VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV DUSÍKATÉHO HNOJENÍ A SUCHA NA OBSAH PROTEINŮ GLUTENINOVÉ FRAKCE U OZIMÉ PŠENICE

IMPACT OF NITROGEN FERTILIZATION AND DROUGHT ON GLUTENINS CONTENT IN WINTER WHEAT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Pavel Vostrejš

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

BRNO 2018

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1122/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student:	**Pavel Vostrejš**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Potravinářská chemie
Vedoucí práce:	**PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Akademický rok:	2017/18

Název bakalářské práce:

Vliv dusíkatého hnojení a sucha na obsah proteinů gluteninové frakce u ozimé pšenice

Zadání bakalářské práce:

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

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2018

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

Pavel Vostrejš student(ka)	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu
V Brně dne 31.1.2017		prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D. děkan

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl sledován vliv dusíkatého hnojení a sucha na obsah proteinů gluteninové frakce pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L.). Kultivar Tiguan pšenice ozimé byl pěstován jednak v podmínkách zamezujících přísunu přírodních srážek (DRY), jednak v podmínkách normálních přírodních srážek (WET). Polovina vzorků byla ošetřena dusíkatým hnojivem dávkou 140 kg/ha (N140), druhá polovina zůstala bez hnojení (N0). Po oddělení gliadinů byly gluteniny ze vzorků extrahovány 50% isopropanolem s 1% DTT. Jednotlivé gluteninové frakce byly separovány metodou SDS-PAGE a kvantifikovány počítačovou denzitometrií. Sucho nemělo statisticky významný vliv na obsah žádné z gluteninových podjednotek. Dusíkaté hnojení způsobilo zvýšení obsahu celkového množství gluteninů i množství jednotlivých podjednotek. Interakce ošetření vodního režimu a hnojení vedla u HMW 3 a LMW 5 GS ke snížení efektivity hnojení.

ABSTRACT

In this bachelor thesis, the effects of nitrogen fertilization and drought stress on glutenin fraction of winter wheat (Triticum aestitivum L.) were studied. Winter wheat cultivar Tiguan was grown under different rainfall mode, on the one hand in drought (DRY), on the other hand in normal downfall (WET). Part of the samples was treated with nitrogen fertilization at a dose of 140 kg / ha (N140), the other part remained without fertilization (N0). After the gliadins were separated, the glutenins from the samples were extracted with 50% isopropanol with 1% DTT. Individual glutenin fractions were separated by SDS-PAGE and quantified by computer densitometry. The drought did not have a statistically significant effect on any of the glutenin fractions. Nitrogen fertilization caused an increase in the total content of glutenin as well as the amount of individual fractions. Interaction of water treatment and fertilization has led to fertilizer use efficiency in HMW 3 GS and LMW 5 GS.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pšenice ozimá, gluteninové frakce, HMW GS, LMW GS, dusíkaté hnojení, sucho

KEYWORDS

Winter wheat, glutenin subunits, HMW GS, LMW GS, nitrogen fertilization, drought

VOSTREJŠ, P. *Vliv dusíkatého hnojení a sucha na obsah proteinů gluteninové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 39s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

……..

podpis studenta

Poděkování:

Rád bych chtěl tímto poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za podporu, trpělivost a poskytnuté rady při vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval slečně Ing. Terese Tomasz za ochotu a pomoc v laboratoři.

OBSAH

1. Úvod 7
2. Teoretická část 8
2.1. Význam obilovin ve výživě 8
2.2. Morfologie pšeničného zrna 8
2.2.1. Pšeničná obilka 8
2.2.2. Obalové vrstvy 9
2.2.3. Endosperm 9
2.2.4. Klíček 10
2.3. Lepek 10
2.3.1. Gliadiny 11
2.3.2. Gluteniny 12
2.4. Technologická jakost pšenice 13
2.4.1. Rapid mix test (objemová výtěžnost) 14
2.4.2. Obsah hrubých bílkovin 14
2.4.3. Sedimentační test (Zelenyho test) 14
2.4.4. Číslo poklesu 14
2.4.5. Objemová hmotnost 15
2.4.6. Vaznost mouky 15
2.5. Pšeničný genom a šlechtění 15
2.6. Podmínky pro pěstování 16
2.6.1. Dusíkaté hnojení 16
2.6.2. Sucho 17
2.6.3. Klimatické změny 18
3. Experimentální část 19
3.1. Materiál 19
3.2. Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE 20
3.2.1. Přístroje 20
3.2.2. Chemikálie 20
3.2.3. Příprava roztoků 21

3.2.3.1. Roztoky pro přípravu gelů 21
3.2.3.2. Pomocné roztoky 21
3.2.3.3. Roztoky k vizualizaci bílkovin 22
3.2.4. Příprava vzorků 22
3.2.5. Příprava gelů 22
3.2.5.1. Separační gel 22
3.2.5.2. Zaostřovací gel 23
3.2.6. Elektroforéza 23
3.2.7. Zviditelnění bílkovin 24
3.2.8. Vyhodnocení gelů a statistické zpracování 24
4. Výsledky 25
5. Diskuze 32
6. Závěr 33
7. Seznam použité literatury 34
8. Seznam zkratek 39

1. ÚVOD

Obiloviny jsou už tisíce let základní složkou lidské výživy. Hlavní potravinářskou obilovinou je pšenice ozimá (*Triticum aestivum* L.), která se řadí k nejdůležitějším a nejdéle pěstovaným kulturním rostlinám. Následkem neustálého nárůstu lidské populace přetrvává snaha o zvýšení produkce pšenice. Snahy o zvýšení výnosů jsou realizovány šlechtěním odolnějších a výnosnějších kultivarů. V praxi už běžně využívaným opatřením ke zvýšení výnosů je optimalizace způsobu pěstování rostlin. Především se jedná o přihnojování dusíkatými hnojivy. Výnosový potenciál nových kultivarů pšenice je v podmínkách České republiky v řádu 12–13 t/ha. Výnosy pšenice jsou ovšem v reálných podmínkách značně nižší, v průměru na 50 až 60 % potenciálu [1]. Zákonitosti, jak přesně jsou ovlivňovány gluteniny v reakci na dusíkaté hnojení, nejsou oproti gliadinům dobře známé. Hnojení sebou ovšem kromě svého pozitivního účinku na sklizeň úrody nese i negativní stránku v podobě ekologické zátěže při jeho hromadném aplikování.

V důsledku klimatických změn způsobených globálním oteplováním dochází k výrazným výkyvům v počasí. Pěstování pšenice ovlivňuje především dlouhotrvající sucho následované přívalovými dešti. Vodní režim je během vývoje rostlin důležitý a zásadně se mění. Je proto velice důležité objasnit, jak přesně sucho a v jaké době vývoje působí. Tyto poznatky a pochopení ovlivňování gluteninových podjednotek by mohly být důležité pro genetický výzkum nových kultivarů.

Cílem této práce bylo prostudovat dopady sucha a rozdílného dusíkatého hnojení na gluteninové frakce lepkových proteinů, které přímo ovlivňují kvalitu pšeničného zrna.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Význam obilovin ve výživě

Obiloviny patří k nejdůležitějším pěstovaným rostlinám. Využívají se nejen pro výživu lidí, ale i pro krmné účely nebo průmyslové zpracování. Celosvětově je v dnešní době pšenice nejvýznamnější obilovina zajišťující výživu lidské populace. Světová produkce rýže je sice skoro stejná, ale rýže se jen velice omezeně zpracovává na mouku, její pekárenské využití je tedy nevýznamné [2].

V 60. letech 20. století došlo k rapidnímu technologickému rozvoji v zemědělství, které je označováno jako „zelená revoluce“. Jejím hlavním představitelem byl americký vědec Norman E. Borlaug, oceněný za svůj výzkum v roce 1970 Nobelovou cenou. Od čtyřicátých let pracoval na šlechtění pšenice v Mexiku, kde v roce 1963 díky novému kultivaru dokázal šestkrát zvýšit sklizeň. Tak razantní nárůst výnosnosti nemohl být pouze důsledek pěstování tohoto kultivaru, půda by nedokázala pokrýt jeho nutriční potřeby. Proto bylo nezbytné začít používat minerální hnojiva [3]. Mezi minerální hnojiva řadíme hnojiva obsahující dusík, fosfor a draslík. Jejich používání je dnes v praxi naprosto běžné opatření ke zvýšení efektivity pěstování rostlin [4].

Pojem zelená revoluce tedy zahrnuje soubor metod využívaných v zemědělství, jedná se o mechanizaci zemědělství, používání umělých hnojiv a pěstování nově vyšlechtěných kultivarů zemědělských plodin, především kukuřice, rýže a pšenice [5].

