

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Aplikace molekulárních markerů u pšenice
s nestandardním zbarvením obilky**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Matěj Pospíš

Brno 2017

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

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

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat doc. Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za obětavou pomoc, cenné rady a vstřícný přístup při vypracování diplomové práce. Také Ing. Petru Martinkovi, CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu Agrotest fyto s.r.o. za poskytnutí experimentálního materiálu, odborného dohledu a příkladnou spolupráci. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a přátelům za obrovskou podporu a důvěru, které se mi dostávalo během celého studia. Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV č. QJ1510206.

ABSTRAKT

Aplikace molekulárních markerů u pšenice s nestandardním zbarvením obilky

V posledních desetiletích se významně zvyšuje zájem o pšenice s nestandardním zbarvením obilky. Zvláště pro jejich zdravotní benefity spojené s antokyany, barvivy obsaženými v obalových vrstvách obilky, které mají antioxidační účinky. Z kolekce Agrotest fyto s.r.o. v Kroměříži byly vybrány vzorky osmnácti pšenic s nestandardním zbarvením obilky: čtrnáct s modrým aleuronem, tři se žlutým endospermem, a jedna s červeným (standardním) zbarvením obilky jako kontrola, u kterých proběhla série analýz založených na PCR pro detekci nulové alely *Waxy* genu, gluteninového lokusu *Glu-A3* a purinoindolinových genů tvrdosti obilky. Tyto parametry jsou významnými ukazateli kvality pšenice. U všech genotypů byla detekována přítomnost alely *Pina-D1a/b* a u některých *Pinb-D1a/c/d*. Podle zastoupení těchto alel by měly analyzované pšenice patřit do tzv. „hardness“ pšenic, vhodných pro pekárenské účely. Identifikovali jsme jeden materiál (V1-104-15), tzv. waxy genotyp s přítomností nulových alel ve *Waxy* genu. Podobné linie jsou v Asii využívány k přípravě těstovin. V lokusu *Glu-A3* byla detekována alela *Glu-A3d* u všech testovaných genotypů. Spolu s ní byla u některých genotypů nalezena alela *Glu-A3f*, která má pozitivní vliv na kvalitu těsta, zejména na tažnost. Výsledky budou využity pro další šlechtitelskou práci.

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

ABSTRACT

Application of molecular markers in wheat with non-standard discoloration of caryopsis

In recent decades the interest of wheat with non-standard discoloration of caryopsis has increased, because of its positive impacts on health. The pigments anthocyanins, which are included in the protective layer of grain, have antioxidant effects. A group of genotypes from Agrotest fyto Ltd. Kroměříž was chosen which consisted of eighteen samples of wheat with non-standard discoloration of caryopsis. Fourteen samples were blue (aleurone), tree yellow (endosperm) and one sample had a red (pericarp). By these samples PCR-based analyses were performed to detect the *Waxy* gene zero allele, the *Glu-A3* glutenin locus and the hardness of grain by purinoindoline genes. These parameters are significant indicators of wheat quality. By all genotypes the presence of allele *Pina-D1a/b* was detected and by a few the allele *Pinb-D1a/c/d*. These detected alleles, which are included in the analyzed wheat, should be sorted to the „hardness“ wheats because they are suitable for baking purposes. The identified material (V1-104-15), a so-called waxy genotype, was positive in the presence of all three zero alleles in the *Waxy* gene. Similar lines were used in Asia for the preparation of pastas. At the locus *Glu-A3*, the *Glu-A3d* allele was detected in all tested genotypes. Along with this, *Glu-A3f* was founded in some genotypes. These alleles have a positive effect on dough quality, especially on ductility. The results will be used for further breeding work.

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

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	11
3.1.1	Historie a vývoj rodu <i>Triticum</i> L.	11
3.1.2	Morfologický popis stavby rostliny a charakteristika obilky <i>Triticum aestivum</i> L.....	13
3.1.3	Technologická a pekařská kvalita.....	15
3.1.4	Rozdělení jakosti pšenice.....	16
3.1.5	Využití pšenice.....	17
3.2	Flavonoidy	18
3.2.1	Antokyany.....	20
3.3	Pšenice s nestandardním zbarvením obilky	21
3.3.1	Červená a bílá pšenice	23
3.3.2	Modrý aleuron a žlutý endosperm	23
3.3.3	Současné využití barevných pšenic	24
3.4	Molekulární markery.....	26
3.4.1	Rozdělení DNA markerů	26
3.4.2	Využití DNA markerů ve šlechtění.....	27
4	MATERIÁL A METODIKA	29
4.1	Experimentální materiál	29
4.2	Metodika	30
4.2.1	Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA .	30
4.2.2	Příprava reakčních směsí pro PCR	30
4.2.3	Příprava agarózového gelu.....	33

4.2.4	Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR.....	33
4.2.5	Vyhodnocení výsledků.....	34
5	VÝSLEDKY.....	35
5.1	Markery tvrdosti obilky.....	35
5.2	Detekce nulových alel <i>Waxy</i> genů	37
5.3	Analýza lokusu <i>Glu-A3</i>	37
6	DISKUZE.....	39
6.1	Tvrdost obilky	39
6.2	<i>Waxy</i> geny	40
6.3	Lokus <i>Glu-A3</i>	41
7	DOPLŇUJÍCÍ INFORMACE	43
7.1	Pěstované genotypy - polní podmínky	43
7.2	Charakteristika vegetačního roku 2015/2016.....	43
8	ZÁVĚR.....	46
9	PREZENTACE VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	48
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
12	SEZNAM TABULEK.....	62

1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), spolu s cukrovou třtinou, kukuřicí a rýží patří k nejpěstovanějším plodinám na světě. Tvoří základ stravy pro více než třetinu lidstva a u nás je dokonce nejpěstovanější obilovinou. Využití má široké. Ať už jako krmivo pro hospodářská zvířata, nebo také ve zpracovatelském průmyslu. Vyrábí se z ní totiž škrob, lín a především k výrobě nejrůznějších pečivářenských výrobků, neboť naše stravovací návyky jsou do značné míry závislé na spotřebě pečiva z bílé pšeničné mouky.

Odrůdy pšenice pěstované v konvenčním zemědělství jsou typické svým červeným zbarvením. V současnosti se věnuje pozornost i genotypům pšenice, které jsou svým zbarvením obilok výrazně odlišné a do popředí se dostávají díky schopnosti syntetizovat antokyany. Poměrně nově jsou zaváděny pšenice s purpurovým perikarpem, modrým aleuronem a žlutým endospermem či bílou obilkou. Karotenoidy (především lutein) jsou zodpovědné za žluté zbarvení endospermu, antokyany způsobují modré a purpurové zbarvení. Pro bílé zbarvení je pak charakteristické minimální, či nulové množství zmíněných barviv.

Antokyany patří mezi flavonoidy, což jsou rostlinné sekundární metabolity. Podle druhu zbarvují různé orgány do oranžové, červené, fialové a modré barvy. Různé zbarvení květů například hraje důležitou roli v přilákání hmyzích opylovačů, u jiných orgánů pak toto zbarvení může obecně mít úlohu v odolnosti vůči stresu, včetně například odolnosti k houbovým chorobám. Odlišně zbarvené zrno pšenice může být považováno za tzv. „funkční potravinu“ díky zvýšenému množství antioxidačních látek. Antioxidanty působí preventivně proti chorobám vyvolaným oxidativním stresem. Sem se řadí nemoci kardiovaskulární, neurodegenerativní či některé typy rakoviny.

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

Cílem diplomové práce bylo provedení DNA analýz pro detekci významných genů (markerů), určujících kvalitu pšenice v kolekci osmnácti vzorků pšenice s nestandardním zbarvením obilky.

2 CÍLE PRÁCE

V této práci je stanoveno několik cílů:

1. Vypracování literární rešerše na problematiku využití molekulárních markerů ve šlechtění pšenice s nestandardním zbarvením obilky se zaměřením na genotypy s modrým aleuronem.
2. Izolace genomické DNA vybraných genotypů pšenice s modrým aleuronem.
3. Realizace vlastních PCR reakcí pro detekci markerů využitelných pro markery asistovanou selekci na technologickou u pšenice s nestandardním zbarvením obilky, včetně elektroforetické separace, a případné optimalizace PCR protokolů.
4. Vyhodnocení a interpretace výsledků, včetně doporučení pro praxi.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá má dominantní postavení ve struktuře obilovin i pěstovaných plodin, jak ve světě, tak i u nás. Zaujímá téměř čtvrtinu orné půdy a polovinu ploch obilnin u nás. Od počátku padesátých let minulého století se začala významněji rozšiřovat i do vyšších poloh, kde nahrazuje stále snižované plochy ovsa a žita. Své prvenství má pšenice mezi obilovinami protože zabezpečuje výživu převážné části lidstva na naší planetě a s největší pravděpodobností je i nejstarší obilninou, využívanou člověkem (Zimolka et al. 2005).

V České republice roční spotřeba pečivářenských produktů z bílé mouky (rohlíky, housky, koláče) činí 44 kg na osobu, což je o 30 % více než koncem 80. let minulého století, současně došlo ke snížení konzumace chleba o 4 % na 54,5 kg na osobu. To se děje navzdory znalostem o příznivějším zdravotním vlivu celozrnných produktů oproti výrobkům z mouky. Je potřeba se zamýšlet nad možností lepšího využití zdraví prospěšných látek, které jsou v pšeničném zrna k dispozici a nad možnostmi využívání vhodných genetických zdrojů pro zlepšování nutriční kvality (Martinek et al. 2016).

3.1.1 Historie a vývoj rodu *Triticum* L.

Nejstarší kulturní druhy, mezi které patří i pšenice, pocházejí z doby po významné změně klimatu (nástup poslední doby meziledové) obvykle z období 10 000 až 11 000 lety. Pšenice konkrétně pochází z oblasti blízkého východu, označované jako „Úrodný půlměsíc“ (Nesbitt 2001). Zde se do dneška zachovala řada planých forem pšenice a mnohoštetu, které vizuálně připomínají spíše planě rostoucí trávy (Grau et al. 1998). Nejstarší archeologický nález plané pšenice, se známkami manipulace člověkem (nález u ohniště) se pak datuje do doby před 18 000 lety v oblasti dnešní Sírie (Petr 2008).

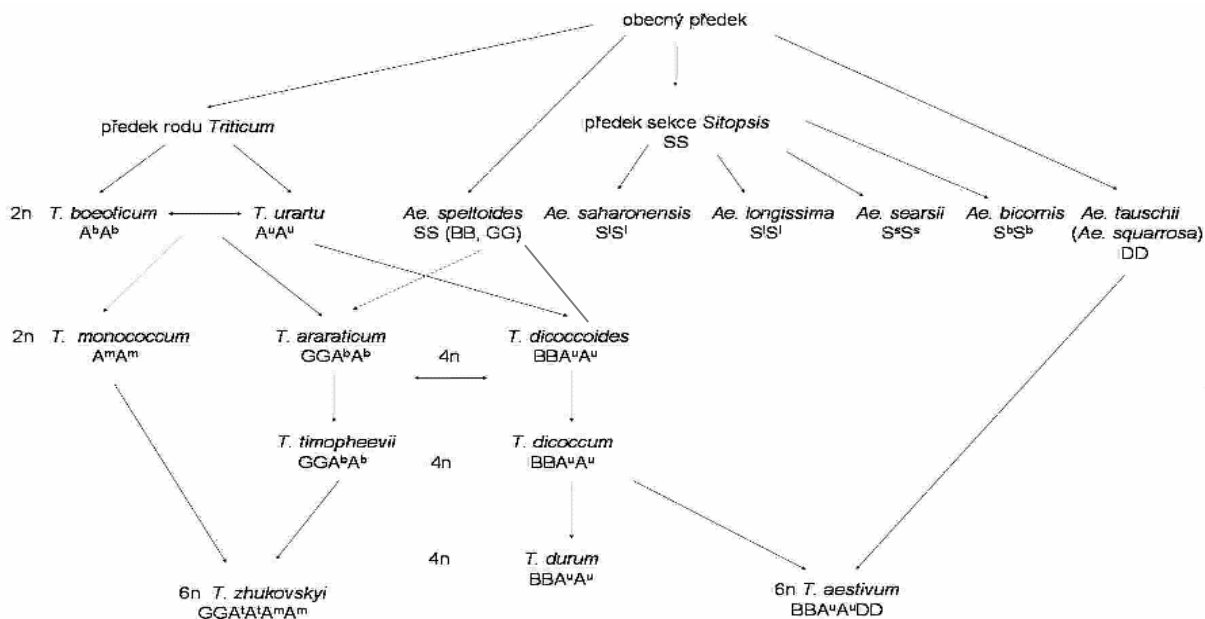
Rod *Triticum* patří do čeledi *Poaceae*, tedy lipnicovité. Základním chromozomovým číslem „x“ je 7. Předkem rodu *Triticum* L. je pravděpodobně nějaký dnes neznámý předek. Dělení rodu *Triticum* L. zahrnuje velké množství druhů (s ohledem na používanou klasifikaci), které lze podle počtu chromozomů na tři skupiny

(podrody): diploidní ($2n = 2x = 14$, AA), tetraploidní ($2n = 4x = 28$, BBAA) a hexaploidní ($2n = 6x = 42$, BBAADD) (Carver 2009).

