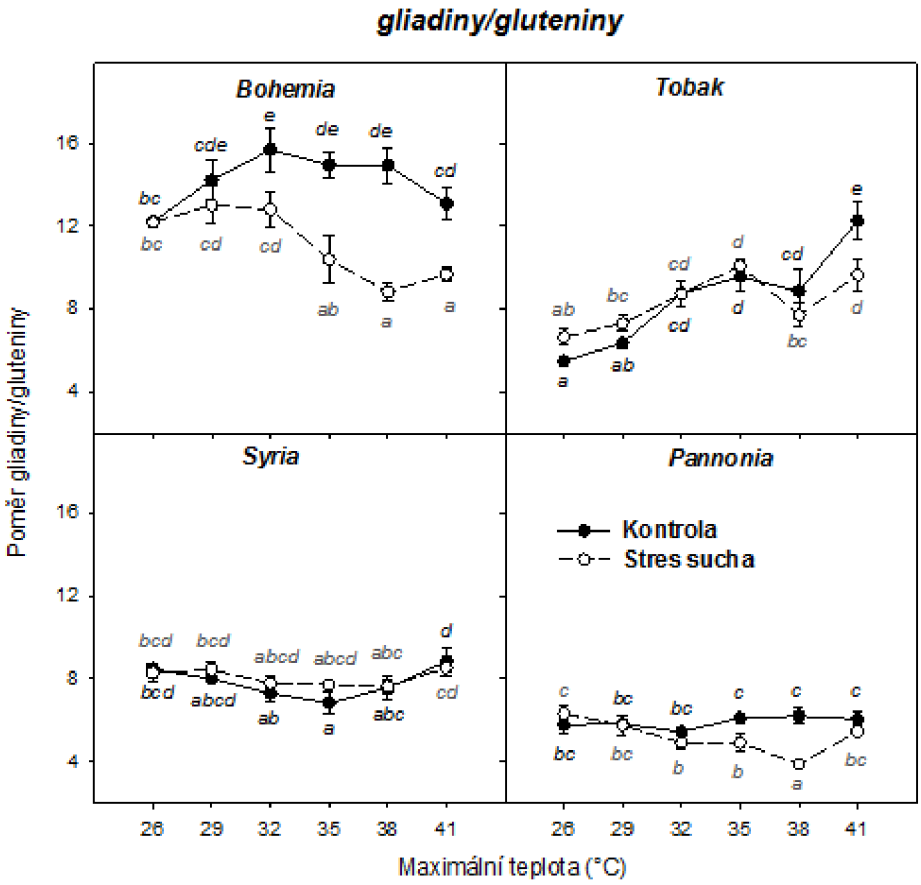
Obr. 21: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na obsah nízkomolekulárních gluteninů (LMW) v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vliv teploty a sucha na obsah LMW gluteninů je většinou u zkoumaných čtyř odrůd podobný. Vliv teploty u kontrolních variant je statisticky průkazný pouze u odrůdy Tobak, u které obsah LMW gluteninů s rostoucí teplotou klesá. Obzvlášť významný je pokles při 41 °C. Při nedostatku vody je vliv teploty na obsah HMW gluteninů u odrůd Bohemia, Tobak a Syria minimální. Nejvýznamnější je zvýšení obsahu LMW gluteninů při 38 °C u odrůdy Tobak. Při suchu se obsah LMW gluteninů u odrůdy Pannonia zvyšuje s rostoucí teplotou až do 38 °C. Vliv sucha je prokazatelný zejména u odrůd Bohemia a Syria. Dochází k malému nárůstu obsahu LMW gluteninů při teplotách nad 35 °C u odrůdy Bohemia a 32 °C u odrůdy Syria. U odrůdy Tobak sucho zvyšuje obsah LMW gluteninů při teplotě 41 °C, a naopak snižuje při teplotě 26 °C. U odrůdy Pannonia je statisticky průkazný vliv sucha na obsah LMW gluteninů pouze při teplotě 38 °C, kdy se obsah LMW gluteninů v zrnu při nedostatku vláhy zvyšuje.



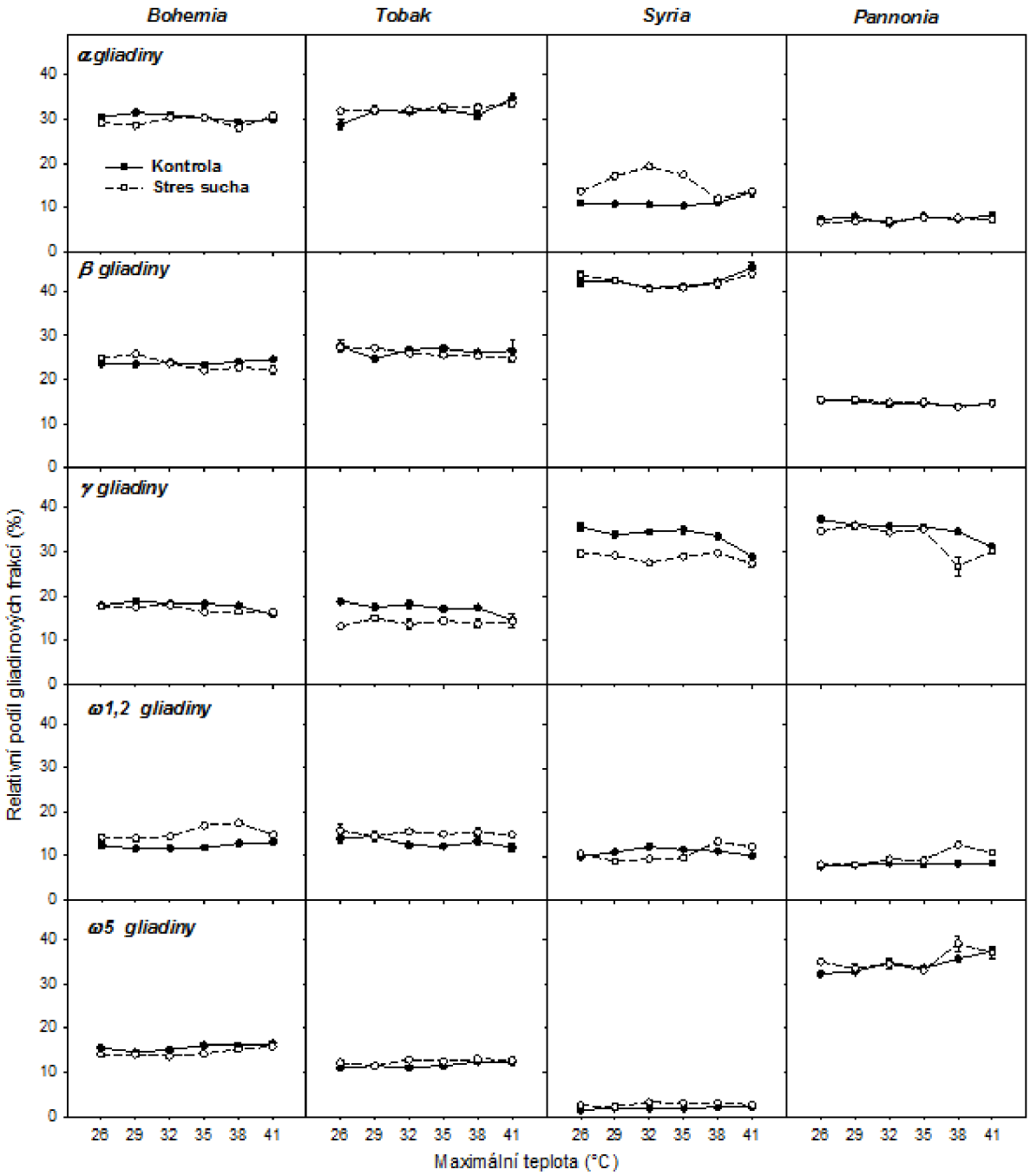
Obr. 22: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na celkový obsah gluteninů v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vliv teploty na celkový obsah gluteninů je průkazný u všech odrůd při stresových podmínkách nedostatku vláhy. U odrůdy Bohemia dochází ke zvýšení obsahu gluteninů při vysokých teplotách 38 a 41 °C, u odrůdy Syria se obsah gluteninů zvyšuje do 32 °C, u odrůdy Pannonia až do 38 °C (statisticky průkazné až při srovnání rozdílů teplot o 6 °C). U těchto odrůd nemá teplota prokazatelný vliv na obsah gluteninů při dostatku vláhy. Pouze u odrůdy Syria došlo k mírnému zvýšení obsahu celkových gluteninů při nejvyšších teplotách 38 a 41 °C. U odrůdy Tobak lze pozorovat zcela jiný charakter odezvy stresových podmínek na obsah gluteninů. U kontrolní varianty obsah gluteninů s rostoucí teplotou klesá, přičemž při nejvyšší teplotě 41 °C je tento pokles největší. U této odrůdy se při stresu sucha vliv teploty projevuje pouze při 38 °C, kdy dochází k nárůstu obsahu gluteninů oproti nejbližším vedlejším teplotám. Vlivem sucha se obsah gluteninů u odrůdy Bohemia zvyšuje od 29 °C, u odrůdy Syria od 32 až 38 °C, a u odrůdy Pannonia pouze při teplotách 35 a 38 °C. U odrůdy Tobak má sucho vliv na obsah celkových gluteninů pouze při krajních teplotách, kdy při 41°C dochází k nárůstu obsahu gluteninů, ale při 26°C je celkové množství gluteninů nižší než u kontrolní varianty.