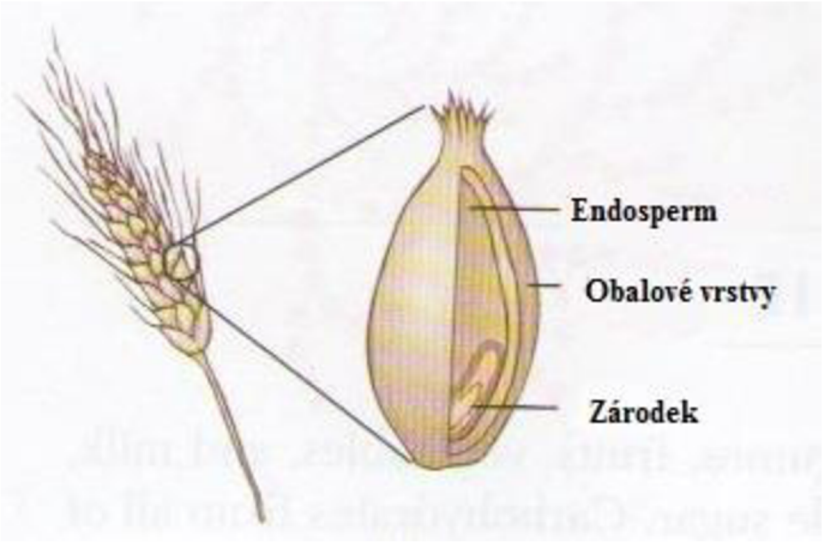
Největší dopad mělo zavedení těchto postupů v rozvojovém světě, především Indii, Pákistánu, Číně, Jižní Americe a později i v Africe. Dosáhlo se modernizace zemědělství, které bylo schopno produkovat dostatek potravin pro nasycení stále více se zalidňující planety. Produkce nejdůležitějších obilnin pšenice, kukuřice a rýže se mezi lety 1950 a 2000 zvedla z 650 na 1900 milionů tun při zachování prakticky stejné plochy orné půdy [3].

V případě České republiky se průmyslové hnojení začalo široce využívat od roku 1946. Začínalo se s množstvím N 4 kg/ha. Výnosnost pšenice se postupně s narůstající intenzitou hnojení více než ztrojnásobila, z 1,9 t/ha při nepoužívání průmyslových hnojiv na 6,5 t/ha v roce 2016 [6; 7].

2.2. Morfologie pšeničného zrna

2.2.1. Pšeničná obilka

Plodem pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L.) je obilka skládající se ze tří částí: obalových vrstev, klíčku a endospermu (obr. 1). Složení každé části odpovídá její funkci.



Obrázek 1 Pšeničná obilka [8]

2.2.2. Obalové vrstvy

Nejsvrchnější vrstvy zrna představují obalové vrstvy, které jsou vystavěny z několika vrstev buněk. Jejich funkce je především mechanická, chrání endosperm a zárodek, také zabraňují jejich vysychání. Obalové vrstvy jsou tvořeny houževnatými neškrobovými polysacharidy, především celulosou, hemicelulosou a ß-glukany.

Celulosa a hemicelulosa jsou polysacharidy tvořící nestravitelnou složku vlákniny. Celulosa je zcela nerozpustná ve vodě a za normální teploty na rozdíl od škrobu nebobtná. Hemicelulosa je rozpustná ve zředěných alkáliích a při klíčení je rozkládána na jednodušší cukry [2].

ß-glukany jsou strukturní polysacharidy, fyzikálně chemické vlastnosti závisí na jejich primární struktuře, typu vazeb či stupni větvení, z části jsou rozpustné z části nerozpustné. S teplotou jejich rozpustnost roste [9].

2.2.3. Endosperm

Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nalézá měkká aleuronová vrstva, tvořená jednou vrstvou velkých buněk. Buňky obsahují vysoký podíl bílkovin (30 %), představující téměř trojnásobek obsahu v samotném endospermu. Tyto buňky mají také nejvyšší obsah minerálních látek celého zrna, proto se při vymílání aleuronové vrstvy výrazně zvyšuje obsah minerálních látek v mouce a mírně se také zvýší obsah bílkovin, které však nedosahují tak velkých a strukturně uspořádaných makromolekul jako v endospermu. Z aleuronové vrstvy se také uvolňují hydrolytické enzymy, které rozkládají škrob v buňkách endospermu [10].

Z technologického hlediska je nejdůležitější část endosperm, představuje také největší část zrna (85 %). Jsou zde shromažďovány zásobní látky, které klíčící rostlina využívá ke svému růstu a rozvoji. Jedná se hlavně o bílkoviny a škrob. Endosperm obsahuje 10–15 % bílkovin

důležitých pro pekárenské účely. Ovšem největší obsah tvoří sacharidy, především škrob (80 %) [9].

Škrob se v zrnu vyskytuje ve formě nerozpustných škrobových zrn. Zásadní význam má škrob nejen pro klíčící rostlinu, ale i pro pekárenské technologie. Ve studené vodě škrobová zrna pouze mírně bobtnají, ale se zvyšující se teplotou míra bobtnání roste. Při teplotě 75 °C dojde k úplnému zmazovatění škrobových zrn. Intermolekulární vodíkové vazby mezi řetězci amylosy a amylopektimu jsou přerušeny, vytváří se maz, jehož viskozita stoupá. Po následném ochlazení dochází k rekonstrukci vodíkových vazeb a vzniku pružného gelu obsahujícího velké množství vody [9]. Tento proces je klíčový pro tvorbu, zrání a pečení těst.

Škrob je důležitý zdroj zkvasitelných cukrů pro pekařské kvasinky při zrání a kynutí těst. Kvasinky ho ovšem přímo nedokáží využít, musí být rozložen na jednodušší sacharidy. Při mletí pšeničného zrna dochází k mechanickému poškozování škrobu, ale především je štěpen amylasami. Uvolňovaná maltosa je snadno utilizována pekařskými kvasinkami při fermentačním procesu. Mezi další sacharidy přítomné v endospermu patří β-glukany, pentosany a fruktany.

2.2.4. Klíček

Klíček tvoří nejmenší část zrna. Jedná se o zárodek nové rostliny a nositele genetické informace. Obsahuje jednoduché cukry, bílkoviny a většinu tuku, který se v zrnu nachází. Při mlýnském zpracování bývá odstraněn kvůli nízké stabilitě přítomných tuků [2].

2.3. Lepek

V potravinářském průmyslu má hlavní význam pekárenská jakost pšeničného zrna, to znamená schopnost produkovat pečivo s odpovídající jakostí. Jakost je podmíněna lepkovými bílkovinami, ty jsou u pšenice naprosto jedinečné oproti ostatním rostlinám, díky svým viskoelastickým vlastnostem dokáží zadržovat CO_2 produkovaný pekařskými kvasinkami. Plyn hromadící se v pečivu napomáhá k dosažení požadovaného objemu.

Z chemického pohledu je bílkovinný komplex tvořen z 20 % albuminovými a globulinovými bílkovinami, vyskytujícími se hlavně v klíčku a obalových vrstvách. Zbylou většinu představují zásobní prolaminové a glutelinové bílkoviny endospermu, tedy lepkové bílkoviny. V případě pšenice jsou nazývány gliadiny a gluteniny. K jejich využívání dochází při klíčení zrna, kdy jsou štěpeny na aminokyseliny a peptidy, které jsou využívané na syntézu nových proteinů využívaných ve vyvíjejícím se klíčku. Lepkové proteiny se skládají ze stovek proteinových složek, které jsou přítomny buď jako monomery nebo jsou spojeny disulfidickými můstky do oligomerů a polymerů.

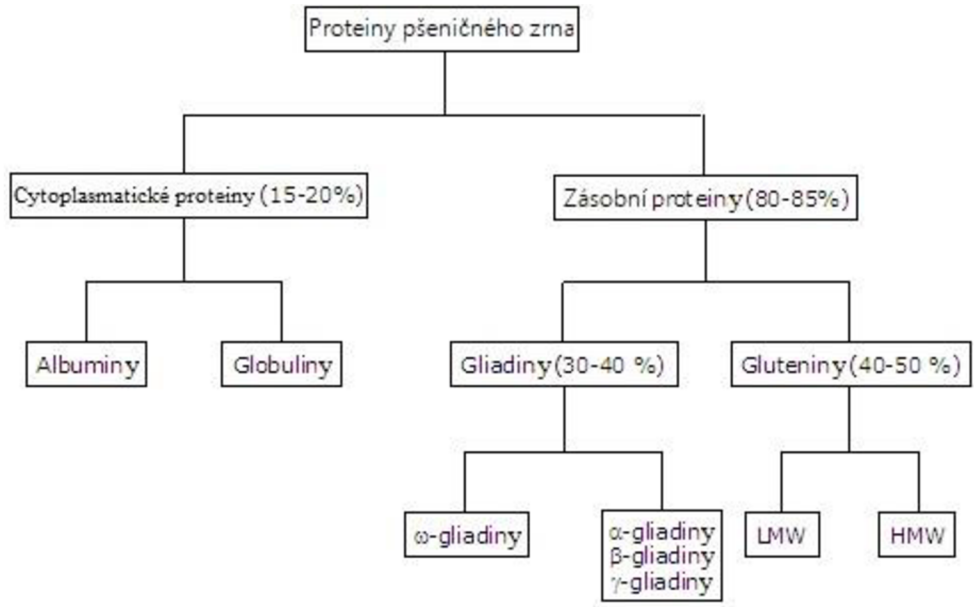
Aminokyselinové složení lepku se vyznačuje vysokým obsahem glutaminu a prolinu, zato aminokyseliny lysin, methionin, threonin a tryptofan jsou zastoupeny v menší míře (tab. 1) [18].