Vývoj rodu *Triticum* je především výsledkem inter- a intraspecifické hybridizace, polyploidizace a opakujícího se křížení mezi navzájem různě příbuznými druhy (Gustafson et al. 2009). Během vývoje nejspíš došlo ke křížení mezi diploidní planým předkem současného *Aegilops speltoides* ($2n = 2x = 14$, genomy BB) s diploidní pšenicí *Triticum urartu*, ($2n = 2x = 14$, genomy A^uA^u). Vzhled původního mnohoštětu není znám, protože se nedochoval do dnešní doby, v současnosti je známa řada druhů mnohoštětů, které jsou si navzájem různě příbuzné. Na základě výsledků různých molekulárních analýz se současní systematici domnívají, že předkem byl nějaký mnohopštět, který se nejvíce podobá současnému *Aegilops speltoides* varieta *stragulata*. Vzhledem k tomu, že se cytoplasma přenáší po matce a skutečnosti, že byla nalezena velká shoda mezi chlorofylovými a ribosomálními nukleovými kyselinami současných pšenic s tímto druhem, píšeme formuli genomů v pšenici s genomy BB na počátku (zachování konvence psát druh, ze kterého pochází cytoplasma na 1. místě). *Triticum urartu* se zachovalo do dnešní doby a vzorky jsou dostupné v mnoha genových bankách. Genom S dnes dochovaných *Ae. speltoides* je homologní s chromozomem B, avšak není identický (Luo et al. 2007). Embryo křížence *Ae. speltoides* a *T. urartu* mělo 14 chromozomů a genom BA, avšak jedinec byl zřejmě sterilní z důvodu nemožnosti párování odlišných chromozomů během meiózy (Gustafson et al. 2009). K odstranění sterility vedla až náhodná allopolyploidizace a vytvoření tetraploidní sestavy (tetraploidizace) a výsledkem byla situace $2n = 4x = 28$, genomy BBA^uA^u (Goncharov, 2008).

Křížení vzniklé tetraploidní pšenice ($2n = 4x = 28$, genomy BBA^uA^u) s *Ae. squarrosa*, syn. *Ae. tauschii* ($2n = 2x = 14$, genomy DD) vedlo ke vzniku jedince s genomem BA^uD, u kterého opět nastávaly problémy se sterilitou. Až opět allopolyploidizací vznikla hexaploidní pšenice s 42 chromozomy ($2n = 6x = 42$, genomy BBA^uA^uDD) (Goncharov et al. 2008).

Na obrázku 1 je zobrazeno schéma vzniku polyploidních řad rodu pšenice. Vztahy mezi zástupci rodu *Triticum* a *Aegilops* jsou vyjádřeny šipkami.

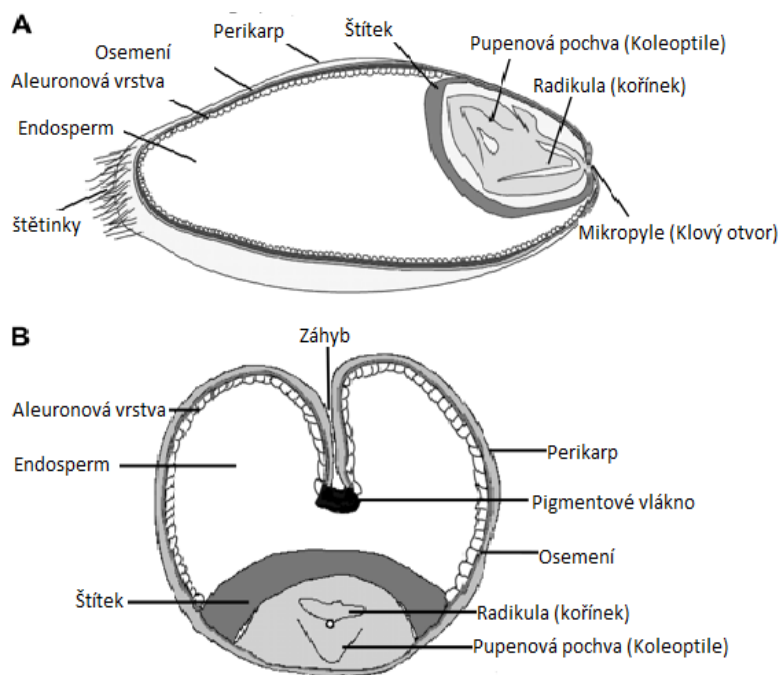


Obrázek 1: Schéma evoluce pšenice (Goncharov et al. 2008)

3.1.2 Morfologický popis stavby rostliny a charakteristika obilky *Triticum aestivum* L.

Pšenice setá má květenství lichoklas (prodloužené květenství s květy přisedlými ke květnímu stonku ukončené terminálním kláskem) nelámaný, osinatý nebo bezosinatý a různě hustý (v běžné mluvě říkáme, že květenstvím pšenice je klas). Stéblo je duté, kolénkaté, tvořeno z nodů (kolének) a internodií (článků) (Špaldon 1982). Počet kolének udává i počet listů, jež je po stéble spirálovitě rozložen. Pochva listu objímá stéblo přisedle. Na přechodu mezi pochvou a čepelí je jazýček, po obou stranách listové pochvy pak jsou umístěna ouška. Existuje však i mutace pšenice, která jazýček ani ouška nemá. Po opylení ze semeníku, se u rodu pšenice vyvíjí plod. Stěna plodu se pojuje během dozrávání s vlastním osemením, vzhledem ke své tvrdosti a křehkosti přejímá jeho funkci a konečně s ním úplně srůstá. Takto tvořené plody nazýváme *caryopsis*. Na obrázku 2 vidíme složení obilky ze tří základních částí: obaly, endosperm a zárodek (Grau et al. 1998).

Obalové vrstvy slouží k ochraně obilky, proti nepříznivým vlivům, po mletí tvoří frakci otrub. Obaly tvoří asi 8 % z celkové hmotnosti obilky. Dále lze obalové vrstvy dělit do dvou kategorií: oplodí a osemení.



Obrázek 2: *Struktura obilky (upraveno dle Rathjen et al. 2009)*

Vysvětlivky: (A) *podélný řez*, (B) *příčný řez*

Oplodí je tvořeno z *epidermis* jednovrstevné pokožky. Pod ní se nachází jedna nebo dvě vrstvy podkožkových buněk (buňky podélné), pod nimiž se ještě nachází buňky příčné. Primární úkol této vrstvy je chránit obilku před mechanickým poškozením, či kodlivými látkami. Osemení je proto tvořeno nepropustnými a jen obtížně bobtnajícími materiály, jako je například celulóza. Osemení se nachází pod oplodím, avšak nesrůstá s ním. Obě vrstvy jsou k sobě pevně přimknuty. Nese v sobě barviva, díky kterým obilka získává svoji charakteristickou barvu. Některé z vrstev osemení obsahují polysacharidické látky, které přispívají k udržování rovnováhy vlhkosti zrna, a to díky schopnosti zadržovat vodu bobtnáním škrobu (Zimolka et al. 2005).

Endosperm je část obilky, která zaujímá 80 - 85 % hmotnosti obilky. Aleuronové buňky tvoří vnější část endospermu, ty mají vysoký obsah bílkovin. Samotný endosperm je tvořen tenkostěnnými buňkami se škrobovými zrny (Pomeranz 1973). Embryo je uloženo na bázi hřbetní strany obilky a jeho podíl na hmotnosti obilky činí asi 1,5 – 3 %. Zárodek je kryt oplodím a osemením. K endospermu přiléhá štítkem (*sculentum*), což je první děloha. *Plumula*, vzrostlý vrchol, se základy listů, je krytý blanitou pochvou (*koleoptile*) a je uložen na apikální straně. Na bazální straně je

hypokotyl se zárodky kořínků. V embryu je uloženo 3, 5 nebo více kořínků, což se liší druh od druhu. *Radikulu*, prostřední zárodečný kořínek, kryje pochva (*koleorhiza*). *Calyptra*, kořenová čepička kryje vrchol kořene. Povrch zárodku je tvořen epidermis, na které se v pozdějších tvoří kutikula (Evers a Millar 2002).

3.1.3 Technologická a pekařská kvalita

Je obecně známo, že obalové vrstvy obilky jsou hlavním zdrojem vlákniny, aleuronová vrstva obsahuje bílkoviny a vlákninu, endosperm pak především škrob také s určitým procentem bílkovin, vitamínů a minerálních látek (Petr 2008). V tabulce 1 je shrnuto procentuální zastoupení jednotlivých složek zrna pšenice. Genotyp, klimatické a agrochemické podmínky ovlivňují kvalitativní charakteristiky obilky, včetně obsahu škrobu. Obsah škrobu se pohybuje v rozmezí okolo 50 – až 70 %. Je známo, že mezi množstvím škrobu a jakostí lepku není žádný vztah, protože při vypírání lepku bývá škrob odplaven. Hlavními složkami škrobu jsou amyulóza a amylopektin. Konzistence střídky a barva kůrky závisí nejen na obsahu škrobu a lepku ale především na způsobu zpracování těsta a průběhu pečení. Soubor bílkovin obilného zrna je tvořen několika frakcemi (tabulka 2). Ty lze dělit podle funkčnosti, nebo podle rozpustnosti (Kuchel et al. 2006).

Gluteniny a prolaminy tvoří 80 až 90 % všech bílkovin zrna a jsou bohaté na aminokyselinu kyselinu glutamovou a také prolin. Zastoupení esenciálních aminokyselin a aminokyselin obsahujících síru je v zásobních bílkovinách pšenice poměrně nízké, vyšší však je v gluteninech než v prolaminech. Pekařská kvalita je zásadně ovlivněna druhem bílkovinných frakcí, neboť tyto ovlivňují mechanické vlastnosti lepkové bílkoviny. Gliadiny podmiňují vyšší tažnost a lepivost těsta, zatímco gluteniny umožňují ve větší míře utváření složitých bílkovinných struktur během přípravy těsta, které ovlivňují pružnost a bobtnavost (Wieser 2006). Kromě obsahu těchto látek je důležitý i jejich vzájemný poměr.

Pod pojmem „pekařská kvalita“ si můžeme představit jakost pšeničného zrna či mouky, která disponuje schopností poskytnout pečivo požadované kvality. Jakostní pečivo by se mělo vyznačovat hlavně kyprou, objemnou, pružnou a jemně pórovitou střídkou, obalenou dostatečně silnou kůrkou příjemné chuti a vůně. Je dána, jak obsahem, tak vzájemnou interakcí látek v ní obsažených, a proto se špatně vyjadřuje

jedním, či několika parametry. Nejvýznamnější roli zde mají obsah a kvalita lepku (Both a Chloupek 2005).

Tabulka 1: *Průměrné zastoupení složek v sušině obilky T. aestivum L. (Chloupek et al. 2008)*

Složky obilky pšenice	Procentuální zastoupení
Minerály	1,8
Bílkoviny	13,0
Škrob	68,0
Tuk	2,3
Vláknina	2,3
Ostatní	11,9

Tabulka 2: *Průměrné složení frakcí bílkovin obilky T. aestivum L. (Petr 2008)*

Bílkovinné frakce endospermu zrna pšenice	Procentuální zastoupení
Albuminy	11,9
Globuliny	5,2
Prolaminy	28,5
Gluteniny	16,6
Zbytky	14,0

3.1.4 Rozdělení jakosti pšenice

Jakost neboli kvalita je definována jako schopnost souboru inherentních znaků výrobků, systému nebo procesu plnit požadavky zákazníků a zainteresovaných stran, respektive to je „stupeň splnění požadavků souborem inherentních znaků (Salzmann a Kraus 2007). V případě pšenice jsou inherentními znaky považovány vnitřní vlastnosti zrna.

Jakost vyjadřuje naplnění určitých vlastností a požadavků vůči nějakému standardu. Jelikož obiloviny naplňují různé požadavky jak spotřebitelů, tak zpracovatelů, musíme na ně nahlížet hned několika hledisky (Zimolka et al. 2005):

- Technologická jakost – obsah účinné látky, zpracovatelnost
- Hygienická jakost – zdravotní nezávadnost či závadnost

- Nutriční jakost – vyhovění nutričním požadavkům
- Senzorická jakost – vzhled, křupavost
- Užitiná jakost – směr a způsob využití, trvanlivost

3.1.4.1 Jakostní ukazatele

Parametry, stanovující obsah fyzikálně chemických vlastností potravinářské pšenice patří vlhkost, objemová hmotnost, obsah dusíkatých látek v sušině, Zelenyho sedimentační index, číslo poklesu, obsah lepku, obsah příměsí a nečistot. V tabulce 3 jsou obsaženy jakostní ukazatele mezních hodnot.

Tabulka 3: Hodnoty jakostních ukazatelů (Jirsa et al. 2011).

Jakostní ukazatele	Pšenice pekárenská	Pšenice pečivářenská
Vlhkost (%)	Nejvýše	14,0
Objemová hmotnost (kg/hl)	Nejméně 76,0	Nejméně 76,0
Obsah N-látek v sušině (%)	Nejméně 11,5	Nejvýše 11,5
Zelenyho sedimentační test (ml)	Nejméně 30	Nejvýše 25
Číslo poklesu (s)	Nejméně 220	Nejméně 220
Příměsí a nečistoty (%)	Nejvýše 6,0	Nejvýše 6,0
Lepek (%)	Nejméně 25,0	Nejméně 25,0

Vedle parametrů fyzikálně chemických vlastností, které definují pšenici jako potravinářskou, je nezbytná i zdravotní nezávadnost, musí být bez cizích pachů. Je také dále nepřipustné, aby obsahovala byť jen mírně plesnivá zrna, či zrna poškozená plošticemi, nebo nakažená mazlavou snětí.

3.1.5 Využití pšenice

Pšenice je nejvíce využívána pro pekařské, pečivářenské a krmné účely. Tvoří základní zdroj lidské výživy a odrůdy dělíme podle vhodnosti k pekařskému zpracování. Vyrábí se z ní kynutá těsta a dělí se do skupin dle jakosti.

- E – elitní pšenice (nejkvalitnější),
- A – kvalitní pšenice (dobré, samostatně zpracovatelné),
- B – chlebová pšenice (doplňkové, zpracovatelné ve směsi),

C – všechny odrůdy nevhodně pro tvorbu kynutého těsta, pšenice vhodné pro výrobu sušenek, či pro výrobu škrobu a lihu a také pšenice krmné (Zimolka et al. 2000).

Pekařská jakost pšenice je hodnocena podle obsahu zásobních bílkovin



Obrázek 3: Pečivo upečené z purpurové pšenice PS Karkulka (Vyhnánek 2016)

v endospermu zrna. Významnou vlastností pro mlynářskou jakost je tvrdost zrna. Tvrdost zrna souvisí se schopností bílkovin uzavřít škrobová zrna v proteinové „matrix“. Je zde pozorována významná souvislost s technologickou jakostí a předurčuje vhodnost odrůdy k využití za konkrétních podmínek, ke konkrétním účelům. Podle faktoru tvrdosti lze dělit odrůdy na takzvané tvrdé, které jsou vhodné pro zpracování na kynuté produkty a měkké, které jsou vhodné pro produkty pečivářenské (Dendy a Dobraszczyk 2001). Na obrázku 3 můžeme vidět pečivo z barevné pšenice.