Obr. 23: Vliv teploty v době kvetení a stresu sucha na poměr obsahu gliadinů k obsahu gluteninů (gliadiny/gluteniny) v zrně čtyř odrůd pšenice ozimé. Body znázorňují aritmetické průměry a chybové úsečky směrodatné odchylky ze tří opakování. Rozdílná písmena vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami, která byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

U odrůd Bohemia a Tobak byl prokázán vliv teploty na poměr gliadinů ke gluteninům v zrnu. Při kontrolní variantě u odrůdy Bohemia je poměr gliadiny/gluteniny nejnižší při krajních teplotách 26 a 41 °C. Při stresu sucha se poměr gliadinů ke gluteninům u této odrůdy snižuje až při teplotách nad 35 °C. U odrůdy Bohemia je navíc průkazný rovněž vliv sucha na poměr gliadiny/gluteniny, který při teplotách nad 32 °C klesá. S rostoucí teplotou se u odrůdy Tobak zvyšuje poměr gliadinů ke gluteninům při obou variantách zavlažování. Vliv sucha je průkazný až při 41 °C, kdy dochází k poklesu poměru gliadiny/gluteniny. U odrůdy Syria je vliv sucha na poměr gliadiny/gluteniny neprůkazný, stejně jako vliv teploty při nedostatku vody. U kontrolní varianty poměr gliadiny/gluteniny s rostoucí teplotou jen mírně klesá, ale při nejvyšší teplotě 41 °C je průkazný nárůst poměru gliadiny/gluteniny. U odrůdy Pannonia nemá teplota vliv na poměr gliadinů ke gluteninům u kontrolní varianty a při stresu sucha je průkazné snížení poměru pouze při 38 °C. U této odrůdy vliv sucha snižuje poměr gliadiny/gluteniny při teplotách 35 a 38 °C.

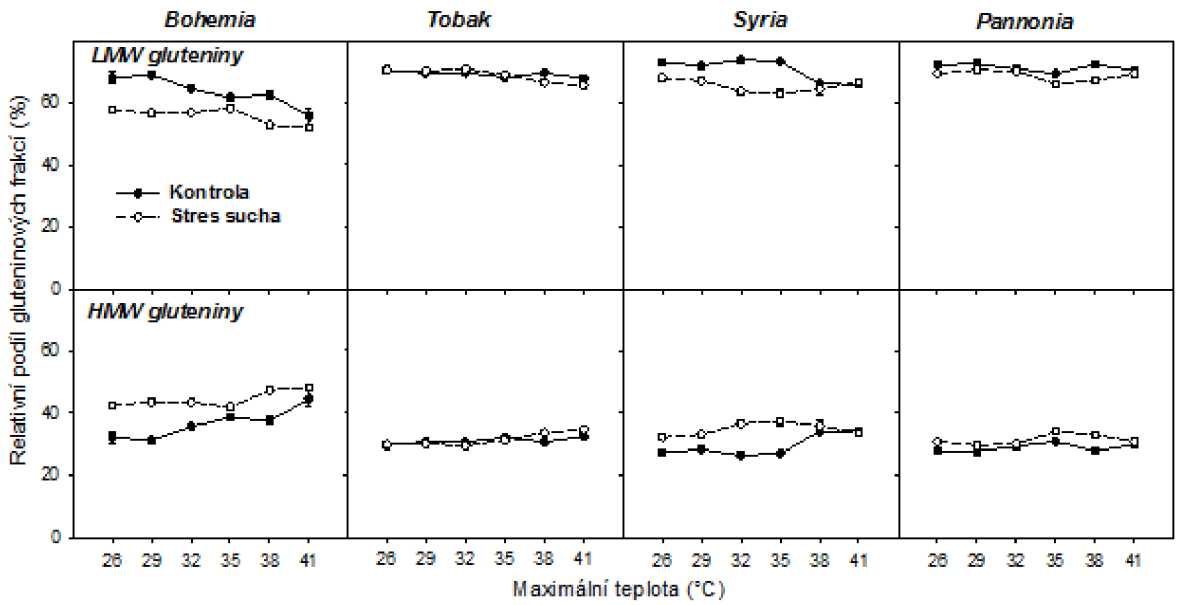


Obr. 24: Graf znázorňující relativní podíl gliadinových frakcí (v %) z celkového obsahu gliadinů u čtyř odrůd pšenice ozimé v závislosti na teplotě a stresu sucha v době kvetení.

Na obrázku 24 jsou uvedeny grafy představující relativní podíly gliadinových frakcí z celkového obsahu gliadinů u čtyř odrůd pšenice ozimé při zkoumaných stresových podmínkách. Je pozorována podobnost mezi odrůdami Bohemia a Tobak jak v relativních podílech gliadinových frakcí, tak v charakteru odezvy na teplotu a sucho u většiny gliadinových frakcí. Relativní podíl gliadinových frakcí je u těchto odrůd nejvíce ovlivněn působením vysoké teploty 41 °C. Konkrétně při se při této teplotě zvyšuje podíl α-gliadinů na úkor γ-gliadinů, což je lépe viditelné u odrůdy Tobak. Nedostatkem vláhy jsou u těchto odrůd nejvíce ovlivněny ω1,2-gliadiny, jejichž podíl se při suchu zvyšuje a podíl ostatních skupin gliadinů je mírně nižší. U odrůdy Tobak se vlivem sucha snižuje relativní podíl γ-gliadinů.

Od předchozích dvou odrůd se odrůdy Syria a Pannonia liší zastoupením jednotlivých gliadinových skupin v zrnu. Oproti odrůdám Bohemia a Tobak mají tyto odrůdy výrazně nižší podíl α-gliadinů, ale vyšší podíl γ-gliadinů. Mezi sebou se Syria a Pannonia liší hlavně zastoupením β-gliadinů, které je nejvyšší u odrůdy Syria, a obsahem ω5-gliadinů, na které je bohatá odrůda Pannonia a naopak nejméně ω5-gliadinů obsahuje odrůda Syria. U těchto odrůd rovněž platí, že největší změny v zastoupení gliadinových frakcí nastupují při nejvyšších teplotách 38 a hlavně 41 °C. U odrůdy Syria se při těchto teplotách zvyšuje podíl α- a β-gliadinů na úkor γ-gliadinů. U varianty bez dostatku vody jsou tyto změny při vysokých teplotách méně výrazné. Stejně jako u odrůdy Tobak se vlivem sucha snížil podíl γ-gliadinů u odrůdy Syria. Jedinečnou závislost při působení stresu sucha vykazují α-gliadiny u odrůdy Syria, jejichž zastoupení se zvyšuje působením teploty s maximem při 32 °C. V odpovědi na to dochází k opačným změnám v zastoupení γ-, β- a ω1,2-gliadinů. U odrůdy Pannonia se při nejvyšších teplotách rovněž snižuje podíl γ-gliadinů, ale roste zastoupení ω5-gliadinů. U této odrůdy mělo největší vliv na gliadinové zastoupení působení teploty 38 °C při vodním deficitu, kdy došlo ke snížení γ-gliadinové frakce, ale navýšení obou ω-gliadinových frakcí. Kromě uvedených případů nemělo sucho ani teplota významný vliv na zastoupení gliadinů u odrůdy Pannonia.