Tabulka 1 Obsah aminokyselin v pšenici v gramech vztaženo na 16 g dusíku. Limitující aminokyselinou je lysin [19].

AMK	Ala	Arg	Asx	Cys	Glx	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
g	3,6	4,6	4,9	2,5	29,9	3,9	2,3	3,3	6,7	2,9	1,5	4,5	9,9	4,6	2,9	0,9	3,0	4,4

Bílkovinný komplex lze rozdělit Osbornovou metodou [20] na základě rozpustnosti jednotlivých složek (obr. 2):

Albuminy jsou rozpustné ve vodě.
Globuliny v roztocích neutrálních solí.
Gliadiny jsou rozpustné v alkoholech.
Gluteniny jsou extrahovatelné zředěnými roztoky kyselin nebo zásad, například kyselinou citrónovou



Obrázek 2 Pšeničné proteiny [21]

2.3.1. Gliadiny

Gliadiny představují zejména monomerní proteiny s molekulovou hmotností 28 000–55 000. Podle primární struktury můžeme gliadiny rozdělit na α/β-, γ- a ω- typ. Z hlediska aminokyselinového zastoupení mají celkově gliadiny vysoký obsah glutaminu (36–45 %) a prolinu (14–30 %). Naopak méně jsou zastoupeny asparagová a glutamová kyselina. Ve výrazně nízkém množství jsou obsaženy bazické aminokyseliny arginin, lysin a histidin. Nízký obsah kyselých a bazických aminokyselin s polárními postranními řetězci souvisí s malou rozpustností gliadinů [19].

Konkrétněji ω- gliadiny jsou charakteristické vysokým obsahem glutaminu, prolinu a fenylalaninu. Deficitní jsou v obsahu síry, cystein úplně chybí, nemohou tedy tvořit disulfidické vazby. Oproti ω- gliadinům obsahují α/β-, γ- gliadiny mnohem méně glutaminu a prolinu. Většinou se v jejich řetězcích nachází 4 nebo 6 cysteinů, díky kterým vznikají 3 nebo 4 intrařetězcové disulfidické vazby [18].

Gliadiny mají díky svým vlastnostem velký význam v pekárenské praxi. Hydratované gliadiny mají malou pružnost a jsou méně kohezivní než gluteniny, přispívají k viskozitě a roztažnosti těsta, na viskoelastických vlastnostech těsta se podílejí jako rozpouštědlo pro pružné gluteniny [18].

Genetickou analýzou se podařilo zjistit, které části DNA souvisejí přímo s gliadiny. Syntéza gliadinů je řízena lokusy Gli-1 a Gli-2. Lokus Gli-1 je lokalizován na krátkém rameni chromozomu první homologické skupiny, lokus Gli-2 na krátkém rameni 6. homologické skupiny chromozomu. Lokusy jsou tvořeny navzájem těsně svázanými geny, které vytvářejí jednotný celek [22]. Tyto informace jsou nezbytné k pochopení, ve kterých místech genetické informace přenice jsou zakódované konkrétní vlastnosti pšenice, které mají vliv na pekárenskou kvalitu.

2.3.2. Gluteniny

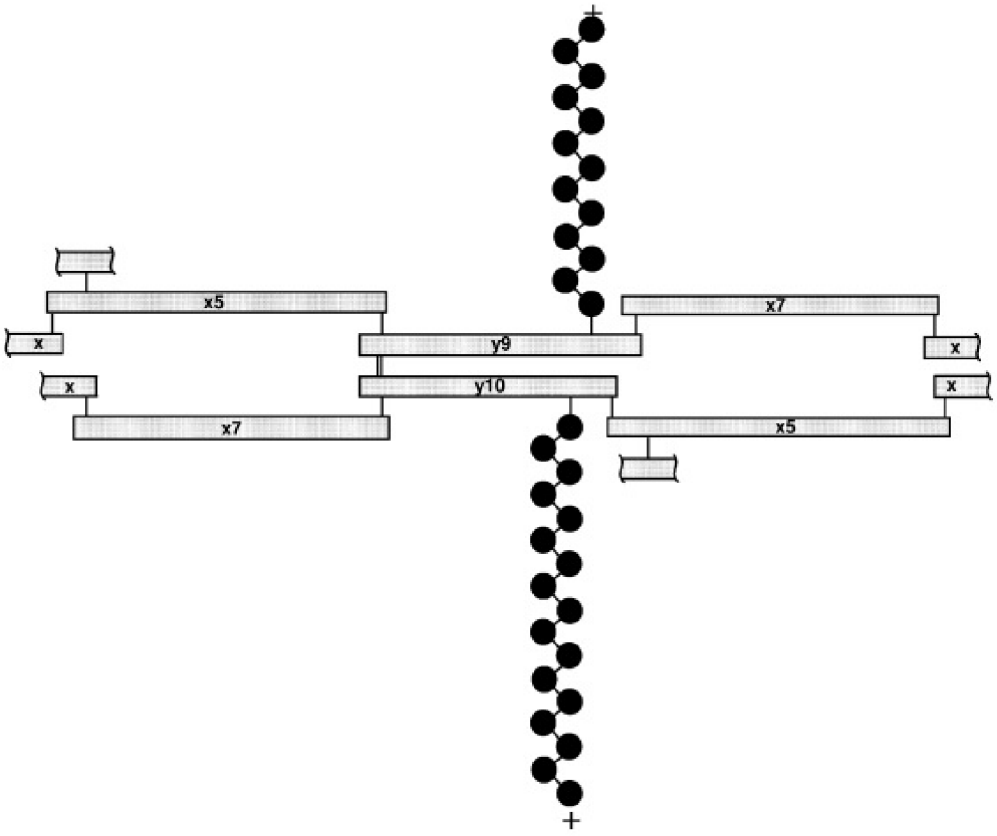
Gluteniny mají polymerní charakter, jednotlivé podjednotky jsou navzájem vázány disulfidickými a vodíkovými můstky. Vazby mohou být rozštěpeny pomocí redukčních činidel za vzniku vysokomolekulárních gluteninových podjednotek HMW GS (High molecular weight glutenin subunit) a nízkomolekulárních gluteninových podjednotek LMW GS (Low molecular weight glutenin subunit).

Co se týče zastoupení dominantní LMW GS mají blízký vztah s α/β-, γ- gliadiny díky podobné molekulové hmotnosti a aminokyselinovému složení [9]. Při analýze mají tedy velmi podobnou pohyblivost jako některé těžší gliadiny. Proto se náležitě dbá na způsob a pečlivost provedení extrakce LMW GS, která se provádí tak, aby byla odstraněna celá gliadinová frakce [23]. Dohromady tvoří LMW GS a gliadiny asi 80 % z celkového množství proteinů [24]. LMW-GS obsahují osm cysteinů, šest z nich je ve shodných polohách s α/β- a γ- gliadiny. Proto dochází k propojení pomocí intrařetězcových disulfidických vazeb. Dva další cysteiny nejsou schopny vytvářet intrařetězcové vazby, pravděpodobně ze sterických příčin [18].

HMW GS mají molekulovou hmotnost přes 10 milionů a řadí se tím k největším proteinům vůbec. Představují podíl mezi 8 a 18 % ze všech lepkových proteinů [24]. Skládají se ze tří strukturních domén A, B a C. Detailním studiem sekundární struktury HMW-GS bylo zjištěno, že opakující se doména B je tvořena β skládaným listem. Předpokládá se, že řetězce se překrývají a tvoří volné spirály, které rozhodujícím způsobem přispívají k pružnosti lepku. Neopakující se domény A a C mají globulární struktury obsahující α-helixy. Disulfidové vazby hrají důležitou roli při určování struktury a vlastností lepkových proteinů [11; 18].

Vztahy mezi alelami genů kódujícími HMW GS a LMW GS jsou známy a na jejich základě může být každá odrůda charakterizována ve vztahu s pekařskou jakostí pšenice [24; 25; 26]. Payne [27] objevil vztah mezi přítomností určitých částí HMW GS a množstvím bílkovin, respektive hodnotou sedimentačního testu. Našel tedy jejich význam pro pekařskou jakost.