3.2 Flavonoidy

Flavonoidy patří do skupiny přírodních sloučenin s proměnlivou fenolickou strukturou. Můžeme je nalézt v ovoci, zelenině, semenech, pokožce, kořenech, stoncích, květech. Jsou známy pro své pozitivní dopady na lidský organismus (Midelton 1998).

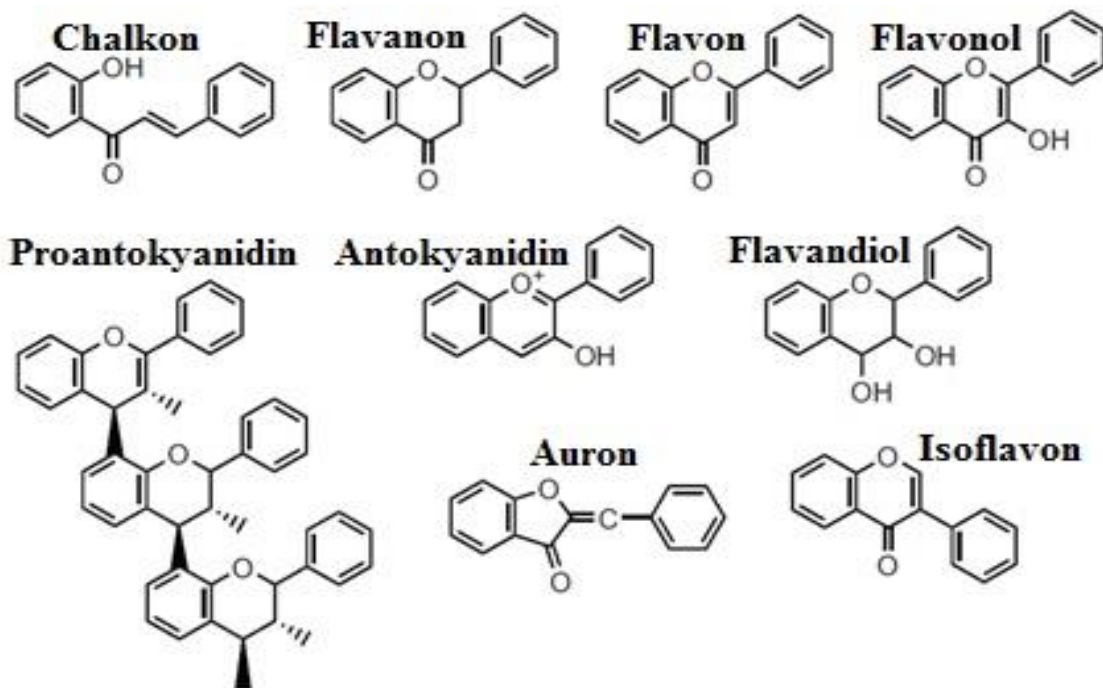
Flavonoidy mohou být rozříděny do skupin na základě molekulární struktury (tabulka. 4, obrázek 4).

Flavonoidy hrají důležitou roli ve fyziologických procesech rostlin, jako jsou například přenosy energie, regulace aktivity fytohormonů. Dále ovlivňují fotosenzitivitu, procesy dýchání či fotosyntézu (Rice-Evans et al. 1995).

Tabulka 4: *Hlavní skupiny flavonoidů a jednotlivé sloučeniny (přepřacováno podle Nijvekd et al. 2001)*

Skupina	Sloučenina
Flavony	Apigenin, Chrysin, Kaempferol, Luteolin, Myricetin, Rutin, Sibelin, Quercetin
Flavonoly	Fisetin, Hesperetin, Narigin, Naringenin, Taxifolin
Katechiny	Katechin, Epikatechin, Epigallokatechin gallát
Antokyany	Kyanidin, Delfinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin

Flavonoly, flavony a antokyany také hrají důležitou roli při řadě abiotických stresů. Jejich akumulace v epidermálních buňkách a trichomech listů, má funkci UV – B filtrů. Dále mohou tvořit komplexy s DNA, čímž ji pomáhají chránit proti oxidačnímu stresu (Aron a Kennedy 2008). Všechny flavonoidy sdílejí základní patnácti-uhlíkatý skelet, složený z flavonového jádra, tvořeného dvěma aromatickými šesti-uhlíkatými kruhy A a B, které jsou navzájem propojeny tří-uhlíkatým heterocyklem C. Takový skelet je označen takto: C6-C3-C6 (Marais et al. 2006). V současné době známe kolem 6000 flavonoidů a stále jsou objevovány nové. Odvozené jsou od aminokyseliny fenylalaninu a malonyl-CoA, ty vznikají přes fenylpropanoidovou dráhu. Ta poskytuje několik větví metabolismu, díky které vznikají až tisíce sloučenin. Sem patří i ligniny, konstituční polymery, které dávají pevnost a tuhost sekundární buněčné stěně a jsou základními prvky vodotěsnosti vaskulárních buněk (Vahnholme et al. 2010; Falcone Ferreyra et al. 2012).



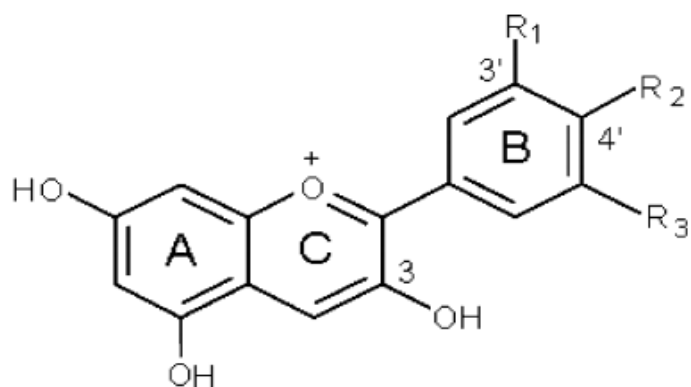
Obrázek 4: *Struktura hlavních tříd flavonoidů (přepřacováno podle Falcone Ferreyra et al. 2012)*

3.2.1 Antokyany

Antokyany jsou fenolické, flavonoidní látky. Jsou to přírodní barviva, díky jimž rostliny tvoří viditelně rozdílné zbarvení svých orgánů (Castaneda-Ovando et al. 2009). Jejich funkce je různá v závislosti na části rostliny. Obecně se dá jejich působení vyjádřit jako fotoprotektivní funkce, zvyšují atraktivnost květů pro opylovače a také způsobují rezistenci vůči různým houbovým chorobám (Khlestkina et al. 2008). Antokyany vytváří komplexy spolu s kovy. Komplex s molybdenem tvoří modrou a fialovou barvu, železitý komplex je červené barvy a bílá barva vzniká při účasti mědi, nebo niklu (Figueiredo et al. 1996).

Známe na 600 popsanych antokyanů, z nich nejběžnější jsou tyto: kyanidin, delfinidin, pelargonidin, malvinidin, peonidin, petunidin (obrázek 5).

Antokyany se běžně vyskytují v ovoci a zelenině. Podle Espley et al. (2007) dochází k největší akumulaci antokyanů během zrání plodů, a to zejména u hroznů, borůvek nebo jablek.



Antokyany	R ₁	R ₂	R ₃
Pelargonidin	H	OH	H
Kyanidin	OH	OH	H
Delfinidin	OH	OH	OH
Peonidin	OMe	OH	H
Petunidin	OMe	OH	OH
Malvidin	OMe	OH	OMe

Obrázek 5: Chemická struktura šesti nejběžnější se vyskytujících antokyanů (přepřacováno podle Wu a Prior 2005)

3.3 Pšenice s nestandardním zbarvením obilky

První studie týkající se genetické determinace barvy zrna byly uskutečněny s využitím aneuploidie (detekce „kritického křížení“ při používání křížení testovaného materiálu s úplnou sérií monosomiků nebo definovanými teleosmiky). Postupem času byly využívány molekulární analýzy detekce příslušných genů (Zeven 1991, Khlestkina, 2013).

V současnosti existuje ve světě několik registrovaných odrůdy pšenice seté s tímto nezvyklým zbarvením zrna. U některých z nich je deklarovaný pozitivní vliv na zdraví konzumentů (člověk, zvířata) s ohledem na předpisy na deklarace příslušných tvrzení v jednotlivých státech. Například v Rakousku se vyrábí chleba s názvem „Pur-Pur Brot“. Surovina může sloužit jako zdroj přírodních barviv (Žofajová et al. 2012) nebo i k nižšímu využívání syntetických barviv (Abdel – Aal a Hucl 1999), obrázek 6.

Modrozrné pšenice mají obvykle vyšší obsah antokyanů, proti pšenícím purporovým. Celozrný šrot obsahoval 157 mg/kg a otruby 458 mg/kg antokyanů. U pšenice s purpurovým perikarpem se antokyany vyskytují v povrchové vrstvě zrna. Díky tomu je v otrubách vyšší průměrný obsah antokyanů (251 mg/kg), oproti celozrnnému šrotu (104 mg/kg) (Abdel-Aal a Hucl 1999). Odlišná barva zrna je rovněž využitelná jako vizuální marker například pro hodnocení míry allogamie (cizosprašnosti) u pšenice (Jaafar et al. 2013). Purpurově zbarvené zrno je způsobeno geny Pp, které se nachází na sedmé homeologické skupině chromozomů, které pocházejí z tetraploidní pšenice *T. turgidum* subsusp. *abyssinicum* Vavilov, která je domovem v Aabyssinské oblasti v Etiopii.



Obrázek 6: Zrno barevné pšenice (Garg et al. 2016)

Vysvětlivky - a modrá, b-d vylepšené linie křížením mezi modrými a bílými kultivary, e světle fialová, f tmavě fialová, g a h bílé kultivary s vysokým výnosem, j až l modře, fialově a černě zbarvené linie po křížení černých a bílých kultivarů

3.3.1 Červená a bílá pšenice

Běžná pšenice má světle okrové zbarvení zrna, které ovšem v odborné terminologii je označováno jako červené. Červené a bílé zbarvení zrna je u pšenice seté nejběžnější (Zeven 1991). Červená barva zrna je podmíněna přítomností alespoň jedné ze tří dominantních alel *R-A1* (na chromozomu 3AL), *R-B1* (3BL) a *R-D1* (3DL). Bílé zbarvení je dáno sestavou recesivních alel *r-A1*, *r-B1* a *r-D1*, musí být v genotypu přítomny všechny tyto recesivní alely současně. Bílé zbarvená pšenice obsahuje výrazně nižší procento hořkých, fenolických látek, neboť zde není přítomný enzym polyfenol oxidáza, který je nezbytný pro tvorbu soužitých polyfenolických látek. Bílé obilky bez přítomnosti hořkých látek jsou náchylnější k porůstání. Produkt z bílého zrna je přirozeně sladší, čehož by se teoreticky dalo využít v cukrářství (Gros et al. 2002). Bílá barva zrna je podmíněna trojicí recesivních alel *r-A1*, *r-B1* a *r-D1* (bývá používáno i jiné označení těch to alel.) Oproti těmto běžným barvám existuje i jiné zbarvení, způsobené geny pro purpurový perikarp (*Pp*), modrý aleuron (*Ba*) a žlutým endospermem (geny *Psy*, pro fotosyntetickou dráhu fytoen syntázy) (Knievel et al. 2009).

3.3.2 Modrý aleuron a žlutý endosperm

Modré zbarvení je způsobeno geny *Ba* pro modrý aleuron. Dle katalogu genetických symbolů máme dva geny: *Ba1*, ten byl přenesen dohromady s celým ramenem chromozomu 4B planého druhu *Thinopyrum ponticum* (Qualset et al., 1983) a vyskytuje se u jarní pšenice UC66049. Gen *Ba2* pochází z pšenice (*Triticum boeoticum* Boiss.) a leží na chromozomu 4AL. Zřejmě existuje ještě další nepopsaný gen, pocházející z pšenic nacházejících se jako dědictví po Erichu von Tschermak-Seisenegg. V současnosti existuje odrůda ozimé pšenice Skorpion s tímto dosud neidentifikovaným genem (Martinek, 2017, osobní sdělení). Pro detekci přenosu částí chromosomálních segmentů – translokací se nejčastěji využívá metoda FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a GISH (genomická *in situ* hybridizace) (Zheng et al., 2006, Burešová et al., 2015). Byly popsány modrozrné botanické variety *T. spelta* var. mostovoy Škorpík, *T. spelta* var. cyanospermum Škorpík, *T. aestivum* L. var. rodianum Škorpík a *T. aestivum* L. var. kovacicianum Škorpík (Škorpík a Šašek, 1980). Důležitými enzymy pro vznik purpurového a modrého pigmentu jsou zde chalkon

syntáza, chalkon izomeráza, dihydroflavonol-4-reduktáza a flavono-3-hydroxyláza. Tyto enzymy se účastní biosyntetické dráhy antokyanů (Himi et al. 2005).

Žluté zbarvení endospermu zrna pšenice je charakteristické u mnoha odrůd pšenice tvrdé *Triticum durum* Desf., neboť spotřebitelé požadují žluté zbarvení těstářenských výrobků. U hexaploidní pšenice je žluté zbarvení zpravidla výjimkou. Přesto však existuje několik odrůd pšenice s tímto zbarvením (Citrus, Bona Dea, Bona Vita, Luteus). Žluté zbarvení je způsobeno hlavně luteinem (méně často zeaxanthinem). Vzhledem k tomu, že tyto látky jsou obsaženy v endospermu, dostávají se ve velké míře přímo do mouky, což způsobuje její žluté zbarvení. Žluté zbarvení je udáváno geny *Psy1* a *Psy2* lokalizovanými na 7. homeologické skupině chromozomů 7A a 7B, které jsou nejčastější (Pozniak et al. 2007). Bylo popsáno však mnoho dalších *Psy* alel.