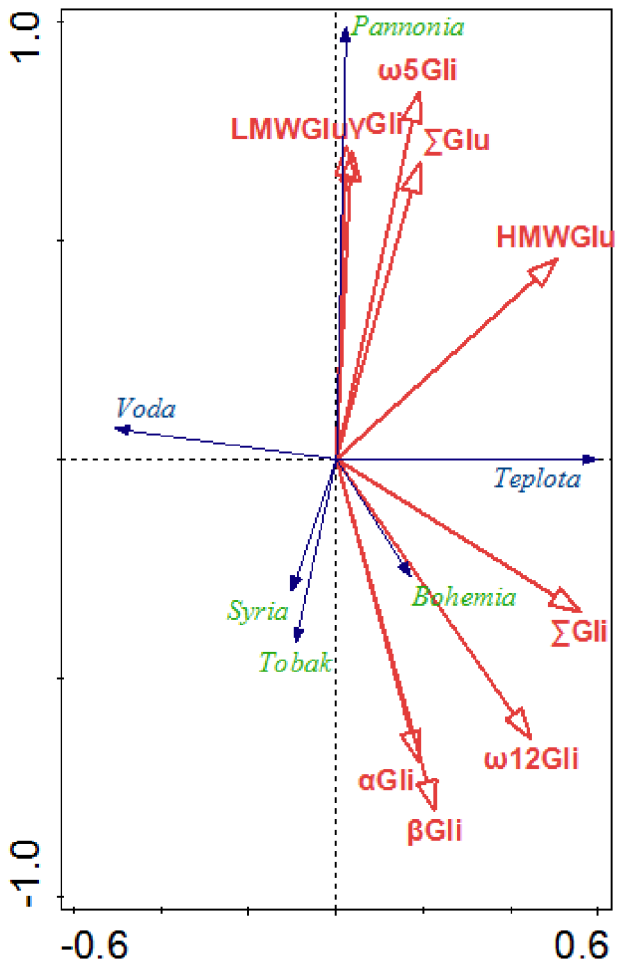
Mezi odrůdami jsou patrné značné rozdíly v zastoupení jednotlivých skupin gliadinů v zrnu. Podobné si jsou pouze odrůdy Bohemia a Tobak. Ty obsahují nejvyšší množství α-gliadinů, až 30 %. β-gliadiny tvoří u těchto odrůd téměř 25 % ze všech gliadinů. Bohemia a Tobak se mezi zkoumanými odrůdami vyznačují nejnižším zastoupením γ -gliadinů, které tvoří asi 18 % ze všech gliadinů. Nejméně zastoupeny jsou u těchto odrůd ω1,2 - (12 %) a ω5-gliadiny (15 %). Odrůdy Syria a Pannonia si jsou podobné v obsahu α- a ω1,2-gliadinů, obě tyto frakce představují 8 až 10 % ze všech gliadinů. Tyto dvě odrůdy mají nejvyšší zastoupení γ-gliadinů, které při kontrolních podmínkách tvoří okolo 35 % všech gliadinů. Odrůda Syria má největší množství β-gliadinů (až 40 %), ale naopak velmi nízký obsah ω5-gliadinů (cca 5 %). Odrůda Pannonia obsahuje z porovnávaných odrůd nejnižší množství β-gliadinů, a to 15 %. Naopak ω5-gliadiny jsou u této odrůdy nejvíce zastoupeny, představují cca 32 % celkových gliadinů.



Obr. 25: Graf znázorňující relativní podíl gluteninových frakcí (v %) z celkového obsahu gluteninů u čtyř odrůd pšenice ozimé v závislosti na teplotě a stresu sucha v době kvetení.

Na obrázku 25 lze sledovat změny v podílech LMW a HMW gluteninů z celkového obsahu gluteninů v závislosti na sledovaných stresových faktorech u všech čtyř odrůd. Z grafů je patrná podobnost odrůd Tobak a Pannonia v odpovědi gluteninů na vysoké teploty i stres sucha. U obou odrůd při kontrolním vodním režimu dochází k mírnému nárůstu podílu HMW gluteninů a tedy poklesu zastoupení LMW gluteninů při nejvyšší teplotě 41 °C. U odrůdy Tobak při vodním deficitu se tato závislost projevuje už od 35 °C. U odrůdy Pannonia při těchto podmínkách sice dochází ke stejnému jevu při 35 °C, ale při vyšších teplotách se podíly vrací na původní stav při kontrolním teplotním režimu. Vliv teploty a sucha na zastoupení gluteninových frakcí u těchto odrůd je v porovnání s odrůdami Bohemia a Syria velmi nízký. U odrůdy Bohemia lze vidět nejvýraznější dopad teploty a sucha na zastoupení gluteninových frakcí. K nárůstu podílu HMW gluteninů na úkor LMW gluteninů dochází již při 32 °C a se zvyšující se teplotou stále roste. Stejně tak vlivem sucha stoupá zastoupení HMW gluteninů a při působení teplot nad 38 °C se ještě zvyšuje. U odrůdy Syria je vliv teploty u kontrolního vodního režimu pozorován až od 38 °C. Opět dochází k navýšení podílu HMW gluteninů a poklesu LMW gluteninů. K tomuto jevu dochází rovněž vlivem sucha s maximem HWM gluteninů při teplotách 32 až 35 °C.

Při kontrolních podmínkách se zastoupení gluteninových frakcí mezi odrůdami neliší. LMW gluteniny tvoří téměř 70 % celkových gluteninů a HMW gluteniny zbylých 30 %.



Obr. 26: Biplot graf RDA analýzy vlivu genotypu ozimé pšenice, teploty a dostupnosti vody na obsah jednotlivých frakcí gliadinů a gluteninů.

Pomocí redundanční analýzy (RDA), což je forma vícerozměrné analýzy hlavních komponent PCA (principal component analysis) byl získán graf na obrázku 26, který ukazuje vliv sledovaných faktorů (modré šipky) na jednotlivé frakce gliadinových a gluteninových proteinů (červené šipky). Stejný či podobný směr červených a modrých šipek znamená pozitivní vliv daného faktoru na dané proteiny. Opačný směr šipek označuje negativní vliv.

Z grafu je zřejmý hlavní vliv genotypu na lepkové bílkoviny. Přitom u odrůdy Pannonia se zvyšují především γ- a ω5-gliadinové frakce a rovněž obě frakce gluteninů a tedy i celkové gluteniny. Naopak ostatní frakce gliadinů se u odrůdy Pannonia snižují. U odrůd Bohemia, Syria a Tobak se zvyšuje zejména obsah α-, β- a ω1,2-gliadinů. Vliv zásobení vodou a teploty má opačný vliv na obsah gliadinů a gluteninů, což znamená, že při stresu suchem a zvýšené teplotě se jejich obsah obecně zvyšuje. Vliv těchto faktorů je ale menší než vliv genotypu. Nejvíce jsou těmito faktory ovlivněny ω1,2-gliadiny, gliadiny celkem a HMW gluteniny. Z výsledků je rovněž zřejmé, že pokud se zvyšuje obsah γ- a ω5-gliadinových frakcí a obou frakcí gluteninů, tak se snižuje obsah α-, β- a ω1,2-gliadinů.

5 DISKUSE

V této diplomové práci byl sledován vliv genotypu, teploty a nedostatku vody na obsah gliadinů a gluteninů u čtyř odrůd ozimé pšenice: Bohemia, Tobak, Syria a Pannonia.

Vliv genotypu na gliadinové a gluteninové frakce se ukázal jako nejvýznamnější. Mezi jednotlivými odrůdami byly zaznamenány rozdíly už u rozdělených lepkových bílkovin na gelech. Nejvíce gliadinových i gluteninových frakcí bylo zjištěno u odrůdy Syria, zatímco odrůdy Tobak a Pannonia měly nejméně gliadinových frakcí. Rovněž zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí se mezi odrůdami významně lišilo. Nejvyšším podílem α-gliadinů (30 %) vynikaly odrůdy Bohemia a Tobak. Naopak odrůdy Syria a Pannonia obsahovaly nejvíce γ-gliadinů (okolo 35 %). U odrůdy Syria byl zjištěn vysoký podíl β-gliadinů (40 %), ale velmi nízký obsah ω5-gliadinů (5 %) oproti ostatním odrůdám. Vysokým podílem ω5 -gliadinů vynikala odrůda Pannonia (přes 30 %). Pouze zastoupení ω1,2-gliadinů (okolo 10 %) se mezi odrůdami významně nelišilo, stejně jako zastoupení LMW (70 %) a HMW gluteninů (30 %).