HMW GS jsou kódovány geny na Glu-A1, Glu-B1 a Glu-D1 lokusech ležících na dlouhém rameni chromozomů 1A, 1B, 1D. Každý z lokusů kóduje dva typy HMW GS s rozdílnou molekulovou hmotností. Jedná se o typ x s vyšší molekulovou hmotností a typ y s nižší molekulovou hmotností (obr. 3) [1].



Obrázek 3: Model disulfidických můstků mezi LMW GS (●) a HMW GS (□) v polymeru lepku [18]

2.4. Technologická jakost pšenice

Odrůdy pšenice se pro zpracovatele rozdělují podle pekařské jakosti do několika skupin: [11]

Elitní E - velmi dobré

Kvalitní A – dobré, samostatně zpracovatelné

Chlebové B – doplňkové, zpracovatelné ve směsi

Ostatní C – málo vhodné až nevhodné

Jakostní skupiny představují multikriteriální parametr. Odrůdy jsou rozděleny do skupin podle fyzikálně-chemických kritérií, které souvisejí s požadavky zpracovatelů na vhodnost

zrna k dalšímu zpracování [12]. Dosažením uvedených hodnot je nezbytné k zařazení do odpovídající jakostní skupiny (tab. 2) [13].

Současné posuzování kvality pšenice je prováděno v České republice podle normy ČSN 46 1011-2.

Tabulka 2 Minimální požadavky na zařazení odrůd do skupin jakosti [13].

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

2.4.1. Rapid mix test (objemová výtěžnost)

Jde o standardní metodu pro posouzení kvality pšenice a pšeničné mouky. Provede se pekařský pokus, který zahrnuje intenzivní hnětení, krátkou dobou odležení těsta s následným strojním zpracováním těsta na bulky, které se upečou. Hodnotí se měrný objem pečiva, který se přepočítá na 100 g mouky. Zjistí se tak objemová výtěžnost pečiva v ml. Podle evropské směrnice (ECC 2062/81) je právě objemová výtěžnost hlavním a nejdůležitějším kritériem pro posuzování kvality potravinářských odrůd pšenice [14].

2.4.2. Obsah hrubých bílkovin

Obsah hrubých bílkovin se stanovuje analytickou metodou NIR (Spektroskopie v blízké infračervené oblasti) za použití kalibrační křivky nebo Kjeldahlovou metodou a následným přepočítáním pomocí faktoru pro potravinářskou pšenici 5,7 a pro krmnou pšenici 6,25. Obsah hrubých bílkovin v zrně se uvádí v procentech [15].

2.4.3. Sedimentační test (Zelenyho test)

Podstatou testu je schopnost bílkovin pšenice bobtnat v kyselém prostředí, tedy tvořit viskoelastickou síť, která zadržuje plyny při procesu kynutí. Sedimentační test udává v mililitrech objem sedimentu, který vznikne za specifických podmínek ze suspenze zkoušené mouky v roztoku kyseliny mléčné. Vyšší obsah bílkovin a lepší kvalita zpomalují proces sedimentace a zvyšují sedimentační hodnotu mouky [16].

2.4.4. Číslo poklesu

Vyjadřuje míru poškození zásobních látek obsažených v endospermu zrna hydrolytickými enzymy. Příjmem nadměrného množství vlhkosti před sklizní dochází ke klíčení a syntéze α-amylas štěpících škrob. Je tedy stanovována aktivita α-amylas. Číslo poklesu je nejvíce ovlivněno počasím v době dozrávání a sklizně [14].

Metoda využívá schopnosti rychlého zmazovatění suspenze mouky a vody ve vodní lázni. Číslo poklesu představuje celkový čas ztekutění škrobu, ke kterému dochází působením α-amylas přítomných ve vzorku. Dobu měření ovlivňuje odpor škrobového gelu vůči viskozimetrickému míchadlu a čas potřebný k poklesu míchadla o určenou vzdálenost ve vodní suspenzi.

2.4.5. Objemová hmotnost

Objemová hmotnost je hmotnost jednoho litru zrna nasypaného za podmínek zkoušky vyjádřená v gramech. Popisuje ji norma ČSN 46 10 11 část 5. Objemovou hmotnost nejvíce ovlivňuje průběh počasí v době dozrávání zrna. Dlouhodobým skladováním je snižována.

2.4.6. Vaznost mouky

Vaznost mouky závisí v převážné míře na množství a kvalitě bílkovin. V menší míře se na vaznosti podílejí další složky mouky (pentosany a poškozený škrob). Pokud vaznost pšeničné mouky kolísá, je při zpracování mouky obtížně určován přídavek vody do těsta a výsledkem mohou být příliš tuhá nebo naopak příliš volná těsta [17].

2.5. Pšeničný genom a šlechtění

Pšenice ozimá je polyploidní rostlina, konkrétně alohexaploidní (2n = 6x = 42). Její jaderný genom je tvořen 21 páry chromozomů. Skládá se ze tří homologních sad (AABBDD), protože vznikla kombinací tří různých druhů diploidních trav. *Triticum. urartu* a *Aegilops speltoides* hybridizovaly za vzniku *T. turgidum*, pozdější křížení *T. turgidum* s *A. tauschii* vedlo ke kulturní formě *Triticum aestivum*. Každá z trav byla vybavena 7 páry chromozomů. Genom pšenice vyniká svou velikostí, je tvořen bezmála 17 miliardami párů bází DNA. Více než 80 % tohoto genomu je vysoce repetitivní a je tvořeno různými typy roztroušených mobilních genetických elementů. Geny kódující bílkoviny představují pouze 2-3 % celkové DNA.

Od počátků pěstování pšenice se šlechtitelé snaží nalézt nové kultivary s lepšími vlastnostmi. Cílem je dosažení vysoké odolnosti vůči chorobám a škůdcům, vysoké výtěžnosti, která ovšem odpovídá pekárenské jakosti, a odolnosti vůči nepříznivým klimatickým podmínkám. Klasické šlechtění vyžaduje velké množství rostlinného materiálu a je časově velmi náročné, protože se rostliny selektují na základě fenotypových vlastností. K následnému hodnocení pekařských jakostí se standardně využívá řada praktických testů popsaných výše. Tyto metody hodnocení nejsou ovšem použitelné během probíhajícího šlechtitelského procesu, jelikož vyžadují velké množství zrna a dochází k znehodnocení vzorků. Není možné tedy získat další generaci vzorků [1].

Zefektivnění šlechtitelského výzkumu přinesly genetické metody. Oproti klasickým metodám dochází k selekci na základě genotypu šlechtěné rostliny. Základní metodou při studiu genomu organizmů je jeho sekvenování. Z důvodu značné rozsáhlosti pšeničného genomu je ovšem sekvenování celého genomu velice časově i finančně náročné. Proto se začaly využívat

techniky genetických DNA markerů. Tento přístup se nazývá selekce za pomocí markerů MAS (Marker Assisted Selection). DNA marker je úsek DNA a představuje značku, díky níž lze poznat, jestli se v genomu nachází požadovaná alela konkrétního genu. Marker se může nacházet přímo v sekvenci genu zájmu, nebo být v těsné vazbě s genem. Byly popsány konkrétní vztahy mezi jednotlivými alelami a jejich vlivem na pekařskou jakost. K identifikaci DNA markerů se používají molekulárně biologické metody jako elektroforéza nebo PCR (Polymerase Chain Reaction) [13].

MAS patří mezi neinvazivní metody a vyžaduje pouze malé množství rostlinného materiálu. Je tedy časově mnohem příznivější a s rostlinami lze dále pracovat. Postupně se tak daří získávat představu v podobě virtuálních map, které představují vzájemné uspořádání lokusů na chromozomech. Díky tomu mohou být snadno identifikovány velké počty markerů.

2.6. Podmínky pro pěstování

Vlastnosti a množství sklizeného zrna jsou kromě kultivaru ovlivňovány také agrotechnickým způsoben pěstování a klimatickými podmínkami v místě pěstování.

2.6.1. Dusíkaté hnojení

Pro dosažení vysokých a kvalitních výnosů musí být pro rostlinu k dispozici vedle dalších živin i dostatečné množství dusíku. Přihnojováním se zvyšuje jeho dostupnost pro rostliny, které mají následně vyšší metabolickou aktivitu a více prospívají. To se konkrétně projevuje ve zvýšení hmotnosti zrna, počtu zrn v klasu a počtu klasů na m^2 a tím je dosaženo celkové lepší výnosnosti [28]. Díky vyšší metabolické aktivitě je syntetizováno více aminokyselin a proteinů, čímž se zvyšuje obsah hrubé bílkoviny v zrnu, tedy jeho pekárenská kvalita [29].