3.3.3 Současné využití barevných pšenic

Předpokladem pro uplatnění pšenic s barevným zrnem v praxi je dosažení srovnatelné výnosové úrovně jako u běžných odrůd. To ještě bude vyžadovat značné šlechtitelské úsilí. Rovněž bude potřebné navrhnout pěstitelské a zpracovatelské technologie tak, aby ve finálním výrobku byl co nejvyšší obsah těchto látek. Využití barevných pšenic se v současné době ubírá více směry: jako funkční potravina (výroba nudlí, expandované /pufované/ výrobky, pekárenské výrobky, krmná plodina (Martinek et al. 2016).

Funkční potraviny, které většinou vypadají, voní a chutnají stejně jako jejich běžné protějšky, by měly být každodenní složkou potravy každého z nás. Pravidelná konzumace takových potravin posiluje náš imunitní systém a obranné mechanismy proti škodlivým vlivům prostředí. Působí také jako prevence nemocí a prevence stárnutí.

Janečková et al. (2014) posuzovala, jaké jsou možnosti využití fialové pšenice (mouka, otruby, semolina) při výrobě pekařských výrobků. Použili novozélandskou odrůdu Konini s purpurovým zrnem. Byl zjišťován vliv dodatečně dodaných otrub v dávce 10 % až 30 % z pšenice Konini do běžné mouky. Přidání otrub vedlo k negativním sensorickým vlastnostem daného pečiva, týkající se tvaru chleba, drobné textury a horší chuti. Přijatelný byl 10 % podíl otrub ve směsi.

Hrušková et al (2012) provedla těstářenský pokus s odrůdami žlutých pšenic Citrus a Luteus, kde hodnotila výrobu nevaječných a jednovaječných těstovin. Byly

porovnávány vlivy rozdílně namleté mouky. V sušeném stavu byl hodnocen objem těstovin, tvar, povrch a barva. Po uvaření zde byla hodnocená barva, vaznost, bobtnavost, chuť a vůně. Objem těstovin, vaznost a bobtnavost se výrazně nelišily od těstovin klasických. U sensorického hodnocení se neprokázal rozdíl tvaru ani povrchu. Barva u obou typů těstovin byla standardní. V sušeném stavu nebyl rozpoznán žádný rozdíl v barvě, jak bylo předpokládáno, stejně tak i po uvaření. Ze získaných výsledků je patrné, že z odrůd Citrus i Luteus je možné vyrobit těstoviny standardní spotřebitelské jakosti.

Antioxidační schopnost antokyanů je nepříznivě ovlivněna teplotou během zpracování pečiva (Dewanto et al. 2002), což potvrzují ve své práci také Bartl et al. (2015), kteří odhalili významný rozdíl v obsahu antokyanů, když při přípravě chleba z modré a fialové pšenice zvolili rozdílné časy a teploty pečení, přesněji 240 °C, 21 minut a 180 °C, 31 minut. Analýzy chleba upečeného z modré celozrnné mouky při teplotě 240 °C a 21 minutách odhalily obsah antokyanů 8,33 mg/kg (pokles o 7,1 %) a z fialové celozrnné mouky 5,2 mg/kg (pokles o 40,8 %). Tento pokles obsahu antokyanů je závislý na způsobu pečení a byl vyšší při 240 °C, 21 minutách. Ztráta antokyanů byla mnohem vyšší u chleba z fialové mouky. Autoři uvažovali, že acetylace antokyanů ve fialové pšenici je více termolabilní, než v modré. Stejný pokles obsahu antokyanů (182 °C, 4 minuty) pokles 11 % a (204 °C, 10 minut) pokles 25 % totiž pozorovali ve své práci Li et al. (2011). Zde byly experimentálně pečeny sušenky z modré kukuřice.

Dále probíhal výzkum o prospěšnosti pšenice s barevným zrnem na brojlerech a potkanech na Mendelově univerzitě v Brně. Karásek et al. (2014) pozoroval účinky při krmení barevnou pšenicí Konini na parametry antioxidační aktivity u potkanů. Tuto aktivitu měřil v játrech potkanů. Pro experiment zvolil 64 samců. První skupina (32 jedinců) byla krmena 100% granulovanou barevnou pšenicí. Kontrolní, druhá, skupina byla krmena běžnou pšenicí. Výsledky hovoří jasně. Potkani, krmeni barevnou pšenicí vykazovali v játrech vyšší antioxidační aktivitu.

Mareš et al. (2015) testovali jaký má vliv krmení fialovou pšenicí Konini na velikost a hmotnost kaprů. I zde byl prokázán pozitivní vliv krmiva barevnou pšenicí nárůstem v průměru o 156,53 mm a váhou vyšší v průměru o 60,81 g.

3.4 Molekulární markery

Molekulární markery slouží k identifikaci žádoucích genů a tak nám poskytují informace o alelickém složení v určitém lokusu. Během posledních let došlo k velkému posunu na poli molekulární biologie, což vedlo k zavedení mnoha nových typů molekulárních markerů. Jako první se počátkem 60. let 20. století začaly využívat allozymové polymorfizmy, neboli izoenzymové markery. Izoenzymy jsou různé formy téhož enzymu. Tyto izoenzymy katalyzují totožné chemické reakce, avšak důsledkem odlišného pořadí aminokyselin se jejich primární struktura liší svým nábojem, či konformací. Detekce polymorfizmů pak probíhá pomocí gelové elektroforézy, která rozděluje molekuly podle velikosti náboje, jehož velikost určuje složení dané aminokyseliny. Jejich nevýhodou však je nízká variabilita oproti DNA markerům (Estoup et al. 1998).

Proto se v dnešní době nejvíce používají DNA markery, které hodnotí vlastní strukturu DNA. Díky své vysoké variabilitě lze charakterizovat celý genom. Jsou spolehlivé, neboť jejich vlastnosti závisí výhradně na sekvenci DNA. Také jejich rychlá determinace je jejich velkou předností. Identifikace se provádí pomocí metod molekulární biologie jako je izolace DNA, PCR (polymerázová řetězová reakce), štěpení restrikcími enzymy a elektroforéza (White & Cooke 1992).

3.4.1 Rozdělení DNA markerů

Významným využitím markerů je zlepšování účinnosti šlechtění pomocí nepřímého výběru přes lokus pro kvantitativní znak (QTL). Každý marker má jisté výhody a nevýhody, které závisí na daném využití. Markery lze rozdělit do následujících tří skupin (Gupta et al. 1999):

- DNA markery založené na hybridizaci se sondou (RFLP a DNA fingerprinting).
- DNA markery založené na PCR (RAPD, AFLP, CAPS, SSR a STS).
- DNA markery založené na DNA čípech a sekvencování (SNP).

3.4.1.1 STS (Sequences Tagged Sites)

Princip této metody je založen na znalosti konkrétní unikátní sekvence DNA v genomu. Využívá se jich k mapování zájmového genomu (Olson et al., 1989). Jedná se o markery, které označují primery odvozené z koncové sekvence RFLP sondy, které jsou vázány na konkrétní znak. Velikost je mezi 18 až 24 bp. Amplifikace je realizována pomocí dvou specifických primerů, které ohraničují sekvenci zájmu, která je poté pomocí PCR amplifikována. Vizualizace probíhá pomocí elektroforetické separace (Thomas a Scott 1993).

3.4.1.2 SNP (Single-Nucleotide Polymorphism)

Metoda, schopna rozlišit dvě různé alely, lišící se pouze v jednom nukleotidu – bodové mutace. Užívá se zde specifických primerů, plně komplementárních k požadované sekvenci (Reed a Wittwer 2004). V posledních letech je tato metoda využívána ke studiu pšenice seté.

3.4.2 Využití DNA markerů ve šlechtění

Šlechtění rostlin je v celosvětovém měřítku jednou z neúspěšnějších technologií, které byly vyvinuty v moderním zemědělství. Metody vyvinuty pro šlechtění rostlin jsou oportunistické a adaptibilní. Jsou využívány v širokém měřítku pro vývoj nových produktů, které jsou žádoucí pro zemědělskou i zahradnickou praxi. DNA markery se zde staly nezbytným nástrojem, pro svou efektivnost, přesnost a vysokou produktivitu výsledků a jejich využití se značně liší v závislosti na typu plodiny a determinaci studovaného parametru (Xu a Crouch 2008). Využívají se také k fylogenetickým studiím, genetickému mapování, charakterizaci a identifikaci jednotlivých odrůd či zemědělských plodin. Nesporný význam mají taky pro detekci genů důležitých pro kvalitu obilovin a určování vhodnosti využití. Dále jsou využívány pro určování polymorfizmu mezi druhy nebo i v rámci druhů. Zde je pozorována variabilita mezi testovanými vzorky DNA (Phillips a Vasil 2001). Markery se ve velkém využívají také k sestavování map, jak genetických, tak fyzických, k detekci QTLs (Quantitative Trait Loci = lokusy kvantitativních znaků) a také MAS (Marker Assisted Selection = markery asistovaná selekce). Mingeot a Jacquemin (1999) použili metodu RFLP k mapování polymorfismů u sto šedesáti lokusů pro populaci pšenice v rámci ITMI (International *Triticeae* Mapping Initiative). Shah et al. (2000) zase

srovnávali účinnost RFLP a PCR markerů pro detekci jednotlivých odrůd pšenice, kdy přišli k závěru, že PCR markery jsou vhodné pro detekci polymorfismů na jednotlivých chromozomech. Metodu RFLP zde doporučují používat, pokud se snažíme obecně odlišit jednotlivé odrůdy.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Experimentální materiál

Pro experiment byl poskytnut rostlinný materiál ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž s. r. o. Jako pozitivní kontroly pro jednotlivé alely Glu-3 3 byly použity odrůdy Chinese Spring (*Glu-A3a*), Gabo (*Glu-A3b*), Gawain (*Glu-A3c*), Abbodanza (*Glu-A3d*), Liocorno (*Glu-A3e*), Apostle (*Glu-A3f*) a Glenlea (*Glu-A3g*), které poskytla Genová banka Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze -Ruzyni. Použito bylo 18 vzorků pšenice s nestandardním zbarvením obilky, které jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled analyzovaných genotypů *Triticum aestivum* L.

Název	Barva obilky
V1-104-15	modrá
V1-106-15	modrá
V1-107-15	modrá
V1-103-15	modrá
V1-114-15	modrá
V1-116-15	modrá
V1-117-15	modrá
V2-88-15	modrá
KM 53-14*)	modrá
V1-126-15	modrá
V1-127-15	modrá
V1-129-15	modrá
Skorpion	modrá
V1-141-15	modrá
V1-180-15	žlutá
Bona Vita	žlutá
Citrus	žlutá
Matchball**)	červená

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

4.2 Metodika

Vlastní molekulárně biologické analýzy tvořily tyto kroky:

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

4.2.1 Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA

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

Pomocí přístroje Picodrop Spectrometr (Picodrop) bylo provedeno měření koncentrace extrahované DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) a zároveň také její čistota. Po vyhodnocení bylo usouzeno, že naměřené hodnoty byly dostatečné pro provedení analýz.

4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR

Pro detekci alel na lokusu *Glu-A3* jsme použili alelově specifické STS markery, založené na jednonukleotidových polymorfizmech, které byly navrženy podle Wang et al. (2010). Primery, které jsme použily při analýze, jsou uvedeny v tabulce 6. K identifikaci alel na lokusech *Pina* a *Pinb*, které mají kodominantní charakter a kódují geny tvrdosti obilky (*puroindolin a*, *puroindolin b*) jsme použili specifické STS markery podle Huang & Brûlé-Babel (2011) (tabulka 7). K identifikaci nulových alel pro *Waxy* geny pšenice jsme použili specifické primery podle Vanzetti et al. (2009) (tabulka 8).

Reakční směs pro PCR jsme připravili postupným přidáváním jednotlivých chemikálií do mikrozkušavky podle protokolu (tabulka 9). Vzniklý mastermix jsme po té rozpipetovali do mikrozkušavek pro PCR vždy po $24\ \mu\text{l}$ a následně jsme přidali $1\ \mu\text{l}$ předem vyizolované templátové DNA daného genotypu. Po pečlivém uzavření

mikrozkumavek jsme takto připravené směsi vložili do jamek termocyklieru T3 (Biometra), kde byl přednastaven program s příslušným teplotním a časovým profilem:

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

Tabulka 6: *Glu-A3* alelově specifické PCR markery (Wang et al., 2010)

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

Tabulka 7: Primery a velikost jejich produktů pro analýzu lokusu *Pina* a *Pinb* (Huang & Brûlé, 2011)

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

Tabulka 8: Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu *Waxy* genů (Vanzetti et al., 2009)

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

Tab. 9 Složení mastermixu (složení pro jednu reakci)

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

4.2.3 Příprava agarózového gelu

Separace na gelu je založena na principu rozdělování molekul podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli na základě molekulové hmotnosti separované látky. Analýzy alelových variant *Glu-A3*, *Pina/b* a nulových alel *Waxy* genů byly provedeny na 1% agarózovém gelu, připraveném podle následujícího postupu: 1891 ml destilované vody bylo smícháno s 38 ml 50x TAE pufru (trisacetátový pufr). Z roztoku bylo odliho 270 ml do lahve a přidáno 2,8 g agarózy odvážené na analytických vahách. Vzniklá směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě až k varu. Mezitím byla sestavena vanička pro nalévání gelu, společně s hřebenem, sloužícím ke tvorbě jamek pro vzorky DNA. Po povaření agarózy s roztokem pufru a následném zchlazení byly přidány 2 μl ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl přelit do sestavené vaničky a po odstranění bublin cca 20 minut tuhnul v digestoři. Po vyjmutí hřebenu ze ztuhlého gelu byla vanička přenesena do elektroforetické vany a zalita zbytkem naředěného TAE pufru. Gel byl připraven pro nanášení vzorků. Jednotlivé složky pro přípravu gelu jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: Komponenty pro přípravu 1% agarózového gelu

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

4.2.4 Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR

Separace PCR produktů jsme provedli na horizontální elektroforéze v systému Agagel Maxi (Biometra, GE). Amplifikované vzorky jsme rozpipetovali po 20 μl

do gelu, zalitého pufrem. Po té jsme elektroforetickou vanu zakryli bezpečnostním krytem a aparaturu jsme připojili ke zdroji stejnosměrného napětí Minicell Power Pack P20 od firmy Biometra. Následná separace probíhala při napětí 70 – 80 V, po dobu jedné až dvou hodin.