Ačkoli je jasné, že se složení lepkových bílkovin může mezi odrůdami lišit, některé naše výsledky jsou velmi odlišné od hodnot uváděných Wieserem [49]. Například námi zjištěný nízký podíl α-gliadinů u odrůd Syria a Pannonia je v nesouladu s 30% zastoupením α-gliadinů mezi celkovými lepkovými proteiny, jak uvádí Wieser. V téže práci Wieser udává, že podíl γ-gliadinů by měl být rovněž 30 % z celkového obsahu lepkových proteinů, s čímž se neshodují naše výsledky u odrůd Bohemia a Tobak. Naopak námi zjištěný příliš vysoký podíl ω5-gliadinů u odrůdy Pannonia neodpovídá 3–6 % z celkových lepkových proteinů uváděným v [49]. Zjištěný významný vliv genotypu na gliadinové a gluteninové složení potvrzují rovněž Li a kol. [79] či Barutcular a kol. [105].

U jednotlivých odrůd byl pozorován různý charakter odpovědi na teplotu a sucho. Nejvýznamnější změny v odpovědi na teplotu byly pozorovány u odrůdy Tobak. Při nejvyšších teplotách docházelo u této odrůdy k významnému poklesu obou frakcí gluteninů. Naopak se zvyšující se teplotou docházelo k nárůstu zejména α-gliadinů, které u této odrůdy tvoří nejvyšší podíl, a proto vlivem vysoké teploty u odrůdy Tobak dochází ke zvýšení celkových gliadinů. Odrůdy Tobak a Bohemia vykazovaly podobné teplotní závislosti u všech gliadinových frakcí s maximy při teplotách 32 až 35 °C. U odrůdy Tobak byly tyto závislosti vždy více výrazné. U odrůdy Bohemia nebyl zaznamenán významný vliv teploty na gluteninové frakce, pouze při nejvyšší teplotě 41 °C byl vypozorován nárůst obsahu HMW gluteninů. Velmi odlišně než u předchozích odrůd působila zvýšená teplota na α-, β- a γ-gliadinové frakce u odrůdy Syria. Při teplotách 32 a 35 °C byly obsahy těchto gliadinových frakcí nejnižší. U odrůdy Syria docházelo při nejvyšších teplotách k nárůstu obsahu HMW gluteninů. U této odrůdy nebyl zjištěn výrazný vliv teploty na ω-gliadiny a LMW gluteniny. U odrůdy Pannonia nebyla vypozorována významná teplotní závislost u α-, β- a γ-gliadinů, ani u žádné gluteninové frakce, ale u ω-gliadinů byl pozorován nárůst obsahu s teplotou, významný zejména u ω5-gliadinů.

Zjednodušeně lze tedy pro odrůdy Bohemia a Tobak tvrdit, že obsah gliadinů vlivem teploty roste, ale při příliš vysokých teplotách obsah gliadinů klesá. Naopak u odrůdy Syria nejvyšší teploty způsobují nárůst gliadinového obsahu a mírně stoupá i obsah gluteninů. U odrůdy Pannonia nebyl zjištěn významný vliv teploty na obsah gliadinů, ani gluteninů. Stejně tak nebyl zjištěn výrazný vliv teploty na gluteniny u odrůdy Bohemia. Nejvýznamnější vliv teploty na gluteninové frakce byl zjištěn u odrůdy Tobak, kdy vlivem vysokých teplot

docházelo k poklesu obsahu obou frakcí gluteninů. Zejména výsledky u odrůdy Tobak se shodují s literaturou [69, 70], která uvádí zvýšení gliadinové frakce, ale snížení gluteninové frakce vlivem vysokých teplot. Obsah gliadinů se zvyšuje i u odrůd Bohemia a Syria, ale ohledně gluteninů jsou naše výsledky u těchto odrůd jiné, než uvádějí Gupta a kol. [69] nebo Wardlaw a kol. [72].

Vliv sucha se projevil obzvlášť významně u odrůdy Syria. U této odrůdy se totiž při nedostatku vláhy velmi výrazně zvyšoval obsah všech gliadinových i gluteninových frakcí, který stoupal navíc i účinkem vysokých teplot. U ostatních odrůd byl vliv sucha zaznamenán pouze u některých frakcí a v menším měřítku. U odrůdy Bohemia dochází k nejvýznamnějším změnám vlivem sucha u ω1,2-gliadinů a HMW gluteninů, kdy jejich obsah při nedostatku vody rovněž stoupá. U odrůdy Tobak způsobuje stres sucha pokles obsahu γ-gliadinů, ale nárůst obsahu ω1,2-gliadinů. U odrůdy Pannonia je samotný vliv sucha nejméně prokazatelný.

U ostatních případů samotné sucho nemá na lepkové proteiny vliv nebo působí až ve spojení s teplotním stresem. Zejména u odrůdy Bohemia záleží při stresu sucha na teplotních podmínkách. Při kontrolních či průměrných teplotách 26 až 29 °C totiž stres sucha způsobuje zvýšení obsahu α-, β-, γ- a ω5-gliadinů, ale při vyšších teplotách 35 a 38 °C se obsahy těchto frakcí snižují, což má stejný vliv na celkové gliadiny. Na LMW gluteniny působí sucho u této odrůdy zvýšením obsahu až při spojených stresových podmínkách sucha a vysokých teplot nad 35 °C. Rovněž u odrůdy Tobak působí sucho na některé frakce až při působení s teplotním stresem, konkrétně se při těchto podmínkách zvyšuje obsah obou gluteninových frakcí, ω5-gliadinů a celkových gliadinů i gluteninů. Podobně i u odrůdy Pannonia způsobuje sucho změny až spolu s působením vysokých teplot, dochází ale k poklesu α-, γ-, ω5-gliadinů a celkových gliadinů, a k nárůstu ω1,2-gliadinů. U této odrůdy rovněž stoupá obsah obou gluteninových frakcí při spojených stresových faktorech, ale nejvýrazněji pouze při 38 °C. Obzvlášť zajímavý je u všech odrůd častý skokový nárůst některých gliadinových frakcí při kombinaci nejvyšší teploty 41 °C a nedostatku vody. To může být vysvětleno na základě výsledků, ke kterým došli Hlaváčová a kol. [106] při svém experimentu za použití stejného materiálu jako v naší práci, když sledovali vliv sucha a teploty na počet zrn v klase a na hmotnost tisíce zrn. Při nejvyšší teplotě 41 °C při nedostatku vláhy zjistili snížení počtu zrn v klase, což je kompenzováno zvýšením hmotnosti tisíce zrn a tedy zvýšením obsahu většiny gliadinů. Naopak HMW i LMW gluteniny při těchto podmínkách snižují svůj obsah.

Obecně lze tedy říci, že působením samotného sucha se obsah gliadinů zvyšuje zejména u odrůdy Syria. U ostatních odrůd má sucho významný vliv až ve spojení s teplotním stresem. Při současném působení sucha a teplot nad 35 °C však dochází k poklesu obsahu gliadinů. Tyto výsledky jsou v rozporu s literaturou, která většinou uvádí nárůst koncentrací gliadinů působením sucha [45, 73]. S těmito závěry souhlasí naše výsledky pouze u odrůdy Syria. U všech odrůd dochází vlivem sucha k nárůstu jenom ω1,2-gliadinové frakce. Na obsah gluteninů mají stresové podmínky stejný účinek u všech odrůd. Vlivem sucha a vysokých teplot dochází ke zvýšení obsahů obou frakcí gluteninů, zejména HMW gluteninové frakce. K podobným výsledkům ohledně gluteninových frakcí došli rovněž Flagella a kol. [74], kteří ve své práci zaznamenali nárůst HMW gluteninů vlivem sucha, ale u LMW gluteninů nezaznamenali rozdíl mezi nedostatkem a deficitem vody.

Porovnáním zastoupení jednotlivých frakcí mezi celkovými gliadiny či gluteniny bylo zjištěno, že u všech odrůd nebyl vlivem sucha výrazně ovlivněn podíl β - a ω5-gliadinů.