Produktivita zrna i obsah hrubé bílkoviny narůstá přímo úměrně se zvyšující se dávkou dusíkatého hnojení. Po překročení určitého maximálního množství se ovšem nárůst zastaví. Koncentrace proteinu zůstává i při dalším zvýšení míry hnojení konstantní [26; 28]. Použitím vyšší dávky dochází ke zvyšování koncentrace dusíku pouze ve slámě [26], dokonce to může vést ke snížení výnosu, který je způsoben negativním účinkem dusíku na ostatní živiny [30]. Tím pádem se sníží účinnost hnojiva a efektivita pěstování. Naopak deficit dusíku má velmi negativní dopad na výnosnost. Způsobuje omezení tvorby nadzemní biomasy a zpomaluje rozvoj rostliny [4].

Ideální dávka hnojiva je silně individuální pro každý kultivar i místo pěstování. Proto její přesné určení není snadné, liší se v řádu několika desítek kg/ha [30]. O to důležitější ovšem nalezení optimální dávky je.

Z dlouhodobého výzkumu kvality obilovin vyplývá, že při pěstování pšenice bez použití hnojiv lze jen velmi obtížně dosáhnout parametrů pekařské jakosti zrna, a to díky nízkému obsahu dusíkatých látek v sušině [1].

Masivní hnojení má ovšem také negativní vliv na životní prostředí, dávky tedy nemohou být neomezené. Zemědělství je jedním z největších znečišťovatelů vod dusičnany. V oblastech s intenzivním zemědělstvím byla prokázána vysoká koncentrace dusičnanů v povrchových

a podzemních vodách. Proto je vydávána nitrátová směrnice, která upravuje podmínky používání hnojení, čímž se předchází kontaminaci vod a zajišťuje zachování zdrojů pitné vody i kvalita povrchových vod v ekosystémech [31].

Z těchto důvodů vychází tlak na vyšlechtění nových kultivarů, které budou schopny velice efektivně využívat dusík z hnojiva, aby mohlo dojít ke snížení dávek intenzity hnojení, ale budou nadále splňovat pekařské jakosti kladené na pšenici.

Nejjednoznačnější důsledek použití N hnojiva na lepkové proteiny se projevuje zvýšenou syntézou a akumulací gliadinů. Podíl gliadinů na celkovém množství lepkových proteinů se během zrání zvyšuje. Stejně tak při zvyšování dávky dusíku dochází k procentuálnímu nárůstu gliadinů.

Méně je známo o vlivu dusíku na gluteninové frakce. Z celkového množství lepkových proteinů klesá podíl LMW GS s časem v průběhu zrání zrna. Trend LMW GS je opačný oproti gliadinům. V případě různého stupně hnojení má závislost opět inverzní průběh vzhledem ke gliadinům, míra LMW GS se s vzrůstající intenzitou hnojení snižuje.

Podíl HMW GS vykazuje pouze málo výraznou závislost na úrovni N hnojení. Jejich procentuální množství zůstává s měnícím se množstvím dusíkatého hnojení stejné. Nárůst nebo pokles gluteninů je zásadně ovlivněn konkrétním kultivarem pšenice. Různé kultivary nemusí přesně vykazovat popsané trendy, ale mohou se výrazněji lišit. V zásadě zatím není možné určit u gluteninů pevně platící zákonitosti [24].

2.6.2. Sucho

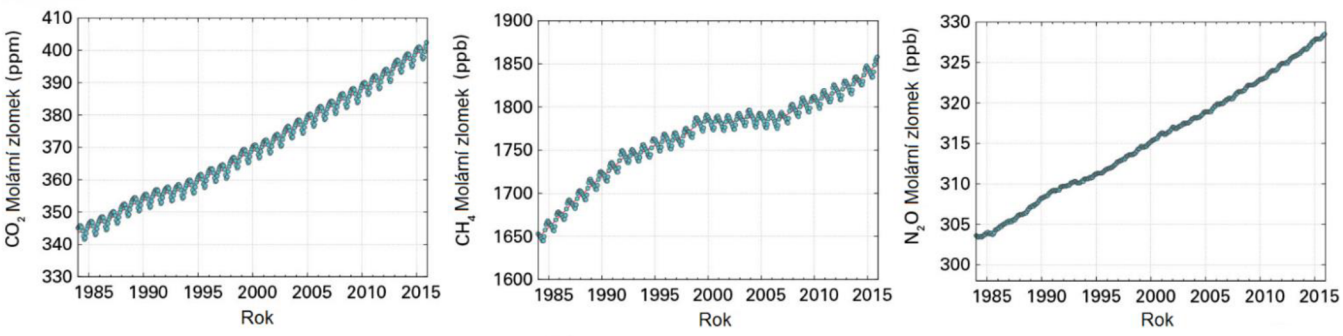
Sucho je u většiny polních plodin hlavním environmentálním stresorem [1]. Pšenice je rostlina náročná na vodu, jejíž přítomnost je nutná v počátečním období, během kterého se tvoří kořenový systém. Nároky na vláhu se ještě zvyšují před kvetením, kdy probíhá tvorba klasu a kvítků. Nedostatek vody během tvorby obilky má negativní dopady, snižuje počet zrn v klasu a jejich hmotnost. Nároky rostlin na vodu se snižují během dozrávání, kdy listy začínají žloutnout a postupně odumírají [32]. Sucho a vyšší teploty snižují vlhkost v zrnu a tím zvyšují procentuální obsah dusíku v sušině. Vyšší výnos za mírného sucha může být dosažen vyšším využitím vody a zvýšením efektivnosti využití vody [1].

Podle Chloupka [6; 33], který sledoval vlivy změny klimatických podmínek v průběhu 20. století na výnosy, pšenice pěstovaná při teplejších a sušších podmínkách panujících především v měsících červnu a červenci vykazuje vyšší výnosy oproti vlhkému a chladnému prostředí. Za odrůdu tolerantní k suchu lze považovat tu, která při pěstování v suchých podmínkách opakovaně poskytne vyšší výnos než standardní odrůdy. Vždy ovšem záleží na konkrétních pěstebních podmínkách, především na nástupu, délce a intenzitě období sucha [13].

2.6.3. Klimatické změny

Analýzou družicových i pozemních dat sledujících dva klíčové ukazatele v oblasti změny klimatu, globální povrchovou teplotu a míru arktického ledu, byly podle National Aeronautics and Space Administration (NASA) v první polovině roku 2016 překonány dosavadní rekordy. Každý měsíc přinesl novou maximální hodnotu a celková průměrná teplota byla o 1,3 °C vyšší, než na konci 19. století. Trend rostoucí teploty odpovídá snižující se úrovni arktické ledové pokrývky, která zásadním způsobem ubývá [34].

Podle World Meteorological Organization (WMO) dochází každoročně ke zvyšování koncentrace skleníkových plynů v atmosféře (obr. 4), to vede díky skleníkovému efektu k oteplování planety a následnému tání ledovců [35].



Obrázek 4 Koncentrace skleníkových plynů [35]

Tání arktických ledovců je výrazně spojeno s extrémním počasím v Evropě, Asii a Severní Americe. Kolem severního pólu proudí v liniích chladné vzdušné proudy, tak zvané planetární vlny. Chladný vzduch planetárních vln je v ostrém rozhraní s teplým jižním vzduchem. Zvýšením teploty na severním pólu dochází ke stírání teplotních rozdílů vzdušných proudů, vedoucích k narušení planetárních vln, které zastaví svůj pohyb. Tyto změny v proudění vzduchu jsou spojené se vznikem extrémního počasí, v regionech zůstává po delší dobu stejné počasí. Může nastat období vysokých maximálních teplot, snížení srážkových úhrnů vedoucí k suchu nebo naopak deštivé počasí způsobující povodně [36].

Trend výskytu extrémního počasí je v zemědělství velice nebezpečný. Rostliny se nedokáží rychle přizpůsobovat nepříznivým klimatickým podmínkám, proto dochází ke ztrátám na úrodě vedoucím k ekonomickým škodám zemědělců. Pokud bude docházet ke klimatickým výkyvům častěji, bude nezbytné, aby nedošlo k poklesu produkce, získání nových odolnějších kultivarů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Experiment provedl Ústav výzkumu globální změny AV ČR na dvou experimentálních plochách v blízkosti Březové na Svitavsku (lokalita Babička - 49°40,4' severní šířky, 16°27,5' východní délky, nadmořská výška 460 m, lokalita Větrolam 49°39,9' severní šířky, 16° 28,4' východní délky, nadmořská výška 475 m) během vegetačních období (2013–2014). Poloha je charakterizována průměrnou roční teplotou 7,6 °C a průměrnou sumou srážek 629 mm. Typ půdy v lokalitách je luvisol.

Pokusné parcely (10 x 4,5 m) byly osety pšenicí ozimou (*Triticum aestivum* L.) kultivar Tiguan. V první polovině května (8. 5. 2013) byly na 24 parcelách instalovány experimentální stříšky zamezující pronikání srážek (obr. 5). Střížky se skládají z dřevěného rámu pokrytého průhlednými polykarbonátovými pásy. Pásy byly připevněny tak, aby se navzájem překrývaly, ale mohl stále proudit vzduch a zamezilo se srážení vody. Horní část (0,3 m) boční stěny byla také pokryta pásy, aby se dosáhlo lepší účinnosti. Střecha měla sklon 20° a na nižší straně byl namontován žlab, pro odvod zachycené vody. Zastřešené parcely byly odděleny od okolní půdy pomocí ocelové bariéry.