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

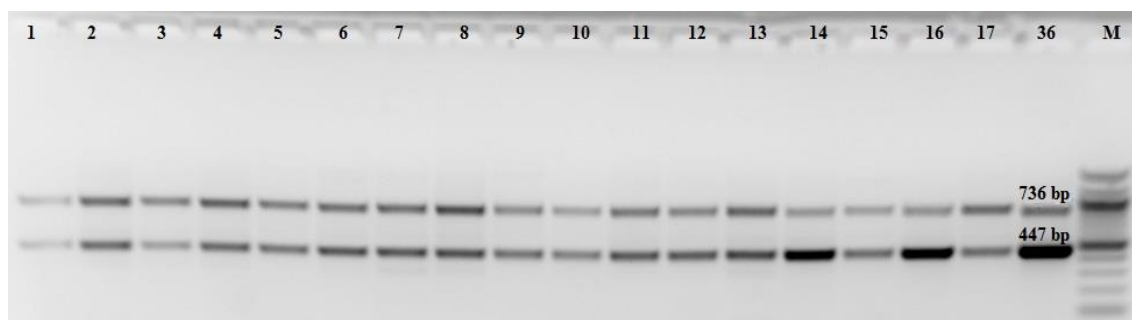
4.2.5 Vyhodnocení výsledků

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

5 VÝSLEDKY

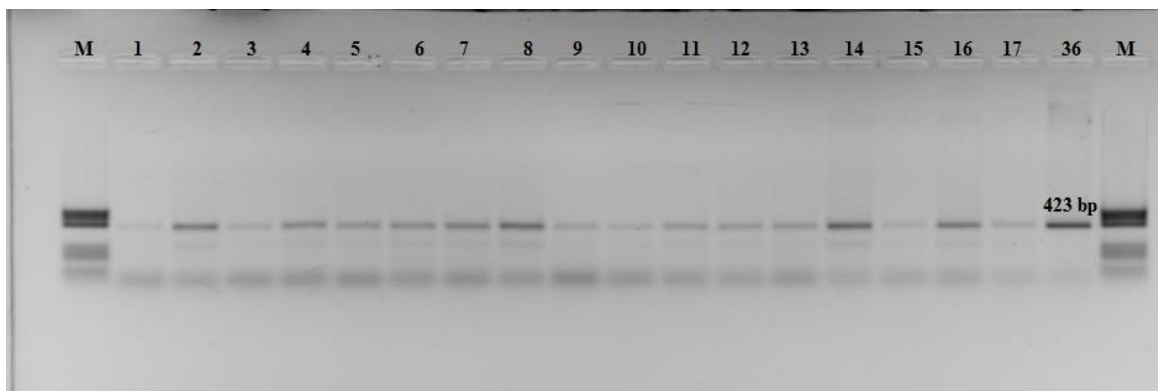
5.1 Markery tvrdosti obilky

Pro analýzu alelického složení lokusů *Pina-D1* a *Pinb-D1* bylo využito 9 STS primerů pro *Pina*, a čtyři kombinace primerů pro *Pinb*, které jsou detailně popsány v práci Huang a Brulé-Babel (2011). Analyzováno bylo 18 genotypů, které jsou uvedeny v tabulce 5. V případě *Pina* jsme detekovali dvě alely pro každý genotyp - *Pina-D1a* a *b*, a to u všech vzorků (obrázek 7). U *Pinb-D1* jsme analyzovali 4 alely, *Pinb-D1a/b/c* a *d*. Alela *Pinb-D1a* byla nejčetnější alelou (100% výskyt). Vzorky Skorpion, V1 141 15 a Matchball vykazaly přítomnost specifických produktů u 3 různých alel (*Pinb-D1 a/c* a *d*). Na obrázku 8 si můžeme prohlédnout detekovanou alelu *Pinb-D1d*. Ve více jak polovině případů (55,5 %) byly detekovány specifické produkty dvou různých alel (*Pinb-D1 a/c*). Alela *Pinb-D1b* nebyla detekována. V tabulce 11 můžeme vidět výsledné alely u všech testovaných vzorků.



Obrázek 7: Alely *Pina-D1a* a *Pina-D1b*

Vysvětlivky: 1 - V1-104-15, 2 - V1-106-15, 3 - V1-107-15, 4 - V1-103-15, 5 - V1-114-15, 6 - V1-116-15, 7 - V1-117-15, 8 - V2-88-15, 9 - KM 53-14, 10 - V1-126-15, 11 - V1-127-15, 12 - V1-129-15, 13 – Skorpion, 14 - V1-141-15, 15 - V1-180-15, 16 - Bona Vita, 17 – Citrus, 36 – Matchball, M – velikostní marker



Obrázek 8: Alely *Pinb-D1d*

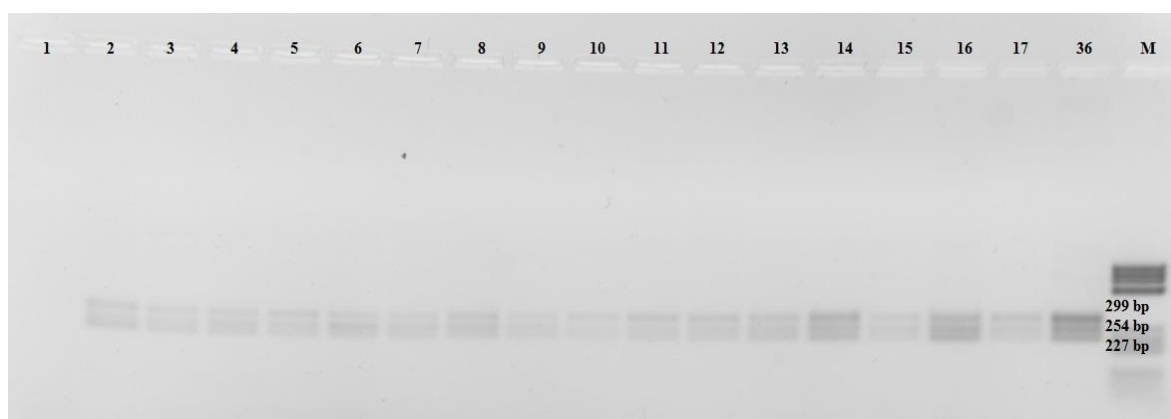
Vysvětlivky: 1 - V1-104-15, 2 - V1-106-15, 3 - V1-107-15, 4 - V1-103-15, 5 - V1-114-15, 6 - V1-116-15, 7 - V1-117-15, 8 - V2-88-15, 9 - KM 53-14, 10 - V1-126-15, 11 - V1-127-15, 12 - V1-129-15, 13 – Skorpion, 14 - V1-141-15, 15 - V1-180-15, 16 - Bona Vita, 17 – Citrus, 36 – Matchball, M – velikostní marker

Tabulka 11: Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro *Pin a* a *Pinb*

Genotyp	Barva obilky	Alelická skladba	
		<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
V1-104-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a</i>
V1-106-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-107-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-103-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-114-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-116-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-117-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V2-88-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
KM 53-14	modrá	<i>a/b</i>	<i>a</i>
V1-126-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a</i>
V1-127-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
V1-129-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
Skorpion	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>
V1-141-15	modrá	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>
V1-180-15	žlutá	<i>a/b</i>	<i>a</i>
Bona Vita	žlutá	<i>a/b</i>	<i>a/c</i>
Citrus	žlutá	<i>a/b</i>	<i>a</i>
Matchball	červená	<i>a/b</i>	<i>a/c/d</i>

5.2 Detekce nulových alel *Waxy* genů

Analýze bylo opět podrobena 18 genotypů (tabulka 5) pomocí primerů navržených podle McLauchlan (2001). Výsledky detekovaných alel jsou uvedeny na obrázku 9. Mezi testovanými genotypy se podařilo detekovat u linie V1-104-15 sestavu všech tří nulových alel pro všechny tři genomy u hexaploidní pšenice. Tento výsledek je poměrně významný a neočekávaný.



Obrázek 9: PCR produkty *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1*.

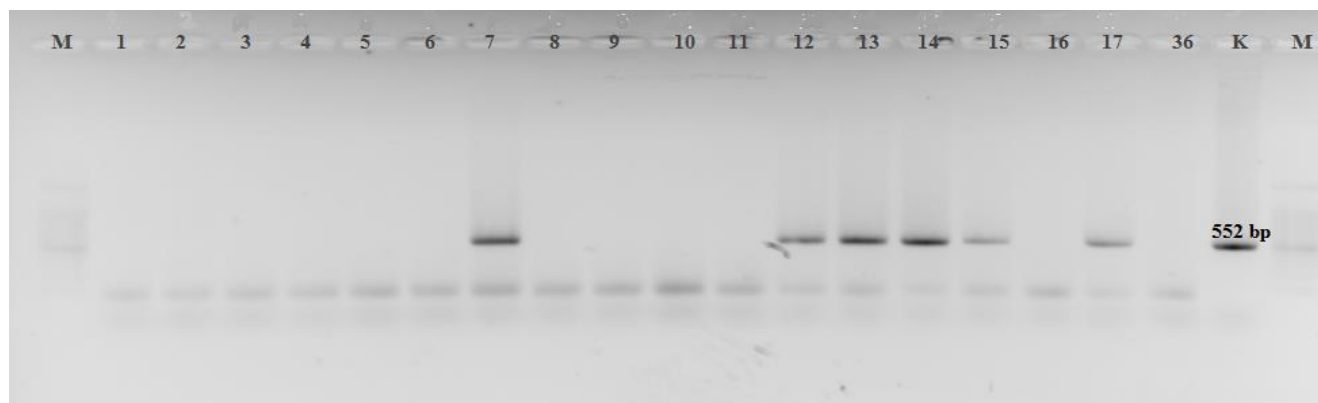
Vysvětlivky: 1 - V1-104-15, 2 - V1-106-15, 3 - V1-107-15, 4 - V1-103-15, 5 - V1-114-15, 6 - V1-116-15, 7 - V1-117-15, 8 - V2-88-15, 9 - KM 53-14, 10 - V1-126-15, 11 - V1-127-15, 12 - V1-129-15, 13 – Skorpion, 14 - V1-141-15, 15 - V1-180-15, 16 - Bona Vita, 17 – Citrus, 36 – Matchball, M – velikostní marker

5.3 Analýza lokusu *Glu-A3*

Výsledky analýzy osmnácti genotypů (tabulka 5) jsou shrnuty v tabulce 12. Nejčastěji se vyskytovala varianta *Glu-A3d* (100 % případů). Spolu s alelou *d* se vyskytovala v některých případech alela *f* ($Glu-A3df = 33\%$). Její detekci lze pozorovat na obrázku 11. Ostatní varianty testovaných alel (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3c*, *Glu-A3e*, *Glu-A3g*) nebyly v hodnoceném souboru detekovány.

Tabulka 12: Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Glu-A3

Genotyp	Barva obilky	Glu-A3
V1-104-15	modrá	<i>d</i>
V1-106-15	modrá	<i>d</i>
V1-107-15	modrá	<i>d</i>
V1-103-15	modrá	<i>d</i>
V1-114-15	modrá	<i>d</i>
V1-116-15	modrá	<i>d</i>
V1-117-15	modrá	<i>d/f</i>
V2-88-15	modrá	<i>d</i>
KM 53-14	modrá	<i>d</i>
V1-126-15	modrá	<i>d</i>
V1-127-15	modrá	<i>d</i>
V1-129-15	modrá	<i>d/f</i>
Skorpion	modrá	<i>d/f</i>
V1-141-15	modrá	<i>d/f</i>
V1-180-15	žlutá	<i>d/f</i>
Bona Vita	žlutá	<i>d</i>
Citrus	žlutá	<i>d/f</i>
Matchball	červená	<i>d</i>



Obr. 11: PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3f.

Vysvětlivky: 1 - V1-104-15, 2 - V1-106-15, 3 - V1-107-15, 4 - V1-103-15, 5 - V1-114-15, 6 - V1-116-15, 7 - V1-117-15, 8 - V2-88-15, 9 - KM 53-14, 10 - V1-126-15, 11 - V1-127-15, 12 - V1-129-15, 13 - Skorpion, 14 - V1-141-15, 15 - V1-180-15, 16 - Bona Vita, 17 - Citrus, 36 - Matchball, K - Apostle, M - velikostní marker

6 DISKUZE

6.1 Tvrdost obilky

Tvrdost obilky zrna pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) je významným znakem v zemích západní Evropy a v Americe, kde je mu věnována větší pozornost než u nás, kde technologická jakost zrna je hodnocena souborem jiných ukazatelů. V České republice není tvrdost zrna určujícím parametrem, který by byl zohledňován při výkupu zrna v příslušné platné normě pro potravinářskou pšenici ČSN 46 1100-2 z roku 2001. Tvrdost zrna obilky je významná vlastnost, která má vztah ke kvalitě mletí a potažmo i k dalšímu zpracování suroviny na různé potravinářské výrobky (chleba, sušenky, nudle, a podobně). Mouka z „tvrdé“ pšenice je více vhodná pro pečení chleba, mouka z „měkké“ pšenice je používána spíše pro výrobu sušenek a drobného pečiva (Chen et al. 2007; Morris 2002).

I tak jednotlivé technologie zpracování vyžadují kromě specifické tvrdosti zrna také specifické složení zrna, většinou předepsaný obsah bílkovin konkrétních kvalitativních ukazatelů. Tvrdost zrna ovlivňují molekuly puroindolinu, které se váží na škrobové granule endospermu obilky. Tento fakt je základem odlišné tvrdosti zrna. Podle Gaines et al. (2000) mají „měkké“ pšenice vysoký obsah amylózy ve vazbě s tuky a malý obsah škrobu. Struktura endospermu může mít na základě fenotypu sklovitá, nebo moučná. Moučný endosperm obsahuje více škrobu a méně proteinů v porovnání se sklovitým endospermem. Tvrdost zrna je blízce spojena se sklovitým endospermem. Materiál označovaný jako „tvrdý“ je definován jako více rezistentní k cizorodým patogenům (Psota et al. 2008). Tvrdost zrna je determinována výhradně genetickými faktory (Turnbull a Rahman 2002).