U odrůd Bohemia, Tobak a Pannonia byl rovněž patrný malý vliv sucha na podíl α-gliadinů v zrnu. U ω1,2-gliadinů se vlivem spojených stresových faktorů zvyšoval jejich podíl u všech odrůd, nejvýznamněji u odrůdy Bohemia. Vlivem vysokých teplot docházelo k mírnému zvýšení podílů α-, β-, ω5-gliadinů a HMW gluteninů, naopak podíly γ-gliadinů a LMW gluteninů při vysokých teplotách klesaly. Obzvlášť významně bylo u všech odrůd působením teploty ovlivněno zastoupení γ-gliadinů. Stejně tak byla tato frakce nejvíce citlivá na stres sucha. Tyto výsledky se shodují s prací Daniela a Triboi [70], kteří došli k závěru, že podíl α-, β- a ω-gliadinů vlivem teploty stoupá, ale obsah γ-gliadinové frakce při vysoké teplotě klesá. Odpovědí lepkových frakcí na stres sucha se zabývali Yang a kol. [67], kteří zjistili pokles α- a γ-gliadinů při nedostatku vody. Pozorovali rovněž vliv vysokých teplot a zaznamenali nárůst α-, γ-gliadinů a LMW gluteninů, ale pokles α/β- a ω-gliadinů. S těmito výsledky se ty naše shodují už méně.

Působením zkoumaných faktorů byly zjištěny změny v poměru gliadinů ke gluteninům. K největším změnám v poměru gliadiny/gluteniny docházelo u odrůdy Bohemia. U této odrůdy se totiž vlivem vysokých teplot zvyšoval poměr gliadiny/gluteniny, naopak při působení sucha se s vysokými teplotami tento poměr snižoval. Podobně při současném působení vysokých teplot a sucha docházelo u odrůd Tobak a Pannonia k poklesu poměru gliadinů ke gluteninům. Působením samotné teploty se poměr gliadiny/gluteniny u odrůdy Tobak zvyšoval. V naší práci se u odrůdy Tobak sice snížil poměr gliadinů ke gluteninům při současném působení sucha a příliš vysokých teplot, ale při samotném teplotním stresu se poměr zvyšoval, u odrůdy Pannonia vliv teploty na poměr gliadinů ke gluteninům nebyl zaznamenán. Námi zjištěný vliv teploty na poměr gliadinů ke gluteninům u odrůd Bohemia a Tobak se shoduje se zdroji [71] a [107]. Pokles poměru gliadinů ke gluteninům vlivem sucha zjistili rovněž Jia a kol. [108] či Dai a kol. [109]. U odrůdy Syria nebyl vůbec pozorován vliv teploty ani sucha na poměr gliadinů ke gluteninům, což může být považováno za pozitivní vlastnost tohoto genotypu, jelikož jsou i při stresových podmínkách sucha a vysokých teplot zachovány důležité reologické vlastnosti těsta. Právě zvýšení poměru gliadinů ke gluteninům a snížení HMW gluteninů je v literatuře uváděno jako důvod zhoršení kvality těsta [40].

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv teploty a sucha na gliadinové a gluteninové frakce čtyř genotypů pšenice ozimé.

Pro experiment byly vybrány odrůdy Bohemia, Tobak, Syria a Pannonia, které byly kultivovány ve speciálních nádobách s půdou pocházející z experimentální stanice AV ČR v Polkovicích. Vzorky byly zasety v říjnu 2014 a až do fáze naduřování horní listové pochvy byly vystaveny okolním meteorologickým podmínkám. V květnu 2015 byly umístěny do kultivačních komor, uvnitř kterých byly simulovány podmínky teplotního stresu a nedostatku vláhy nebo kontrolní podmínky. Rostliny byly stresovému režimu vystaveny po dobu 14 dnů během fáze kvetení a poté byly až do dosažení plné zralosti vystaveny aktuálnímu počasí.

Gliadinové proteiny byly v praktické části této práce separovány metodou A-PAGE a rozdělení gluteninových proteinů bylo provedeno metodou SDS-PAGE. Obsah jednotlivých bílkovinných frakcí byl stanoven počítačovou denzitometrií a výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Nejvýznamněji na jednotlivé gliadinové a gluteninové frakce působil vliv genotypu. U genotypu Pannonia byl zjištěn vysoký obsah γ- a ω5-gliadinů a obou gluteninových frakcí a nízký obsah ostatních gliadinů. Naopak u odrůd Bohemia, Tobak a Syria byl stanoven nižší obsah γ-, ω5-gliadinů a gluteninových frakcí, ale obsah α-, β- a ω1,2-gliadinů byl vyšší.

U jednotlivých odrůd byl také pozorován různorodý vliv stresových podmínek na lepkové bílkoviny. Nejvíce byla teplotou a suchem ovlivněna odrůda Bohemia, která vykazovala největší pokles poměru gliadinů ke gluteninům vlivem působení obou stresových faktorů, což znamená, že u této odrůdy při nevýhodných růstových podmínkách významně narůstá obsah gluteninů na úkor gliadinů. Takové výkyvy u lepkových bílkovin nejsou vhodné pro technologické vlastnosti pšenice, z čehož lze usuzovat, že tato odrůda bude nejméně vhodná pro použití při nadcházejících klimatických změnách. Naopak odrůda Syria by mohla poskytovat velmi perspektivní použití v budoucnu, jelikož u ní vlivem sucha a vysokých teplot narůstá obsah všech lepkových frakcí, ale nedochází ke změnám v poměru gliadinů ke gluteninům, čímž jsou zachovány vhodné technologické vlastnosti mouky. U odrůd Tobak a Pannonia docházelo ke změnám lepkových bílkovin většinou až při nejvyšších teplotách, přičemž tyto změny byly pak podobně nevýhodné jako u odrůdy Bohemia, zdaleka ale ne tak významně.

Za významný faktor ovlivňující kvalitu lepkových bílkovin lze považovat vliv teploty, který zvyšoval množství všech frakcí gliadinů a gluteninů, zejména HMW gluteninů, ω1,2-gliadinů a celkových gliadinů.

Významný byl rovněž vliv sucha, při kterém byly lepkové bílkoviny ovlivněny podobně jako při působení teploty. Docházelo tedy rovněž k nárůstu obsahu všech frakcí, hlavně HMW gluteninů, ω1,2-gliadinů a celkových gliadinů. Při současném působení stresu sucha i tepla byly při vysokých teplotách zaznamenány poklesy obsahů některých gliadinových frakcí.

Pokud by teplotní podmínky ve fázi kvetení nepřesáhly 38 °C, následky na výnos a změny lepkových bílkovin by nemusely být tak závažné jako při teplotě 41 °C, kdy dochází k poklesu počtu zrn v klase, což se rostliny snaží vykompenzovat nadměrnou produkcí zásobních proteinů gliadinů, ale obsah gluteninů klesá. Roste tedy poměr gliadinů ke gluteninům, čímž mohou být ovlivněny vlastnosti pšenice pro pekařské použití.

7 POUŽITÁ LITERATURA

[1] KRÄUCHI, N., E. POST, P. CONVEY, et al. Potential impacts of a climate change on forest ecosystems: Observations, Modeling, and Impacts. *Forest Pathology* [online]. 1993, **23**(1), 28-50 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x. ISBN 10.1126/science.289.5487.2068. ISSN 1437-4781. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x

[2] STOCKER, Thomas, ed. *Climate change 2013: the physical science basis : Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. New York, N.Y.: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-1-107-66182-0.

[3] WALTHER, G. R., E. POST, P. CONVEY, et al. Ecological responses to recent climate change: Observations, Modeling, and Impacts. *Nature* [online]. 2002, **416**(6879), 389-395 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1038/416389a. ISSN 0028-0836. Dostupné z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/416389a

[4] EASTERLING, D. R., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science* [online]. 1988, **240**(4850), 293-299 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1126/science.289.5487.2068. ISSN 0036-8075. Dostupné z: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5487.2068

[5] *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet* [online]. California: NASA, 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: https://climate.nasa.gov/

[6] MAREK, M. V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.

[7] RAMANATHAN, V., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. The Greenhouse Theory of Climate Change: A Test by an Inadvertent Global Experiment. *Science* [online]. 1988, **240**(4850), 293-299 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1126/science.240.4850.293. ISSN 0036-8075. Dostupné z: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.240.4850.293

[8] KEELING, C. D., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. Evolution of natural and anthropogenic fluxes of atmospheric CO 2 from 1957 to 2003. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* [online]. 2017, **63**(1), 1-22 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1111/j.1600-0889.2010.00507.x. ISSN 1600-0889. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1111/j.1600-0889.2010.00507.x

[9] CANADELL, J. G., C. LE QUERE, M. R. RAUPACH, et al. Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(47), 18866-18870 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1073/pnas.0702737104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702737104

[10] NÁTR, L. *Koncentrace CO_2 a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-85866-62-5.