Obrázek 5 Experimentální stříška pro simulaci sucha

Období sucha trvalo do 12. 6. 2013 (konec metání), kdy byly experimentální stříšky odstraněny a následně bylo do těchto parcel, které byly vystaveny stresu suchem, aplikováno 90 mm vody (ve dvou dávkách) jako simulované přívalové srážky. Kromě srážek byla také v průběhu roku kontinuálně sledována půdní vlhkost a teplota pomocí nainstalovaných čidel v hloubce 15 cm. Vliv hnojení byl sledován ve variantách: kontrola bez hnojení (0 kg/ha), hnojení N (140 kg/ha). Dusík byl dodáván jako kapalina ve třech formách: amonné soli, dusičnany a močovina v poměru 1: 1: 2 (hnojivo DAM® 390, Duslo, SK). Hnojivo bylo aplikováno ve dvou dávkách (duben a červen). Všechny varianty byly založeny ve čtyřech

opakováních. Dne 7. 8. 2013 byla provedena sklizeň nadzemní biomasy ozimé pšenice, zrna byla pomleta a získaná mouka byla použita k analýzám.

3.2. Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE

3.2.1. Přístroje

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

Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF

Vortex – stuart, firma MERCI

Vortex – Genie 2, firma SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.

Termoblok TDB-100, firma BIOSAN

Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE

Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN, firma BIO-RAD

Zdroj Power Pac HC, firma BIO-RAD

Třepačka KS 130 BASIC, firma IKA

3.2.2. Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

Coomasie Brilliant Blue G-250 (SERVA)

Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)

Butanol (LACH-NER)

DTT – dithiothreitol (SIGMA ALDRICH)

Ethanol

Glycerol (SIGMA ALDRICH)

Glycin (SIGMA ALDRICH)

Isopropanol (LACH-NER)

Kyselina chlorovodíková (LACH-NER)

Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)

2-Merkaptoethanol (SIGMA ALDRICH)

Methanol (SIGMA ALDRICH)

N,N´-Methylenbisakrylamid (SERVA)

Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)

SDS-dodecylsulfát sodný (SIGMA ALDRICH)

TEMED – N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (SERVA)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)

3.2.3. Příprava roztoků

3.2.3.1. Roztoky pro přípravu gelů

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

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

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

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

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

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

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.2.3.2. Pomocné roztoky

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

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

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

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

3.2.3.3. Roztoky k vizualizaci bílkovin

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

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

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

3.2.4. Příprava vzorků

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

3.2.5. Příprava gelů

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

3.2.5.1. Separační gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 3.

Tabulka 3: Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu (30 ml – 6 gelů)

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

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

3.2.5.2. Zaostřovací gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 4.

Tabulka 4: Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu (10 ml)

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

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

3.2.6. Elektroforéza

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

3.2.7. Zviditelnění bílkovin

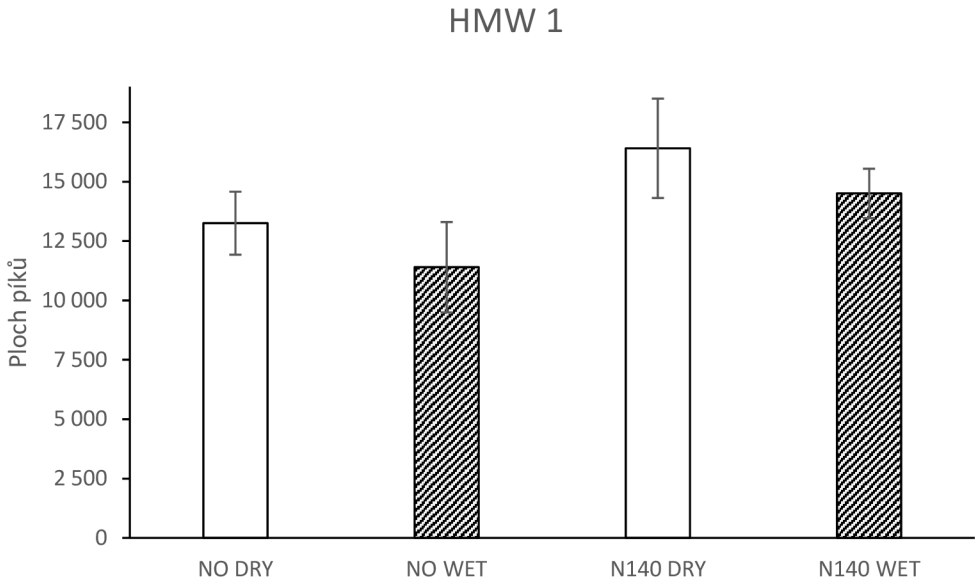
Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická skla s gelem vyjmuta ze stojanu tak, aby pufr odtekl do vnější nádoby a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo spodní sklo odlepeno od gelu a gel byl pod vodou sejmut z horního skla. Voda byla vylita z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

3.2.8. Vyhodnocení gelů a statistické zpracování

Gely byly naskenovány a jednotlivé zóny byly programem Multi Gauge ver.3.1 FUJIFILM převedeny na píky a vypočítána jejich plocha. Celkem bylo stanovováno 16 vzorků ve čtyřech sadách. Každý vzorek byl nanesen na jeden gel třikrát. Ze tří získaných výsledů pro každý vzorek byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Pro každou sadu vzorků byly spočítány statistické parametry: průměr, směrodatná odchylka, rozptyl a interval spolehlivosti. K dalšímu statistickému vyhodnocení byl použit nepárový t-test se statisticky významnou pravděpodobností $p < 0,05$.

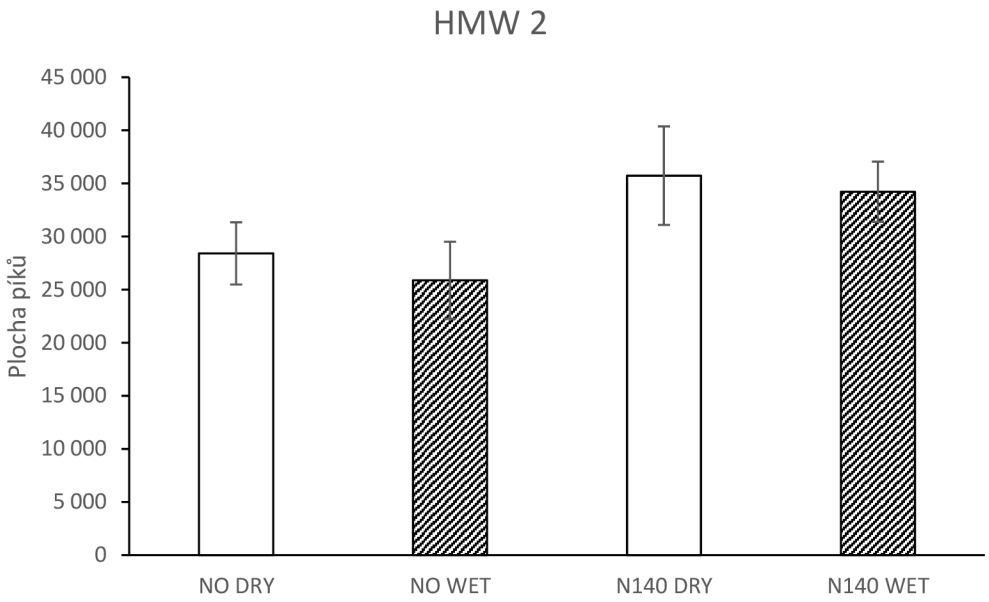
Výsledná hodnota průměru pro každou sadu vzorků byla vynesena do grafů pro jednotlivé gluteninové podjednotky. Chybové úsečky představují hodnotu intervalu spolehlivosti.