Tvrdost zrna ovlivňuje výrazně *Ha* lokus na chromosomu 5D, který je tvořen třemi úzce spjatými geny *Gsp-1*, *Pina* a *Pinb*. Pšenice má dva typy proteinů: puroindolin a (*Pina*) a puroindolin b (*Pinb*) (Chen et al. 2007). Tvrdost zrna je významně ovlivněna právě přítomností či absencí genů *Pina* a *Pinb*, které ovlivňují strukturu proteinů v pšeničném zrně. *Pina-D1* a *Pinb-D1* byly lokalizovány v distální oblasti chromozomu 5D (Turner et al. 2003). Všechny odrůdy „tvrdých“ pšenic mají sekvenční mutaci na jednom z těchto genů, což má za následek změnu tvrdosti. V současné době je známo devět alel pro *Pina* a sedmnáct alel pro *Pinb*. Velké množství nově identifikovaných

alel bylo pozorováno u čínských krajových odrůd. V Evropě a Severní Americe byly popsány *Pina* a *Pinb* alely u tvrdých pšenic (*Pina-D1b*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c*, *Pinb-D1d*) (Morris et al. 2001). Je známo mnoho metod pro stanovení jednonukleotidového polymorfizmu (SNP). Většina je založena na ligaci oligonukleotidu a vytvoření primeru specifického pro danou alelu (Huang & Brûlé-Babel, 2011).

Identifikovány byly dvě alely lokusu *Pina-D1*. *Pina-D1a*, která se obvykle vyskytuje v planých formách pšenice a *Pina-D1b*, jejíž nulová forma (nepřítomnost alely) prezentuje genotypy s tvrdou obilkou. Dále byly detekovány 3 alely lokusu *Pinb-D*, v alelických formách *Pinb-D1a*, *Pinb-D1c* a *Pinb-D1d*. Jedná se zde o tzv. SNP (single nucleotide polymorphism), tedy alely lišící se pouze v jednom nukleotidu. Podle Tranquilli et al. (2002) mutace v lokusu *Pina-D1* a *Pinb-D1* jsou spojovány s „hardness“ odrůdami, avšak není známo, zda mutace v obou lokusech nám tvrdost zvyšují, nebo snižují. Námi analyzovaný soubor je možné zařadit mezi pšenice s tvrdým zrnem „hardness“ neboť právě alely *Pina-D1b*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* a *Pinb-D1d* jsou zde přítomny a jsou podle Morris et al. (2001) a Huang a Röder (2005) hlavními alelami detekovanými u „hardness“ evropských a severoamerických odrůd.

6.2 Waxy geny

Škrob zaujímá v obilce 65 – 75 % suché váhy, proto se spolu se zásobními proteiny také nejvýznamněji podílí na kvalitě endospermu (Khaniani et al. 2012). Stejně tomu je tak i u pšeničné mouky, kde obsah škrobu a jeho chemické složení ovlivňuje kvalitu konečných produktů z pšenice. Škrob je polymer složený ze dvou polysacharidů: amylozy a amylopektinu (Vanzetti et al. 2009), které se od sebe liší strukturou. Amylóza má lineární nerozvětvenou strukturu molekul, a amylopektin má rozvětvenou strukturu molekul.

Biosyntéza amylozy je regulována enzymem GBSS (granule-bound starch synthase), jedná se o syntázu, nebo také jinak „voskový protein“. U hexaploidní pšenice je tento enzym umístěn na třech homologních *Waxy* genech, lokalizovaných na krátkém rameni chromozomů 7A (*Wx-A1*), 7D (*Wx-D1*) a na dlouhém rameni chromozomu 4A (*Wx-B1*), kam byl translokován z krátkého ramene 7B (Chao et al. 1989; Yamamori a Quinh 2000). Produkty těchto genů, „voskové proteiny“ mají nepatrně rozdílnou molekulární hmotnost. Od 59 po 60 kDa (Maryami et al. 2014).

Pokud je aspoň jeden ze tří GBSS alel funkční, pšenice se nazývá „částečně vosková“, pokud však jsou všechny tři alely nefunkční (nulové), hovoříme o „voskovém“ genotypu, takový škrob je potom složen z amylopektinu a nepatrného množství amylozy (Ma et al. 2013). Voskové, či částečně voskové genotypy se využívají na asijském trhu, například pro výrobu nudlí „udon“ a „ramen“ (Epstein et al. 2002), nebo nachází využití při produkci modifikovaných potravinářských škrobů, a také lze díky nim prodloužit trvanlivost pečiva (Lee et al. 2001). Nejmarkantnější podíl na obsahu a kvalitě amylozy byl pozorován u mutantů *Wx-B1*, potom *Wx-D1* a *Wx-A1* (Yamamori a Quynh 2000). Obsah amylozy má přímý efekt na kvalitu asijských nudlí a výběr linií s výrazně nižší hladinou amylozy v obilce je hlavním cílem šlechtitelských programů v Japonsku (Saito et al 2010).

V našem souboru hodnocených vzorků byl popsán jeden genotyp (V1-104-15) s trojicí výše zmíněných alel, který lze proto charakterizovat jako „plně voskový“ genotyp, u kterého lze předpokládat velmi výrazně nízký výskyt amylozy, případně zcela bez výskytu amylozy. Toto ale bude potřeba ještě prověřit laboratorními rozbory. Právě naše výsledky vedly k rozšíření spekter analýz u tohoto šlechtitelského materiálu.

6.3 Lokus *Glu-A3*

Další významnou složkou zrna jsou zásobní bílkoviny, které lze rozdělit do dvou základních složek. Gliadinů a gluteninů. Ty jsou základními složkami lepku (Branlard et al. 2003). Gluteniny dále dělíme podle pohyblivosti v SDS-PAGE (dodecylsírán sodný – polyakrylamidový gel) během elektroforézy na vysokomolekulární (HMW-GS) a nízkomolekulární (LMW-GS) podjednotky. HMW-GS a LMW-GS tvoří různé alelické kombinace podjednotek s rozdílnou pohyblivostí, které jsou podmíněny alelami ve velmi silné genetické vazbě, takže charakteristické podjednotky se vyskytují společně a odrážejí vazbu mezi alelami. To umožňuje relativně snadnou detekci alelických kombinací v porovnání s příslušnými etalony jednotlivých podjednotek. Výskyt jednotlivých gluteninových alel má přímý vliv na technologickou kvalitu pšenice, zejména toto má uplatnění v pekárenství (Bradová a Štočková 2010).

HMW a LMW gluteniny mají na rozdíl od prolaminů relativně vyšší zastoupení aminokyselin obsahujících síru. Zvláště pak kovalentní disulfidové vazby mezi cysteinovými zbytky velmi přispívají k tvorbě složitých propojení bílkovinných vláken

mezi sebou, a to i v průběhu zpracování těsta, takže výsledkem jsou složité sekundární, terciální a kvarterní bílkovinné polymerní struktury, schopné vytvářet stabilní kostru budoucího pekařského výrobku. Při kontaktu s vodou gluteniny spolu s gliadiny a prolaminy tvoří lepek. Díky jedinečnému aminokyselinovému složení bílkovin v lepku a jejich struktuře získáváme jedinečné vlastnosti lepky a potažmo i těsta, které má charakteristickou tažnost a pružnost. HMW-GS jsou zastoupeny přibližně 10 % z celkového množství zásobních proteinů. LMW-GS tvoří asi 1/3 z celkového množství zásobních proteinů. LMW-GS jsou umístěny na *Glu-3* lokusu, na krátkých ramenech chromozomů 1A, 1B, a 1D.

Alelické kombinace gluteninových podjednotek mají pak přímý vliv na technologickou kvalitu pšenice (Branlard et al., 2001). Doposud bylo identifikováno dvacet různých alel pro tyto proteiny. Pro lokus *Glu-A3* jich je sedm (*a, b, c, d, e, f, g*), devět pro *Glu-B3* (*a, b, c, d, e, f, g, h, i*) a pro lokus *Glu-D3* jich máme pět (*a, b, c, d, e*).

Ve všech vzorcích v hodnocené kolekci se vyskytovala alela *Glu-D3d*, v šesti případech (V1-117-15, V1-129-15, Skorpion, V1-141-15, V1-180-15 a Citrus) byla také detekována alela *Glu-D3f*. Zhang et al. (2012) uvádí, že přítomnost alel *Glu-A3a, A3c, A3d* a *A3f* má pozitivní vliv na odpor a tažnost těsta. Takže můžeme konstatovat, že naše vzorky mají určitý potenciál pekařské kvality. Přestože porosty pšenice, z kterých byly odebrány vzorky zrna pro analýzy, byly fenotypově homogenní, a tedy byly pokládány za homozygoty, analýzy prokázaly u šesti vzorků heterozygotní povahu, což prozradil výskyt více typů některých gluteninových alel ve vzorku. U těchto vzorků by bylo vhodné provést doplňující analýzy a potvrzení heterozygotního stavu nebo případného výskytu příměsí. Toto by bylo důležité zvláště u perspektivních vzorků, které by postupovaly do dalšího zkoušení.

7 DOPLŇUJÍCÍ INFORMACE

7.1 Pěstované genotypy - polní podmínky

Analyzovaný materiál pochází z roku sklizně 2016. Tento materiál byl vyprodukován konvenční technologií na parcelách velkých 10 m², vždy ve 4 opakováních. V tabulce 13 jsou uvedeny výnosy hodnocených linií a vybrané parametry jakosti zrna. Hodnocené genotypy jsou v tabulce rozloženy podle barvy obilky. Jednotlivé skupiny vykazují významné rozdíly ve výnosech. Známa komerční varieta Matchball s červeným (standardním) zbarvením obilky a výnosem 12,01 t/ha byla použita jako kontrola. Průměrný výnos odrůd se žlutým endospermem byl 9,75 t/ha a nejnižší průměrný výnos byl zaznamenán u genotypů s modrým zbarvením obilky (8.77 ± 1.14 t/ha). Podle Martinek et al. (2014) šlechtěné linie s vysokým obsahem antokyanů, vykazují nižší výnos oproti komerčně pěstovaným odrůdám, jelikož geny, spojeny s barvou obilky jsou podmíněny přítomností negativně působících genů na stejném přeneseném chromozomovém segmentu z planého druhu. Tento nepříznivý fakt je podle Garg et al. (2016) kompenzován vyšší cenou finálních produktů. Věříme, že zpětným křížením s vysoko výnosovými odrůdami lze do budoucna dramaticky navýšit výnosy i u barevných pšenic, tak aby byly zajímavé pro běžné pěstitele a cena konečných výrobků tak byla srovnatelná s běžně dostupnými produkty.

7.2 Charakteristika vegetačního roku 2015/2016

V tabulce 13 jsou uvedeny charakteristiky, které jsou významně ovlivněny vnějším prostředím, tzn. průběhem počasí. Proto v rámci doplňujících informací uvádím i charakteristiku vegetačního období 2015/2016, které poskytl Ing. Petr Martinek, CSc. (Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž).

Vegetační rok 2015/2016 patřil mezi ročníky silně teplé a srážkově normální s průměrnou, různě velkou kladnou odchylkou teplot, výjimku tvořil pouze říjen s odchylkou -0,2 °C. Byl velmi nevyrovnaný průběh počasí. Celkový ročníkový úhrn srážek dosáhl v Kroměříži 93 % dlouhodobého úhrnu, podobně jako předcházející ročník 2014/2015.

Během podzimních měsíců a prosince se prohluboval srážkový deficit z předcházejícího ročníku. Po srážkově normálním lednu následoval mimořádně vlhký

měsíc únor, kdy v Kroměříži spadlo 263 % dlouhodobého úhrnu srážek. Březen patřil opět k měsícům srážkově normálním, i když se během tohoto období vyskytlo 20 bezesrážkových dnů. Vyšší úhrny srážek byly zaznamenány v první polovině dubna, měsíc se tak zařadil mezi silně vlhké. Suché měsíce květen a červen 2016, kdy spadlo v průměru 60 % dlouhodobého úhrnu srážek, vystřídal vlhký červenec. Vysoký úhrn srážek byl zaznamenán při bouřkách s přivalovými srážkami 2. a 12. 7. (18,4 mm a 26,3 mm) a především v samotném závěru měsíce, kdy meteorologická stanice v Kroměříži naměřila během 24 hodin 52,5 mm. Srpnové srážky padaly většinou v první polovině měsíce, druhá polovina byla na srážky skoupá a celkově pak patřil srpen 2016 k měsícům suchým.

Zima 2015/2016 podobně jako v předcházejících ročnících byla letošní zima velmi mírná a nepoškodila porosty ozimů. Největší mrazy letošní zimy zaregistrovala meteorologická stanice v Kroměříži v období od samotného závěru roku 2015 do 6. ledna 2016. V této době však ležela na zemi sněhová pokrývka s maximální výškou do 5 cm. Druhá vlna mrazů se vyskytla od 17. do 24. ledna a poslední vlnu slabších mrazů letošní zimy jsme zaregistrovali od 25. do 27. února. Po silně teplém listopadu a prosinci, teplotně normálním lednu a po podnormálních srážkách z předcházejících měsíců jsme zaznamenali mimořádně teplý a také mimořádně vlhký měsíc únor, který měl příznivý vliv na stav ozimů. Tento měsíc měl z celého ročníku nejvyšší odchylku od dlouhodobého průměru + 4,5 °C.

Nástup velkého vegetačního období s průměrnými denními teplotami nad 5 °C se oproti předcházejícím dvěma rokům posunul k normálu a byl zaznamenán v Kroměříži 25. března 2016. Koncem března a počátkem dubna panovalo velmi teplé počasí, kdy maximální teploty překračovaly i hranici 20 °C a obilniny začaly v tomto období sloupkovat. Během třetí dubnové dekády se ochladilo a byly zaznamenány i silnější mrazy, které poškodily především kvetoucí stromy, polní plodiny však poškozeny nebyly. Jarní měsíce březen, duben a květen se zařadily v roce 2016 k teplotně normálním. V první polovině června převládalo počasí teplotně normální, k citelnému oteplení došlo ve třetí červnové dekádě, kdy se vyskytly i čtyři tropické dny a průměrná měsíční teplota převýšila dlouhodobý průměr o 2 °C. Červen 2016 patřil k měsícům teplým podobně jako následující červenec. V tomto prvním prázdninovém měsíci došlo v druhé dekádě k velkému teplotnímu zvratu počasí, kdy z tropických dnů s maximálními teplotami nad 30 °C klesla teplota o více jak 15 °C a průměrné denní

teploty klesly pod dlouhodobý průměr. Také v druhém prázdninovém měsíci srpnu se střídaly dny s podprůměrnými teplotami s těmi teplejšími. Celkově však nebyl zaznamenán během srpna žádný tropický den a měsíc se tak zařadil k teplotně normálním.