[11] STONE, P. H., L. WANG a P. A. JACINTHE. Forecast cloudy: The limits of global warming models. *AIP Conference Proceedings* [online]. AIP, 1992, **179**, 143-149 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1063/1.43901. ISSN 0094243x. Dostupné z: http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.43901

[12] WAHID, A., S. GELANI, M. ASHRAF a M. R. FOOLAD. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2007, **61**(3), 199-223 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011. ISSN 0098-8472. Dostupné z: http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

[13] BAÑON, S., J.A. FERNANDEZ, J.A. FRANCO, A. TORRECILLAS, J.J. ALARCÓN a M.J. SÁNCHEZ-BLANCO. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of Lotus creticus plants. *Scientia Horticulturae* [online]. Elsevier B.V, 2004, **101**(3), 333-342 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.scienta.2003.11.007. ISSN 0304-4238. Dostupné z: http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.scienta.2003.11.007

[14] SALVUCCI, M. E. a S. J. CRAFTS-BRANDNER. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia plantarum* [online]. 2004, **120**, 179-186 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x. ISSN 1399-3054. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x/full

[15] LEEGOOD, R. C., SHARKEY, T. D., VON CAEMMERER, S. Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. ISBN 07-923-6143-1.

[16] REDDY, A. R., K. V. CHAITANYA a M. VIVEKANANDAN. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal *of Plant Physiology* [online]. 2004, **161**(11), 1189-1202 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.01.013. ISSN 0176-1617. Dostupné z: http://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jplph.2004.01.013

[17] DAT, J. F., C. H. FOYER a I. M. SCOTT. Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings. *Plant Physiology* [online]. 1998, **118**, 1455-1461 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC34763/

[18] *FAOSTAT* [online]. ©2017 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: http://www.fao.org/home/en

[19] PŘÍHODA, J., M. HRUŠKOVÁ a P. SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. 202 s. ISBN 80-708-0530-7.

[20] *ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA* [online]. ©1996 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: https://www.britannica.com/

[21] 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.

[22] The chemistry and biochemistry of wheat. CAUVAIN, S. *Breadmaking: Improving Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, ©2003, s. 31-70. ISBN 978-1-85573-553-8.

[23] 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. 2017-03-27]. 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

[24] DVOŘÁČEK, Václav. *Využití metody retenční kapacity mouky pro predikci technologické kvality pšenice v České republice: metodika pro praxi.* Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012. ISBN 9788074270970.

[25] NOVOTNÝ, F. a K. HRUBÍK. Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice. *Obilnářské listy*. 1997, **5**(3), 49-52.

[26] ČSN 46 1100-2. *Obiloviny potravinářské – Část 2: Pšenice potravinářská.* Praha: Český normalizační institut, 2001. 8 s.

[27] JIRSA, O., I. POLIŠENSKÁ a S. PALÍK. Kvalita potravinářských obilovin 2011. *Obilnářské listy*. 2011, **19**(3-4), 53-58. Dostupné také z: http://www.vukrom.cz/obilnarske-listy/obsah-vydanych-cisel-1/3-2011/kvalita-potravinarskych-obilovin-2011

[28] Kvalita pšenice a jak ji zjistíme? In: *Selgen* [online]. Praha: Selgen a.s., ©2017 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://selgen.cz/sprava/wp-content/uploads/2012/02/Kvalita-pšenice-a-jak-ji-zjistíme.doc.pdf

[29] KREJČÍŘOVÁ, L., I. CAPOUCHOVÁ a J. PETR. Skladba bílkovin a technologická jakost ozimé pšenice z ekologického a konvenčního způsobu pěstování. In: *Sborník z konference: Ekologické zemědělství 2007*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2007, s. 76-78. ISBN 978-80-213-1611-9.

[30] ČSN EN ISO 5529. *Pšenice – Stanovení sedimentačního indexu – Zelenyho test.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011. 16 s.

[31] ČSN EN ISO 3093. *Pšenice, žito a pšeničná a žitná mouka, pšenice tvrdá (durum) a semolina z pšenice tvrdé - Stanovení čísla poklesu podle Hagberga-Pertena.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011. 20 s.

[32] ČSN EN ISO 7971-3. *Obiloviny - Stanovení objemové hmotnosti zvané "hektolitrová váha" - Část 3: Rutinní metoda.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. 28 s.

[33] ČSN EN ISO 5530-1. *Pšeničná mouka – Fyzikální vlastnosti těsta – Část 1: Stanovení absorpce vody a reologických vlastností pomocí farinografu.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015. 40 s.

[34] ČSN 46 1100-1. *Obiloviny potravinářské – Část 1: Společná ustanovení.* Praha: Český normalizační institut, 2001.

[35] KOVAŘÍKOVÁ, D. a V. NETOLICKÁ. *Vzdělávací materiál pro předmět technologická příprava* [online]. 2011 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://www.spspas.cz/esf-technologicka-priprava

[36] 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.

[37] DUPONT, F. M., R. CHAN, R. LOPEZ a W. H. VENSEL. Sequential Extraction and Quantitative Recovery of Gliadins, Glutenins, and Other Proteins from Small Samples of Wheat Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(5), 1575-1584 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1021/jf048697l. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048697l

[38] BÉNÉTRIX, F., J. C. AUTRAN. Protein synthesis in grains and seeds. MOROT-GAUDRY, J. F. *Nitrogen assimilation by plants: Physiological, biochemical and molecular aspects*. Enfield, N.H.: Science Publishers, 2001, s. 343-360. ISBN 9781578081394.

[39] DUPONT, F. M. a S. B. ALTENBACH. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* [online]. 2003, **38**(2), 133-146 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/S0733-5210(03)00030-4. ISSN 07335210. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003000304

[40] BALLA, K., M. RAKSZEGI, Z. LI, F. BEKES, S. BENCZE a O. VEISZ. Quality of winter wheat in relation to heat and drought shock after anthesis. *Czech Journal of Food Sciences - UZEI* [online]. 2011, **29**(2), 117-128 [cit. 2017-03-20]. ISSN 12121800. Dostupné z: http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/37208.pdf

[41] OSBORNE, T. B. *Vegetable proteins*. London: Longsmas Green, 1924.

[42] WIESER, H., R. MANDERSCHEID, M. ERBS a H. J. WEIGEL. Effects of Elevated Atmospheric CO_2 Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, **56**(15), 6531-6535 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603

[43] TRIBOI, E., P. MARTRE a A. M. TRIBOÏ-BLONDEL. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2003, **54**(388), 1731-1742 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1093/jxb/erg183. ISSN 1460-2431. Dostupné z: https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erg183

[44] FRA-MON, P., G. SALCEDO a C. ARAGONCILLO. Chromosomal assignment of genes controlling salt-soluble proteins (albumins and globulins) in wheat and related species. *Theoretical and Applied Genetics*. 1984, **69**(2), 167-172. DOI: 10.1007/BF00272890.

[45] GARCÍA DEL MORAL, L. F., Y. RHARRABTI, V. MARTOS a C. ROYO. Environmentally Induced Changes in Amino Acid Composition in the Grain of Durum Wheat Grown under Different Water and Temperature Regimes in a Mediterranean Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, **55**(20), 8144-8151 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1021/jf063094q. ISSN 00218561. Dostupné z: http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf063094q

[46] SINGH, J., M. BLUNDELL, G. TANNER aj. H. SKERRITT. Albumin and Globulin Proteins of Wheat Flour: Immunological and N-terminal Sequence Characterisation. *Journal of Cereal Science* [online]. 2001, **34**(1), 85-103 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1006/jcrs.2001.0380. ISSN 07335210. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521001903807

[47] BATTAIS, F., C. RICHARD, S. JACQUENET, S. DENERY-PAPINI, D. A. MONERET-VAUTRIN. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2008, **40**(3), 67-76. Dostupné také z: http://www.eurannallergyimm.com/cont/journals-articles/122/volume-wheat-grain-allergies-update-allergens-321allasp1.pdf

[48] SHEWRY, P. R., J. A. NAPIER a A. S. TATHAM. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists, 1995, **7**(7), 945-956. DOI: 10.2307/3870049. ISSN 10404651.