4. VÝSLEDKY



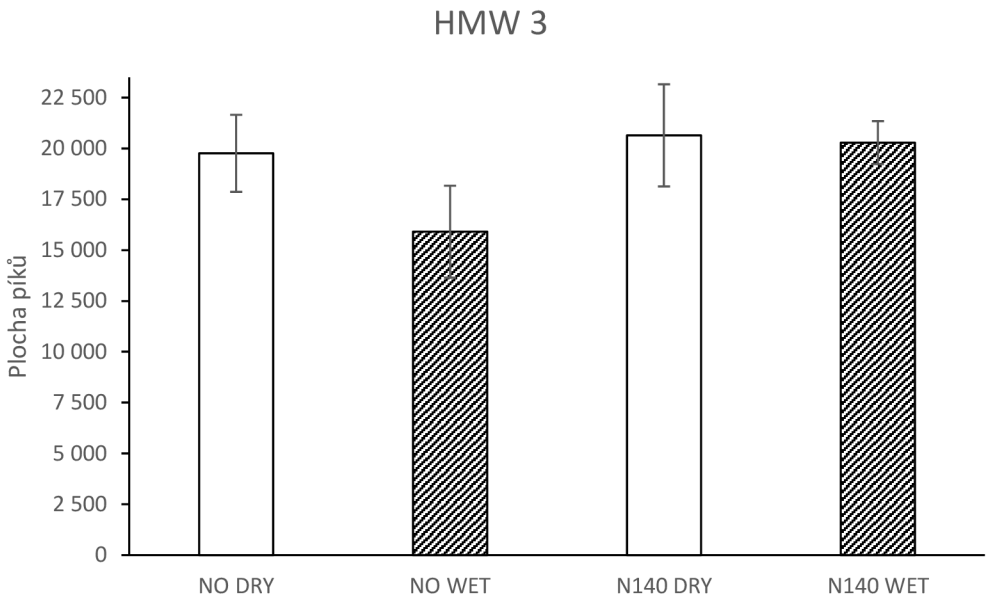
Obrázek 6 Srovnání ploch píků pro HMW 1 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Porovnáním hnojených a nehnojených variant byl metodou nepárového t-testu prokázán statisticky významný rozdíl s pravděpodobností $p < 0,05$. Hnojení tedy mělo na obsah HMW 1 GS významný vliv, u hnojených variant došlo k nárůstu obsahu HMW 1 GS o přibližně 25 %. Naopak mezi suchými a vlhkými variantami se nepodařilo prokázat žádný významný rozdíl i přes to, že vzorky pěstované za sucha dosáhly oproti vlhkým vzorkům vyšších hodnot, což je v souladu s naším předpokladem.



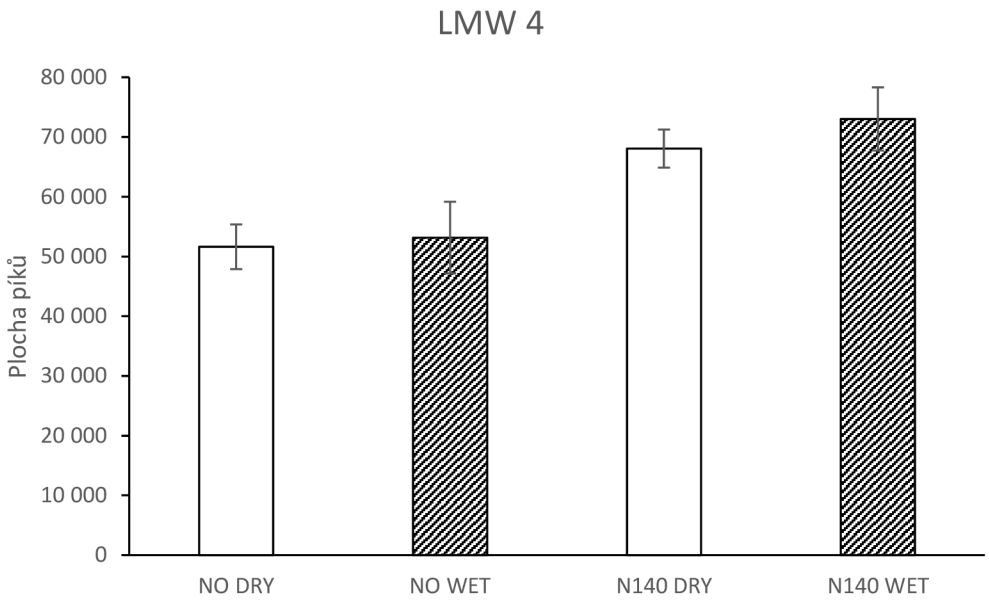
Obrázek 7 Srovnání ploch píků pro HMW 2 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

U HMW 2 GS byl prokázán pomocí t-testu vliv dusíkatého hnojení na množství gluteninových frakcí. Statisticky významný rozdíl mezi hnojenými a nehnojenými vzorky odpovídal pravděpodobnosti $p < 0,05$, nárůst mezi N0 DRY a N140 DRY představoval asi 25 % a mezi N0 WET a N140 WET 32 %. Ve druhém sledovaném parametru vlivu sucha nebyl významný rozdíl mezi variantami prokázán.



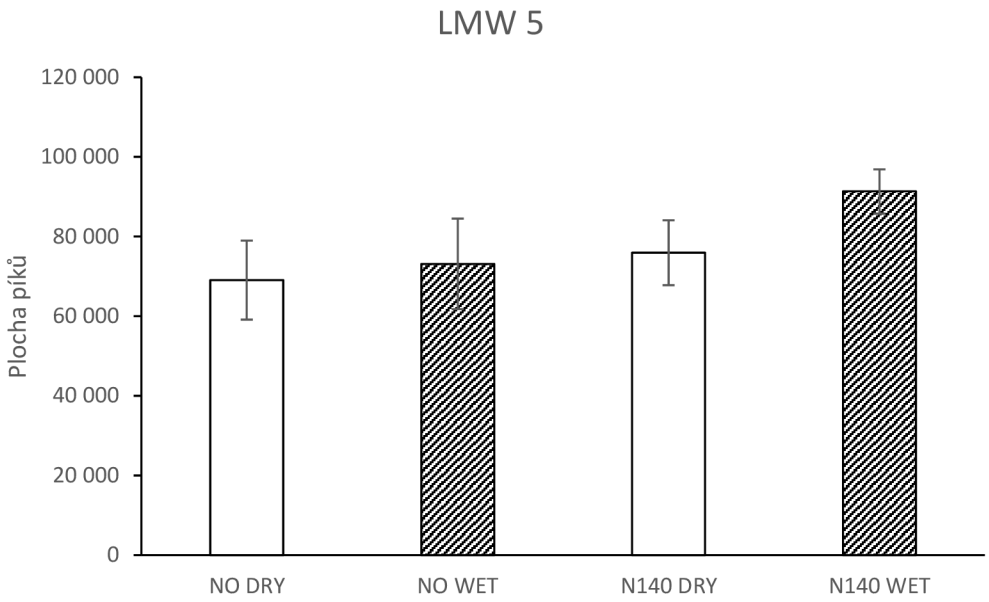
Obrázek 8 Srovnání ploch píků pro HMW 2 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Pro frakci HMW 3 byl prokázán statisticky významný vliv hnojení pouze pro varianty WET. Přírůstek mezi N0 WET a N140 WET činil asi 27 %. V podmínkách DRY nezpůsobilo hnojení významný nárůst obsahu frakcí. Sucho nemělo vliv na množství HMW 3 GS.



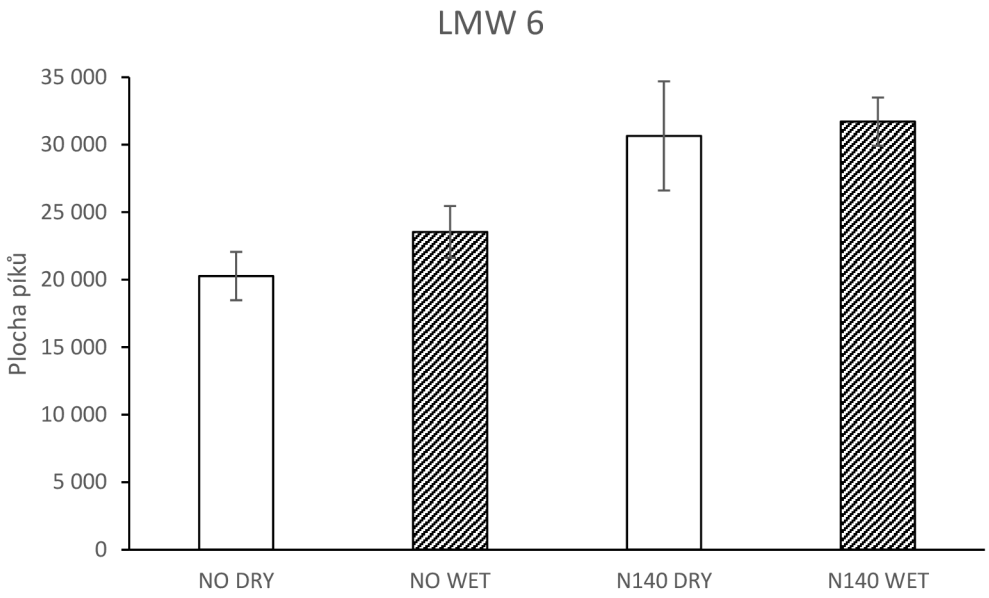
Obrázek 9 Srovnání ploch píků pro LMW 4 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Nízkomolekulární podjednotky vykazovaly trend, při němž varianty WET dosahovaly vyšších hodnot než varianty DRY. Hnojení ovlivnilo obsah gluteninových frakcí. Mezi N0 DRY a N140 DRY dosáhl statisticky významný nárůst asi 32 % ($p < 0,05$). Navýšení mezi N0 WET a N140 WET představovalo 37 %. Stres vyvolaný suchem významně neovlivnil množství gluteninových frakcí LMW 4.