Tabulka 13: Výnosové a kvalitativní parametry vybraných genotypů pšenice s nestandardním zbarvením obilky.

	Genotyp	Výnos (t/ha)***)	Hmotnost tisíce semen (g)	Objemová hmotnost (kg/hl)	Obsah dusíku (N×5.7) v sušině (%)	Pádové číslo (s)	Zelenýho test (ml)	Gluten index (-)	
	V1-104-15	Ba	8.45 e-k	40.3	74.3	11.1	258	21	40
	V1-106-15	Ba	9.72 b-i	47.9	78.7	12.0	92	36	46
	V1-107-15	Ba	9.92 a-h	46.3	76.6	11.2	164	31	13
	V1-103-15	Ba	7.89 h-k	40.8	73.6	12.3	276	28	51
	V1-114-15	Ba	8.73 d-k	50.5	73.9	11.3	340	39	82
	V1-116-15	Ba	8.21 f-k	48.2	74.5	10.5	287	33	94
	V1-117-15	Ba	7.62 i-k	46.5	71.0	11.6	400	39	76
	V2-88-15	Ba	9.89 a-h	49.4	76.9	11.4	344	32	88
	KM 53-14*)	Ba	10.93 a-c	48.9	75.9	11.3	390	47	93
	V1-126-15	Ba	7.97 g-k	48.0	72.9	11.6	194	38	91
	V1-127-15	Ba	8.76 c-k	48.7	73.0	11.0	282	41	94
	V1-129-15	Ba	7.50 jk	51.8	75.0	11.3	288	36	92
	Skorpion	Ba	9.99 a-h	49.7	73.7	10.0	82	33	91
	V1-141-15	Ba	7.21 k	34.1	74.3	12.8	276	38	49
	průměr		8.77	46.5	74.6	11.4	262	35	71
	V1-180-15	Ye	10.31 a-f	39.8	77.3	11.7	349	46	96
	Bona Vita	Ye	9.27 c-k	38.1	78.3	15.4	274	70	60
	Citrus	Ye	9.66 b-j	43.1	77.4	10.8	219	21	96
	průměr		9.75	37.3	77.6	12.0	281	46	84
	Matchball**)	R	12.01 a	41.9	75.5	12.3	349	37	38

Vysvětlivky: Pp – purple pericarp, R – red caryopsis, Ye – yellow endosperm *) linie testované v oficiálních státních odrůdových zkouškách, **) komerční variety se standardním zbarvením obilky, ***) hodnoty uvedené ve sloupci se stejnými písmeny nejsou statisticky významně odlišné (LSD, $P < 0,05$)

8 ZÁVĚR

Studium pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) je jedno z témat 21. století, neboť se jedná o plodinu, která výživu lidstva provází od nepaměti, díky svým výživovým hodnotám a vysokým výnosům ze sklizně a v neposlední řadě pro její chuťové vjemy napříč téměř všemi kulturami na světě. Do popředí se dostávají nové trendy, v podobě pšenic s nestandardním zbarvením obilky. Jejich zajímavost tkví v látkách obsažených v obalových vrstvách obilky. Jedná se o antokyany, přírodní barviva fenolické povahy, které mají příznivý účinek na lidský organismus, zejména pro své antioxidační účinky. Díky těmto látkám, obsaženým v barevných pšenicích, by tato plodina mohla dostat většího věhlasu a více prostoru v už tak přehlaceném obchodním prostředí. V naší práci jsme se věnovali molekulárním analýzám, založeným na PCR. V kolekci osmnácti genotypů, poskytnutým z Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž s nestandardním zbarvením obilky, jsme detekovali parametry, určující kvalitu pšenice, pomocí různých genetických ukazatelů kvality.

Po izolaci a purifikaci DNA jsme přešli k analýze genu pro puroindolin, jako markeru tvrdosti zrna, který je jedním z hlavních ukazatelů pro dobrou mlynářskou kvalitu a potažmo i ukazatelem vhodnosti k dalšímu zpracování suroviny pro na různé pečivářské výrobky, jako například chleba, sušenky, nudle atd. Literatura uvádí, že tzv. „tvrdé“ (hardness) pšenice jsou vhodné pro pečení chleba, oproti tomu „měkké“ jsou využívány pro výrobu sušenek a drobného pečiva. Identifikovány byly dvě alely lokusu *Pina-D1*. *Pina-D1a*, která je obvykle přítomna v planých formách pšenice a *Pina-D1b*, kde nulová forma bývá spojována s tvrdou obilkou. Dále byly detekovány tři alely lokusu *Pinb-D*, v alelických formách *Pinb-D1a*, *Pinb-D1c* a *Pinb-D1d*. Podle literatury se námi testované genotypy skladbou alel řadí do tzv. „hardness“ evropských a severoamerických odrůd které, jak už bylo zmíněno, jsou vhodné k pečení chleba.

Dále jsme pokračovali analýzou *Waxy* genů, které se významnou měrou, spolu se zásobními proteiny, podílí na složení endospermu obilky. Tento fakt závažně ovlivňuje kvalitu konečných produktů z pšenice. My jsme detekovali jeden genotyp (V1-104-15) s trojicí nulových alel, u kterého lze předpokládat velmi výrazně nízký výskyt amyλόzy v endospermu. Toto ale bude potřeba ještě prověřit laboratorními rozbory.

Poslední částí našich analýz byl rozbor alel v lokusu *Glu-A3*, neboť geny tohoto lokusu kódují gluteniny a gliadiny, zásobní proteiny obilky, základní složky lepku. Výskyt jednotlivých gluteninových alel má přímý vliv na technologickou kvalitu pšenice, zejména v pekárenství. Ve všech vzorcích v hodnocené kolekci se vyskytovala alela *Glu-D3d*, v šesti případech (V1-117-15, V1-129-15, Skorpion, V1-141-15, V1-180-15 a Citrus) byla také detekována alela *Glu-D3f*. Zhang et al. (2012) uvádí, že přítomnost alel *Glu-A3a*, *A3c*, *A3d* a *A3f* má pozitivní vliv na odpor a tažnost těsta. Takže můžeme konstatovat, že naše vzorky mají určitý potenciál pekařské kvality. Přestože porosty pšenice, z kterých byly odebrány vzorky pro analýzy, byly fenotypově homogenní, a tedy byly pokládány za homozygoty, analýzy prokázaly u šesti vzorků heterozygotní povahu, což prozradil výskyt více typů některých gluteninových alel ve vzorku. U těchto vzorků by bylo vhodné provést doplňující analýzy a potvrzení heterozygotního stavu nebo případného výskytu příměsí. Toto by bylo důležité zvláště u perspektivních vzorků, které by postupovaly do dalších šlechtitelských programů.

Propojením analýz molekulární biologie, šlechtění rostlin a vhodné úpravy postupů od zemědělské praxe, po finální produkt je v blízké budoucnosti potenciál barevných pšenic rozvinout do mnohem širší roviny využití opravdu vysoký. Neboť se jedná o velké množství benefitů pro případného pravidelného konzumenta výrobků z barevné pšenice. Nakolik se jedná o benefity spojené s antioxidačním účinkem antokyanů, výhodami konzumace celozrnné mouky a v neposlední řadě mnohdy atraktivním a nevšedním vzezřením konečných produktů.

Vypracování této diplomové práce mi umožnilo osvojit si aplikaci metod molekulární biologie na Ústavu biologie rostlin, práci s veřejností při různých akcích týkajících se osvěty a problematiky barevných pšenic, nesmírné rozšíření obzorů a možnosti seznámení a konzultací s významnými odborníky i mimo území univerzity.

9 PREZENTACE VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE

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

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABDEL-AAL E. S., & HUCL P., 1999: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3): 350–354.
2. ARON P. M. & KENNEDY J. A., 2008: Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52: 79–104.
3. BARTL P., ALBRECHT A., SKRT M., TERMLOVÁ B., IŠŤÁDALOVÁ M., ŠMEJKAL K., ULRIH N. P., 2015: Anthocyanins in purple and blue wheat grains and in resulting bread: quantity, composition, and thermal stability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5): 514–519.
4. BLANDO F., CARMELA G., NICILETTI I., 2004: Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5): 253–258.
5. BOTH Z. & CHLOUPEK O., 2005: Seed vitality of wheat and bread making quality, s. 7. In: RYANT P., CERKAL R., STŘEDA T., VEJRAŽKA K. (eds): *MendelNet Agro 2005. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 22 s. ISBN 80-7157-905-X.
6. BRADOVÁ J. & ŠTOČKOVÁ L., 2010: Evaluation of winter wheat collection in terms of HMW-and LMW-glutenin subunits. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(Special Issue): 96–99.
7. BRANLARD G., DARDEVET M., SACCOMANO R., LAGOUTTE F. & GOURDON J., 2001: Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*, 119(1-2). 59–67. ISSN (electronic) 1573-5060.
8. BRANLARD G., DARDEVET M., AMIOUR N., IGREJAS G., 2003: Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(7): 669–679. ISSN (electronic) 1573-5109.

9. BUREŠOVÁ V., KOPECKÝ D., BARTOŠ J., MARTINEK P., WATANABE N., VYHNÁNEK T., DOLEŽEL J., 2015: Variation in genome composition of blue-aleurone wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(2): 273–282. ISSN 0040-5752
10. CARVER B. F., 2009: *Wheat: science and trade*. 1. vyd., Ames, Wiley-Blackwell, Iowa, 569 s. ISBN 13: 978-0-8138-2024-8/2009
11. CASTANEDA-OVANDO A., DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ M., PÁEZ-HERNÁNDEZ M. E., RODRIGUEZ J. A., GALÁN-VIDAL C.A., (2009): Chemical studies of anthocyanins: A review. *A Food Chemistry*, 113(4): 859–871.
12. DENDY D. A. V. & DOBRASZCYK B. J., 2001: *Cereals and cereal products*. Aspen Publishers, Gaithersburg, 429 s.
13. DEWANTO V., WU W., LIU R. H., 2002: Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 50(17): 4959–4964.
14. EPSTEIN J., MORRIS C. F., HUBER K. C., 2002: Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase (waxy) genes. *Journal of Cereal Science*, 35(1): 51–63.
15. ESLEY R. V., HELLENS R. P., PUTTERILL J., STENENSON D. E., KUTTY-AMMA S., ALLAN A. C., 2007: Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal*, 49(3): 414–427.
16. ESTOUP A., ROUSSER F., MICHALAKIS Y., COMUET J. M., ADRIAMANGA M., GUYOMANRD R., 1998: Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, 7(3): 339–353.
17. EVERS T. & MILLAR S., 2002: Cereal grain structure and development: some implications for quality, *Journal of Cereal Science*, 36(3): 261–284.

18. FALCONE FERREYRA M. L., RIUS S., CASATI P., 2012: Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(222): 1–15.
19. FIGUEIREDO P., ELHABIRI M., TOKI K., SAITO N., DANGLES O., BROUILLARD R., (1996): New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss?. *Phytochemistry*, 41(1): 301–308.
20. GAINES C. S., RAEKER M., Ö., TILLEY M., FINNEY P. L., WILSON J. D., BECHTEL D. B., MARTIN R. J., SEIB P. A., LOOKHART G. L., DONELSON T., 2000: Associations of starch gel hardness, granule size, waxy allelic expression, thermal pasting, milling quality, and kernel texture of 12 soft wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 77: 163–168.
21. GARG M., CHAWLA M., CHUNDURI V., KUMAR R., SHARMA S., SHARMA N. K., A SINGH S. P., 2016: Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *Journal of Cereal Science*, 71(6): 138–144.
22. GONCHAROV N. P., GOLOVNINA B., GLUSHKOV, BLINKOV A., SHUMNY V. K., 2008: Evolutionary history of wheats – the main cereal of mankind. *Biosphere Origin and Evolution*, 25(1): 407–419. ISSN 0172-6218.
23. GRAU J., STEINBACH G., VÁŇA J., 1998: *Trávy lipnicovitě, šáchorovitě, sítinovitě a rostliny podobné trávám Evropy*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub, 248 s.
24. GROS C., GAY G., PERRETANT M. R., GERVAIS L., BERNARD M., DEDRYVER F., CHARMET G., 2002: Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white× red grain bread-wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1): 39–47.
25. GUPTA P. K., VARSHNEY R. K., SHARMA P. C., RAMESH B., 1999: Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118(5): 369–390.

26. GUSTAFSON P., RASKINA O., MA X., NEVO E., 2009: Wheat Evolution, domestication, and Improvement in Wheat science and trade. *Willey*, Danvers, 5–30.
27. HIMI E., MARES D. J., YANAGISAWA A., NODA K., 2002: Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 53(374): 1569–1574.
28. HIMI E., NISAR A., NODA K., 2005: Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome*, 48(4): 747–754.
29. HRUŠKOVÁ M., ŠVEC I., JURINOVÁ I., TOMÁŠEK I., 2012: Hodnocení nových odrůd potravinářské pšenice se žlutým endospermem. *Mlynářské noviny XXIII*, 141(1): 4–6.
30. HUANG X Q. & RÖDER M. S., 2005: Development of SNP assays for genotyping of the puroindoline b gene for grain hardness in wheat using Pyrosequencing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 2070–2075.
31. HUANG X-Q & BRÛLÉ-BABEL A., 2011: Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 53(3): 277–284. ISSN (electronic) 1095-9963.
32. CHAO S., SHARP P. J., WORLAND A. J., WARHAM E. J., KOEBNER R. M. D., GALE M. D., 1989: RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 78(4): 495–504.
33. CHEN C. D., SLOANE J. A., LI H., AYTAN N., GIANNARIS E. L., ZELDICH E., HINMAN J. D., DEDEOGLU A., ROSENE D. L., BANSAL R., LUEBKE J., KURO-O M., ABRAHAM C. R., 2013: The anti-aging protein klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the central nervous system. *Journal of Neuroscience*, 33: 1927–1939.