[49] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [online]. 2007, **24**(2), 115-119 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. ISSN 0740-0020. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535

[50] SONG, Y. a Q. ZHENG. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in Food Science* [online]. 2007, **18**(3), 132-138 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.11.003. ISSN 09242244. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224406003451

[51] SHEWRY, P. R. a N. G. HALFORD. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2002, **53**(370), 947-958 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1093/jexbot/53.370.947. ISSN 00220957. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947

[52] COSTA, M. S., M. B. S. SCHOLZ a C. M. L. FRANCO. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. 2013, **33**(3), 163-170 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1590/S0101-20612013000500024. ISSN 1678-457x. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

[53] WIESER, H. a R. KIEFFER. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science* [online]. 2001, **34**(1), 19-27 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0385. ISSN 0733-5210. Dostupné z: https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0385

[54] TILLEY, K. A., R. E. BENJAMIN, K. E. BAGOROGOZA, B. M. OKOT-KOTBER, O. PRAKASH a H. KWEN. Tyrosine Cross-Links: Molecular Basis of Gluten Structure and Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(5): 2627-2632 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1021/jf010113h. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010113h

[55] PIBER, M. a P. KOEHLER. Identification of Dehydro-Ferulic Acid-Tyrosine in Rye and Wheat: Evidence for a Covalent Cross-Link between Arabinoxylans and Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(13), 5276-5284 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1021/jf050395b. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050395b

[56] SOLLID, L. M.. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology* [online]. Nature Publishing Group, 2002, **2**(9), 647-655 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1038/nri885. ISSN 1474-1733. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/224123432?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=17115

[57] WIESER, H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica.* 1996, **85**(412), 3-9. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14239.x. ISSN: 1651-2227.

[58] GROSCH, W. a H. WIESER. Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science* [online]. 1999, **29**(1): 1-16 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1006/jcrs.1998.0218. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521098902181

[59] WRIGLEY, C. W., F. BÉKÉS a W. BUSHUK. Gluten: A Balance of Gliadin and Glutenin. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality.* St. Paul, Minn.: AACC International, ©2006, s. 3-32. ISBN 978-1-891127-51-9.

[60] WAGA, J. a A. SKOCZOWSKI. Development and characteristics of ω-gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica* [online]. Dordrecht: Springer Science, 2014, **195**(1), 105-116 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1007/s10681-013-0984-1. ISSN 0014-2336. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10681-013-0984-1

[61] NADEEM, M., F. M. ANJUM, M. R. KHAN, M. SAJJAD, S. HUSSAIN a M. S. ARSHAD. Electrophoretic Characteristics of Gluten Proteins as Influenced by Crop Year and Variety. *International Journal of Food Properties* [online]. 2016, **19**, 897-910 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1080/10942912.2015.1045518. ISSN 1094-2912.

[62] SHEWRY, P.R. a A.S. TATHAM. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* [online]. Elsevier, 1997, **25**(3), 207-227 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0100. ISSN 0733-5210. Dostupné z: https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0100

[63] WIESER, H. a G. ZIMMERMANN. Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality. *European Food Research and Technology* [online]. 2000, **210**(5), 324-330 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/s002170050558. ISSN 1438-2377. Dostupné z: https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s002170050558

[64] GIANIBELLI, M. C., O. R. LARROQUE, F. MACRITCHIE a C. W. WRIGLEY. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry*. 2001, **78**(6), 635-646. DOI: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635. Dostupné také z: http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635

[65] DARYANTO, S., L. WANG a P. A. 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. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.agwat.2016.04.022. ISSN 03783774. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378377416301470

[66] FAN, X. M., D. JIANG, T. B. DAI, Q. JING a W. X. CAO. Effects of post-anthesis and waterlogging on the quality of grain formation in different wheat varieties. *Chinese Journal of Plant Ecology* [online]. 2004, **28**(5), 680-685 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.17521/cjpe.2004.0091. ISSN 1005-264x. Dostupné z: http://www.plant-ecology.com/EN/10.17521/cjpe.2004.0091

[67] YANG, F., A. D. JØRGENSEN, H. LI, et al. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (Triticum aestivum L. cv. Vinjett) grain. *Proteomics* [online]. 2011, **11**(9), 1684-1695 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1002/pmic.201000654. ISSN 16159853. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/pmic.201000654/full

[68] LABUSCHAGNE, M. T., O. ELAGO a E. KOEN. The influence of temperature extremes on some quality and starch characteristics in bread, biscuit and durum wheat. *Journal of Cereal Science* [online]. Elsevier, 2009, **49**(2), 184-189 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.jcs.2008.09.001. ISSN 07335210. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S073352100800163X

[69] GUPTA, R. B., I. L. BATEY a F. MACRITCHIE. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal chemistry*. 1992, **69**(2), 125-131. ISSN 00090352.

[70] DANIEL, C. a E. TRIBOÏ. 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. 2017-03-20]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. ISSN 07335210. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138

[71] BLUMENTHAL, C. S., I. L. BATEY, F. BEKES, C. W. WRIGLEY a E. W. R. BARLOW. Seasonal changes in wheat-grain quality associated with high temperatures during grain filling. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1991, **42**(1), 21-30. DOI: 10.1071/AR9910021. ISSN 0004-9409.

[72] WARDLAW, I. F., C. BLUMENTHAL, O. LARROQUE, C. W. WRIGLEY a E. W. R. BARLOW. Contrasting effects of chronic heat stress and heat shock on kernel weight and flour quality in wheat. *Functional Plant Biology*. 2002, **29**(1), 25-34. DOI: 10.1071/PP00147. ISSN 1445-4408.

[73] ZHANG, Y., X. HUANG, L. WANG, L. WEI, Z. WU, M. YOU a B. LI. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture* [online]. 2014, **13**(5), 919-925 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60601-2. ISSN 20953119. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913606012

[74] FLAGELLA, Z., M. M. GIULIANI, L. GIUZIO, C. VOLPI, S. MASCI, M. YOU a B. LI. Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *European Journal of Agronomy* [online]. 2010, **33**(3), 197-207 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.eja.2010.05.006. ISSN 11610301. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1161030110000596

[75] RANDALL, P. J., H. J. MOSS. Some effects of temperature regime during grain filling on wheat quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1990, **41**(4), 603-617. DOI: 10.1071/AR9900603. ISSN 0004-9409.

[76] WRIGLEY, C.W., C. BLUMENTHAL, P.W. GRAS, E.W.R. BARLOW. Temperature Variation During Grain Filling and Changes in Wheat-Grain Quality. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1994, **21**(6), 875-885. DOI: 10.1071/PP9940875. ISSN 0310-7841.

[77] BORGHI, B., M. CORBELLINI, M. CIAFFI, et al. Effect of heat shock during grain filling on grain quality of bread and durum wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1995, **46**(7), 1365-1380. DOI: 10.1071/AR9951365. ISSN 0004-9409.

[78] RHARRABTI, Y., D. VILLEGAS, C. ROYO, V. MARTOS-NÚÑEZ a L. F. GARCÍA DEL MORAL. Durum wheat quality in Mediterranean environments: II. Influence of climatic variables and relationships between quality parameters. *Field Crops Research* [online]. Elsevier B.V, 2003, **80**(2), 133-140 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/S0378-4290(02)00177-6. ISSN 03784290. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00177-6

[79] LI, Y. F., Y. WU, N. HERNANDEZ-ESPINOSA a R. J. PEÑA. Heat and drought stress on durum wheat: Responses of genotypes, yield, and quality parameters. *Journal of Cereal Science* [online]. Elsevier, 2013, **57**(3), 398-404 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.01.005. ISSN 07335210. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.01.005

[80] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

[81] LARRÉ, C., Y. NICOLAS, C. DESSERME, P. COURCOUX a Y. POPINEAU. Preparative Separation of High and Low Molecular Weight Subunits of Glutenin from Wheat. *Journal of Cereal Science* [online]. 1997, **25**(2), 143-150 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0079. ISSN 0733-5210. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz

[82] FU B.X. a SAPIRSTEIN H.D. Procedure for isolating monomeric proteins and polymeric glutenin of wheat flour. *Cereal chemistry* [online]. 1996, **73**(1), 143-152 [cit. 2017-03-31]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1996/Documents/73_143.pdf

[83] 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. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.09.008. ISSN 0733-5210. Dostupné z: http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jcs.2006.09.008

[84] BRADOVÁ, J. a E. MATĚJOVÁ. Comparison of the Results of SDS PAGE and Chip Electrophoresis of Wheat Storage Proteins. *Chromatographia* [online]. 2008, **67**(Supplement 1), 83-88 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1365/s10337-008-0545-2. ISSN 0009-5893. Dostupné z: https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1365/s10337-008-0545-2

[85] Gel Electrophoresis in Food Analysis. OTLES, Semih. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.