34. CHEN F., ZHONGHU H., CHEN D., ZHANG C., ZHANG Y & XIA X., 2007: Influence of puroindoline allele on milling, steamed bread, noodles and pan bread in common spring wheat. *Journal Cereal Science*, 45(1): 59–66.
35. CHEN F., ZHONGHU H., CHEN D., ZHANG CH., ZHANG Y, XIA X., 2007: Influence of puroindoline allele on milling, steamed bread, noodles and pan bread in common spring wheat. *Cereal Science*, 45(5): 59–66.
36. CHLOUPEK, O., PROCHÁZKOVÁ, B., HRUDOVÁ, E., 2005. *Pěstování a kvalita rostlin*. 1. vyd., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 178 s.
37. JAAFAR S., SHARIFAH N., BARON J., SIEBENHANDL-EHN S., ROSENAU T., BOHMDORFER S., GRAUSGRUBER H., 2013: Increased anthocyanin content in purple pericarp × blue aleurone wheat crosses. *Plant Breeding*, 132(6): 546–552. ISSN 0179-9541.
38. JANEČKOVÁ M., HŘIVNA L., JŮZL, M., NEDOMOVÁ S., VYHNÁNEK T., TROJAN V., MRKVICOVÁ E., 2014: Possibilities of using purple wheat in producing bakery products. s. 413 – 417. In: POLÁK O., CERKAL R., ŠKARPA P., (eds): *MendelNet Agro 2014. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 615 s., ISBN 978-80-7509-174-1.
39. JIRSA O., POLIŠENSKÁ I., PALÍK S., 2011: Kvalita potravinářských obilovin. *Obilnářské listy*, 3(4): 53–58.
40. KARÁSEK F., MRKVICOVÁ E., ŠŤASTNÍK O., TROJAN V., VYHNÁNEK T., HŘIVNA T., HŘIVNA L., MRÁZKOVÁ E., 2014: The influence of colored wheat Konini feeding on antioxidant activity parameters in rats. s. 161 – 163. In: POLÁK O., CERKAL R., ŠKARPA P., (eds): *MendelNet Agro 2014. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 615 s., ISBN 978-80-7509-174-1.
41. KHANIANI B. H., DARVISH F., BIHAMTA M. R., HASSANI M. E., NAJAFIAN G., 2012: Identification of a null allele at the Wx-B1 locus in some

- of Iranian bread wheat genotypes. *Advances in Environmental Biology*, 6(10): 2586–2590.
42. KHLESTKINA E. K., 2013: Genes Determining the Coloration of Different Organs in Wheat. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3(1): 54–65. ISSN 2079-0597.
43. KNIEVEL D. C., ABDEL-AAL E. S. M., RABALSKI I., NAKAMURA T., HUCL P., 2009: Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of Cereal Sciences*, 50: 113–120.
44. KUCHEL H., LANGRIDGE P., MOSIONEK L., WILLIAMS K., JEFFERIES S. P., 2006: The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat. *Theoretical and Applied Genetic*, 118(8): 284–291.
45. LEE M. R., SWANSON B. G., BAIK B. K., 2001: Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78(6): 701–706.
46. LI J., WALKER C. E., FAUBION J. M., 2011: Acidulant and oven type affect total anthocyanin content of blue corn cookies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1): 38–43.
47. LI W. D., SUN S. C., REN G. X., 2004: Study on characteristic of black wheat and its exploitation and utilization. *China Condiment*, 1: 9–11.
48. LUO M. C., YANG Z. L., YOU F. M., KAWAHARA T., WAINES J. G., DVORAK J., 2007: The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics*, 114 (6): 947–959.
49. MA H., ZHANG X., WANG C., GAO D., ZHANG B., LV G., BIE T., 2013: Effect of wx genes on amylose content, physicochemical properties of wheat starch, and the suitability of waxy genotype for producing Chinese crisp sticks. *Journal of Cereal Science*, 58(1): 140–147.

50. MARAIS J. P. J., DEAVOURS B., DIXON R. A., FERREIRA D., 2006: The stereochemistry of flavonoids, ed. The science of flavonoids. *Springer*, 1–46.
51. MAREŠ J., BRABEC T., VYHNÁNEK T., TROJAN V., ŠTIASNÁ K., PRESINSZKÁ M., MRKVICOVÁ E., HŘIVNA L., HAVEL L., 2015: The effect of feeding wheat with purple pericarp on the growth of carp. *Potravinářstvo*, 141(1): 263–267.
52. MARTINEK P. & KADLÍKOVÁ M., 2011: Zamyšlení nad minulostí a budoucností pšenice. *Úroda*, 7(1): 4–9.
53. MARTINEK P., JIRSA O., VACULOVÁ K., CHRPOVÁ J., WATANABE N., BUREŠOVÁ V., TROJAN V., 2014: Use of wheat gene resources with different grain colour in breeding. s. 75–78. In: BRANDSTETTER A., GEPPNER M. (eds): *64. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, St. Pölten, 79 s. ISBN-13: 978-3-902849-00-7.
54. MARTINEK P., LACHMAN J., MRKVICOVÁ E., ANZENBACHEROVÁ E., KOBZOVÁ Š., 2016: Využití pšenice s odlišnou barvou zrna. *Úroda*. 7(1): 63–66. ISSN: 0139-6013.
55. MARYAMI Z., FAZELI A., MEHRABI A-A., 2014: Investigation of diversity of Waxy-A1 gene using amplification in different spices in A genome wheat's. *Advances in Environmental Biology*, 8(7): 2004–2007.
56. MCLAUHLAN A., OGBONNAYA, F. C., HOLLINGSWORTH B., CARTER M., GALE, K. R., HENRY R. J. & APPELS R., 2001: Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Australian Journal of Agriculture Research*, 52(12): 1409-1416. ISSN 0004–9409.
57. MIDELTON EJ., 1998: Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439(3): 175–182.

58. MINGEOT D. & JACQUEMIN J. M., 1999: Mapping of RFLP probes characterized for their polymorphism on wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1132–1137.
59. MORRIS C. F., 2002: Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology*, 48(6): 663–647.
60. MORRIS C. F., LILLEMO M., SIMEON G. M., 2001: Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Science*, (41)6: 218–228.
61. MORRIS C. F., LILLEMO M., SIMEONE M. C., GIROUX M. J., BABB S. L., KIDWELL K. K. 2001: Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Science*, 41(1): 218–228.
62. NESBITT M., 2001: Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence. *The Linnean*, 3(1): 37–59.
63. NIJVELDT R. J., VAN NOOD E. L. S., VAN HOORN D. E., BOELENS P. G., VAN NORREN K., VAN LEEUWEN P. A., 2001: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4): 418–425.
64. OLSON M., HOOD L., CANTOR C. & BOTSTEIN D., 1989: A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245(4925): 1434–1435. ISSN (electronic) 1095-9203.
65. PETR J., 2008: *Žito a triticales. Biologie pěstování, kvalita a využití*. Profi press, s.r.o., Praha, 192 s. ISBN 978-80-86726-29-8 (váz.)
66. PHILLIPS, R. L. & VASIL, I. K., 2001: *DNA-based markers in plants*. 2. vyd. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands, 497 s.
67. POMERANZ Y., 1973: Structure and mineral composition of cereal aleurone cells as shown by scanning electron microscopy. *Cereal Chemistry*, 50: 504–511.

68. POZNIAK C. J., KNOX R. E., CLARKE F. R., CLARKE J. M., 2007: Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(3): 525–538.
69. PSOTA V., VEJRAŽKA K., HARTMANN J., MUSILOVÁ M., 2008: Effect of the endosperm structure of barley caryopsis (*Hordeum vulgare L.*) on malt quality. *Kvasný průmysl*, 10(1): 294–299.
70. QIAGEN, 2012: *DNeasy Plant Handbook*. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>
71. QUALSET C. O., SOLIMAN K. M., DVORAK J. J. & VOGT H. E., 1983: Release of wheat germplasm: A blue aleurone translocation stock – UC66049, *Agronomy Progress*, 139(1): 1–8. ISSN 1052-6137.
72. RATHJEN J. R., STROUNINA E. V., MARES D. J., 2009: Water movement into dormant and non-dormant wheat (*Triticum aestivum*) grains. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1619–1631. ISSN (electronic) 1460-2431.
73. REED G. H. & WITTWER C. T., 2004: Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 50(10): 1748–1754.
74. RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., BOLWELL P. G., BRAMLEY P. M., PRIDHAM J. B., 1995: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4): 375–383.
75. SAITO M., VRINTEN P., NAKAMURA T., 2010: DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in wheat. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 44(2): 109–115.
76. SALZMAN Z. & KRAUS J., 2007: *Nový akademický slovník cizích slov, A-Ž*. Academia, Praha 880 s. ISBN: 978-80-200-1351-4.

77. SHAH M. M., YEN Y., GILL K. S., BAENZIGER P. S., 2000: Comparisons of RFLP and PCR-based markers to detected polymorphism between wheat cultivars. *Euphytica*, 114: 135–142.
78. ŠKORPÍK M. & ŠAŠEK A., 1980: Charakteristika vybraných linií barevné pšenice elektroforézou bílkovin. *Sborník ÚVTIZ Genetika a Šlechtění*, 16(3): 193–200. ISSN 0036-5378.
79. ŠPALDON E., 1982: *Rostlinná výroba*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 628 s.
80. THOMAS M. R. & SCOTT N. S., 1993: Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 86(8): 985–990.
81. TRANQUILLI G., HEATON J., CHICAIZA O., DUBCOVSKY J., 2002: Substitutions and Deletions of Genes Related to Grain Hardness in Wheat and Their Effect on Grain Texture. *Crop Science*, 42(6): 1812–1817.
82. TURNBULL K. M. & RAHMAN S., 2002: Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*, 36(3): 327–337.
83. TURNER M., MUKAI Y., LEROY P., CHAREF B., APPELS R., RAHMAN S., 2003: The Ha locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses. *Genome*, 42(6): 1242–1250.
84. VANHOLME R., DEMENDTS B., MORREEL K., RALPH J., BOERJAN W., 2010: Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153: 895–905.
85. VANZETTI L. S., PFLÜGER L. A., RODRÍGUEZ-QUIJANO M., CARRILLO J. M., HELGUERA M., 2009: Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(1): 4–5.
86. WANG L., LI G., PENA R. J., XIA X. & HE Z., 2010: Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 51(3): 305-312. ISSN (electronic) 1095-9963.

87. WHITE J. & COOKE R. J., 1992: A standard classification system for the identification of barley varieties by electrophoresis. *Seed Science Technology*, 20(1): 663–676.
88. WIESER H., 2006: Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 24: 115–119.
89. WU X. & PRIOR R. L., (2005): Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7): 2589–2599.
90. XU Y. & CROUCH J. H., 2008: Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science*, 48(2): 391–407.
91. YAMAMORI M. & QUYNH N. T., 2000: Differential effects of Wx-A1,-B1 and-D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1): 32–38.
92. ZEVEN A. C., 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56 (3): 243–258. ISSN 0014-2336.
93. ZHANG X., JIN H., LIU D., LI G., XIA X., HE Z., ZHANG A., 2012: Composition and functional analysis of low-molecular-weight gluten in alleles with Aroona near-isogenic lines of bread wheat. *BMC Plant Biology*, 12(1): 243–258.
94. ZHENG Q., LI B., MU S., ZHOU H. & LI Z., 2006: Physical mapping of the blue-grained gene(s) from *Thynopirum ponticum* by GISH and FISH in a set of translocation lines with different seed colors in wheat. *Genome*, 49(9): 1109–1114. ISSN (electronic) 1480-3321.
95. ZIMOLKA, J. et al. (ed.), 2000: *Speciální produkce rostlinná – Rostlinná výroba: (Polní a zahradní plodiny, základy pěstování)*. 1. vyd., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 245 s. ISBN 80-7157-451-1.

96. ZIMOLKA J., et al. (ed.) 2005: *Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna*, 1. Vyd., Profi press, s. r. o., Praha 5, 180 s. ISBN 80-86726-09-6.
97. ŽOFAJOVÁ A., PŠENÁKOVÁ I., HAVRLETOVÁ M., PILIAROVÁ M., 2012: Accumulation of total anthocyanins in wheat grain. *Agriculture*, 58(2): 50–56. ISSN 1338–4376.

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma evoluce pšenice

Obrázek 2: Struktura obilky

Obrázek 3: Pečivo upečené z purpurové pšenice PS Karkulka

Obrázek 4: Struktura hlavních tříd flavonoidů

Obrázek 5: Chemická struktura šesti nejběžněji se vyskytujících antokyanů

Obrázek 6: Zrno barevné pšenice

Obrázek 7: Alely Pina-D1a a Pina-D1b

Obrázek 8: Alely Pinb-D1d

Obrázek 9: PCR produkty Wx-A1, Wx-B1 a Wx-D1

Obrázek 10: PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3f

Obrázek 11: PCR produkty získané pomocí markeru Glu-A3f

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: *Průměrné zastoupení složek v sušině obilky T. aestivum L.*

Tabulka 2: *Průměrné složení frakcí bílkovin obilky T. aestivum L.*

Tabulka 3: *Hodnoty jakostních ukazatelů*

Tabulka 4: *Hlavní skupiny flavonoidů a jednotlivé sloučeniny*

Tabulka 5: *Přehled analyzovaných genotypů Triticum aestivum L.*

Tabulka 6: *Alelově specifické PCR markery pro identifikaci Glu-A3*

Tabulka 7: *Primery a velikost jejich produktů pro analýzu lokusu Pina a Pinb*

Tabulka 8: *Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu Waxy genů*

Tabulka 9: *Složení mastermixu (složení pro jedenu reakci)*

Tabulka 10: *Komponenty pro přípravu 1 % agarózového gelu*

Tabulka 11: *: Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Pina a Pinb*

Tabulka 12: *Seznam použitých genotypů pšenice a jejich alelická skladba pro Glu-A3*

Tabulka 13: *Výnosové a kvalitativní parametry vybraných genotypů pšenice s nestandardním zbarvením obilky*