[86] SMITH, B. J. Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins*. New Jersey: Humana Press, 1984, 63-73. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:63. ISBN 0-89603-062-8. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1385/0-89603-062-8:63

[87] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular Info*® [online]. ©2001 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html

[88] ABDEL-AAL, E.-S. M., D. A. SALAMA, P. HUCL, F. W. SOSULSKI a W. CAO. Electrophoretic Characterization of Spring Spelt Wheat Gliadins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1996, **44**(8), 2117-2123 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/jf950752q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/pdf/10.1021/jf950752q

[89] RUMBO, M., F. G. CHIRDO, S. A. GIORGIERI, C. A. FOSSATI a M. C. AÑÓN. Preparative Fractionation of Gliadins by Electrophoresis at pH 3.1 (A-PAGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1999, **47**(8), 3243-3247 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/jf990001e. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/pdf/10.1021/jf990001e

[90] MOREL, M.H. Acid-polyacrylamide gel electrophoresis of wheat glutenins: a new tool for the separation of high and low molecular weight subunits. *Cereal chemistry* [online]. 1994, **71**(3), 238-242 [cit. 2017-03-31]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1994/Documents/71_238.pdf

[91] SKYLAS, D.J., J.A. MACKINTOSH, S.J. CORDWELL, et al. Proteome Approach to the Characterisation of Protein Composition in the Developing and Mature Wheat-grain Endosperm. *Journal of Cereal Science* [online]. Elsevier, 2000, **32**(2), 169-188 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0321. ISSN 0733-5210. Dostupné z: https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0321

[92] MAGDELDIN, S., ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basic*s. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.

[93] KAŠIČKA, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. [online]. Praha: Česká společnost chemická, 1997, **91**, 320-329 [cit. 2017-04-02]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf

[94] SCHOLZ, E., K. GANZLER, Sz. GERGELY a A. SALGO. Separation of the unique proteins of wheat protein fractions by capillary electrophoresis. *Chromatographia* [online]. Wiesbaden: Vieweg Verlag, 2000, **51**(1), 130-134 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1007/BF02492794. ISSN 0009-5893. Dostupné z: https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/BF02492794

[95] YAN, Y., Y. JIANG, M. SUN aj. YU. Rapid Identification of HMW Glutenin Subunits from Different Hexaploid Wheat Species by Acidic Capillary Electrophoresis. *Cereal Chemistry* [online]. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2004, **81**(5), 561-566 [cit. 2017-04-02]. ISSN 00090352. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/230002549/fulltext/7D883FD791BF4AF0PQ/1?accountid=17115

[96] YAN, Y., J. YU, Y. JIANG, Y. HU, M. CAI, S. L. K. HSAM a F. J. ZELLER. Capillary electrophoresis separation of high molecular weight glutenin subunits in bread wheat (Triticum aestivum L.) and related species with phosphate-based buffers. *Electrophoresis* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2003, **24**(9), 1429-1436 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1002/elps.200390184. ISSN 0173-0835. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/elps.200390184/epdf

[97] MARCHYLO, B. A., D. W. HATCHER, J. E. KRUGER a J. J. KIRKLAND. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of wheat proteins using a new, highly stable column. *Cereal chemistry* [online]. 1992, **69**(4), 371-378 [cit. 2017-04-02]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1992/Documents/69_371.pdf

[98] KAWKA, A., P.K.W. Ng a W. BUSHUK. Equivalence of high molecular weight glutenin subunits prepared by reversed-phase high-performance liquid chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal chemistry* [online]. 1992, **69**(1), 92-96 [cit. 2017-04-02]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1992/Documents/69_92.pdf

[99] HAN, C., X. LU, Z. YU, X. LI, W. MA a Y. YAN. Rapid separation of seed gliadins by reversed-phase ultra performance liquid chromatography (RP-UPLC) and its application in wheat cultivar and germplasm identification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. Taylor, 2015, **79**(5), 808-815 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1080/09168451.2014.998618. ISSN 0916-8451. Dostupné z: http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1080/09168451.2014.998618

[100] VISIOLI, G., A. COMASTRI, D. IMPERIALE, G. PAREDI, A. FACCINI a N. MARMIROLI. Gel-Based and Gel-Free Analytical Methods for the Detection of HMW-GS and LMW-GS in Wheat Flour. *Food Analytical Methods* [online]. 2016, **9**(2), 469-476 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/s12161-015-0218-3. ISSN 1936-9751. Dostupné z: https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s12161-015-0218-3

[101] MARÍN, S., J. GIL-HUMANES, A. HERNANDO a F. BARRO. Characterization of α/β- and γ-Gliadins in Commercial Varieties and Breeding Lines of Durum Wheat Using MALDI-TOF and A-PAGE Gels. *Biochemical Genetics* [online]. 2011, **49**(11), 735-747 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/s10528-011-9446-4. ISSN 0006-2928. Dostupné z: https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s10528-011-9446-4

[102] NICOLAS, Y., S. DENERY-PAPINI, J.P. MARTINANT a Y. 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]. Taylor, 2000, **12**(1), 53-65 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1080/09540100099625. ISSN 0954-0105. Dostupné z: http://www.tandfonline.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1080/09540100099625

[103] KHAN, M. R., F. M. ANJUM, I. PASHA, M. A. SHABBIR, S. HUSSAIN a M. NADEEM. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the assessment of spring wheat quality. *Food and agricultural immunology* [online]. Taylor, 2012, **23**(1), 1-15 [cit. 2017-04-02]. ISSN 1465-3443. Dostupné z: http://www.tandfonline.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1080/09540105.2011.583228

[104] POLIŠENSKÁ, I., L. NEDOMOVÁ a S. CUPÁK. *Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforézy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]*. Kroměříž: Agrotest fyto, 2010, 12 s. ISBN 978-80-904594-2-7.

[105] BARUTCULAR, C., M. YILDIRIM, M. KOC, H. DIZLEK, C. AKINCI et al. Quality Traits Performance of Bread Wheat Genotypes Under Drought and Heat Stress Conditions. *Fresenius Environmental Bulletin* [online]. 2016, **25**(12A), 6159-6165 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Ayman_EL_Sabagh/publication/311927775

[106] HLAVÁČOVÁ, M., E. POHANKOVÁ, K. KLEM a M. TRNKA. Effect of Temperature Stress and Water Shortage on Thousand Grain Weight of Selected Winter Wheat Varietes. In: *MendelNet 2015*. Brno: Mendel University in Brno, 2015, s. 43-47. ISBN 978-80-7509-363-9.

[107] BENCZE, S., O. VEISZ a Z. BEDŐ. Effects of high atmospheric CO_2 and heat stress on phytomass, yield and grain quality of winter wheat. *Cereal Research Communications*. 2004, **32**(1), 75-82.

[108] JIA, Y.Q., V. MASBOU, T. AUSSENAC, J.L. FABRE a P. DEBAEKE. Effects of nitrogen fertilization and maturation conditions on protein aggregates and on the breadmaking quality of soissons, a common wheat cultivar. *Cereal chemistry* [online]. 1996, **73**(1), 123-130 [cit. 2017-05-01]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1996/Documents/73_123.pdf

[109] DAI, Y. B., H. ZHAO, Q. JING, D. JIANG a W. X. CAO. Effects of high temperature and water stress during grain filling on grain protein and starch formation in winter wheat. *Acta Ecologica Sinica*. 2006, **26**(11), 3670-3676. ISSN 1872-2032.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
AFK	aktivní formy kyslíku
ANOVA	analýza variance
A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
AV ČR	Akademie věd České republiky
CE	kapilární elektroforéza
CFC	chlorofluorocarbon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EIA	enzyme imunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
Gln	glutamin
Gly	glycin
GMP	gluteninový makropolymer
HMW	vysokomolekulární podjednotky gluteninů
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
kol.	kolektiv
LC	kapallinová chromatografie
LMW	nízkomolekulární podjednotky gluteninů
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	hmotnostní spektrometrie
NIR	blízká infračervená spektrometrie
PCA	analýza hlavních komponent
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
RDA	redundanční analýza
RMT	rapid mix test
RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RP-UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
RV	relativní vlhkost
SA	kyselina salicylová
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	tetramethylethylendiamin
TOF	time of flight
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	tyrosin