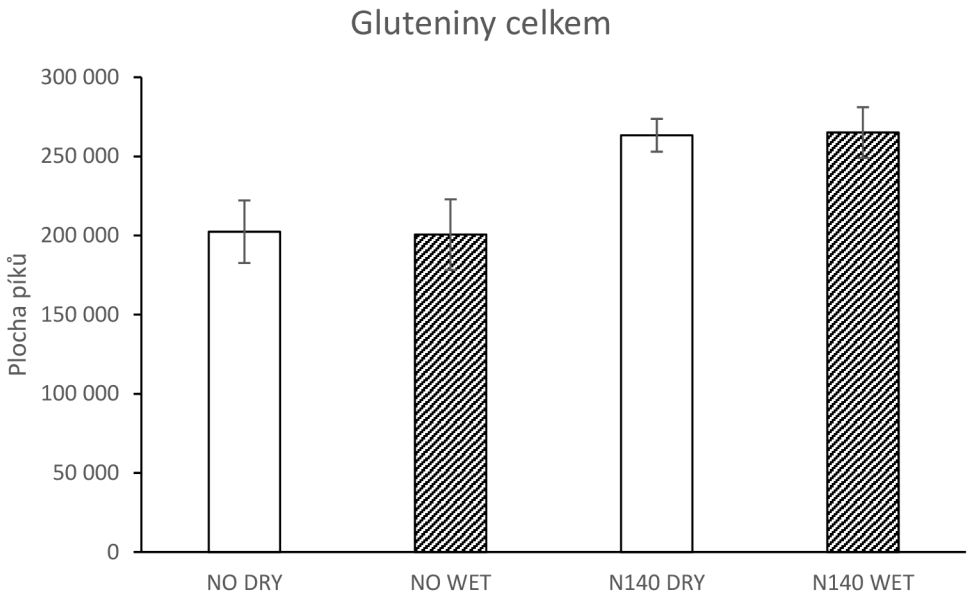
Obrázek 10 Srovnání ploch píků pro LMW 5 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Hnojení ovlivnilo obsah frakcí LMW 5 pouze varianty WET. Nárůst činil 29 %. Sucho nemělo vliv na obsah frakce LMW 5.



Obrázek 11 Srovnání ploch píků pro LMW 6 GS vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Vliv dusíkatého hnojení byl u LMW 6 GS jednoznačně prokázán. Porovnání hnojených a nehnojených variant DRY dosáhlo jako jediné při hodnocení t-testem dokonce vysoce významného statistického rozdílu s pravděpodobností $p < 0{,}01$. Nárůst představoval u variant DRY 51 % a u variant WET 35 %. Významný vliv sucha nebyl ani u poslední frakce prokázán.



Obrázek 12 Srovnání ploch píků pro celkový souhrn všech gluteninových frakcí vzorků ve čtyřech variantách v kombinaci hnojení (N140) vs. bez hnojení (NO) a sucho (DRY) vs. vlhko (WET). Sloupce vyjadřují aritmetický průměr čtyř vzorků, každý ve třech opakováních. Chybové úsečky představují interval spolehlivosti.

Celkový obsah gluteninových frakcí byl statisticky významně ovlivněn dusíkatým hnojením. Hnojené vzorky odpovídaly významnému rozdílu ($p < 0,05$) mezi N0 DRY a H140 DRY s nárůstem o 30 % a mezi N0 WET a N140 WET s nárůstem o 32 %. Závislost obsahu gluteninových frakcí na stresu v podobě sucha nebyla statisticky významná.

5. DISKUZE

Gluteniny jsou důležité pro pekárenské vlastnosti pšenice a představují téměř polovinu všech proteinů vyskytujících se v pšeničném zrnu. Ošetření rostlin dusíkatým hnojením způsobí nárůst celkového množství proteinů v zrnu, který se zvyšuje úměrně dávce použitého hnojiva. Nárůst gluteninů není tak výrazný jako nárůst gliadinů, ale přesto je významný [37; 38], Wieser ve své práci [39] uvádí nárůst o 40–50 %, v našem případě to bylo v průměru asi 31 %. Při Wieserově pokusu bylo aplikováno hnojení až 200 kg/ha, v našem případě jen 140 kg/ha. Značnou roli hrají specifické podmínky, ve kterých je pšenice pěstována a také kultivar. Ve Wieserově práci sledované kultivary patří mezi pekárensky jakostní (Herzog, Astron). Námi zkoumaný kultivar Tiguan se řadí ke kultivarům krmným, které obecně nedosahují tak vysokého podílu bílkovin, tudíž ani nárůst nemohl být tak velký.

Vliv dusíku se projevuje jak u vysokomolekulárních (HMW GS) tak u nízkomolekulárních (LMW GS) gluteninových frakcí [24; 37; 38]. Naše vzorky vykazovaly významný vliv dusíkatého hnojení jak na celkové množství gluteninů, tak na obsah frakcí HMW a LMW. Podjednotky HMW 1 a 2 byly ovlivněny hnojením při suchých (DRY) i vlhkých (WET) podmínkách, HMW 3 GS pouze v případě WET. Hnojení vedlo k nárůstu obsahu LMW 4 GS nezávisle na dostupnosti vody. U LMW GS 5 byl zaznamenán významný rozdíl mezi hnojenými a nehnojenými vzorky pouze v podmínkách WET. Obsah frakcí LMW GS 6 byl ovlivněn hnojením v podmínkách DRY i WET, v podmínách WET byl dokonce vysoce významný statistický rozdíl mezi srovnávanými variantami. Podle Wiesera [39] byl x typ HMW GS s vyšší molekulovou hmotností ovlivněn více než y typ HMW GS s nižší molekulovou hmotností, což v podmínkách DRY odpovídá našim výsledkům, jelikož naše HMW GS 1 a 2 vykazovaly vyšší rozdíl než HMW GS 3. V podmínkách WET byly rozdíly podobné.

Singh a kol. [40] uvádí, že efekt sucha se projevuje velice specificky podle nastavených podmínek. Vliv sucha na gluteniny je závislý na délce sucha, jeho načasování vzhledem k vývoji rostliny, a především na kultivaru. U některých kultivarů dochází k inhibici syntézy gluteninů u jiných naopak k vyšší akumulaci. Nižší dostupnost vody při vývoji rostliny vede k nižším výnosům zrna, což je způsobeno nižší syntézou škrobu [41]. Celková koncentrace proteinů se ovšem zvyšuje, jelikož syntéza škrobu je menší [42].

V naší práci jsme neprokázali významný vliv sucha na celkový obsah gluteninů, nenašli jsme ani žádný významný vliv na jakoukoli gluteninovou podjednotku, ať už vysoko či nízkomolekulární. Li a kol [37] uvádějí, že jimi sledované kultivary (Shannong1391, Taishan23) vykazovaly stabilitu vůči projevům sucha v kombinaci s dusíkatým hnojením. V naší práci se ovšem projevila interakce hnojení v kombinaci se suchem u HMW 3 a LMW 5 GS, kde hnojení ovlivnilo množství gluteninových frakcí pouze v podmínkách dešťové závlahy. Pravděpodobnost tohoto závěru potvrzují ve své práci Dai a kol. [41], podle kterého stres způsobený nedostatkem vody má negativní vliv na tvorbu HMW GS. Ke stejným výsledkům jako my dospěli i Jiang a kol. [42].

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaký vliv má dusíkaté hnojení a sucho na obsah gluteninových frakcí pšenice ozimé.

Kultivar Tiguan pšenice ozimé byl pěstován na experimentálním pozemku Ústavu výzkumu globální změny AV ČR v blízkosti Březové na Svitavsku (49°39,9'N, 16°28,4'E, nadmořská výška 475 m) během dvou vegetačních období (2013–2014) jednak v podmínkách zamezujících přísunu přírodních srážek (DRY), jednak v podmínkách normálních přírodních srážek (WET). Polovina vzorků byla ošetřena dusíkatým hnojivem dávkou 140 kg/ha (N140), druhá polovina zůstala bez hnojení (N0). K analýzám byly použity vzorky z roku 2013.

Po oddělení gliadinů byly gluteniny ze vzorků extrahovány 50% isopropanolem s 1% DTT. Jednotlivé gluteninové frakce byly separovány metodou SDS-PAGE a kvantifikovány počítačovou denzitometrií.

Stres způsobený suchem neměl žádný významný vliv na celkový obsah gluteninů ani na žádnou z gluteninových frakcí. Významný vliv na celkový obsah gluteninů mělo dusíkaté hnojení. U hnojených vzorků došlo k významnému nárůstu celkového množství gluteninů, nárůst nastal i u jednotlivých gluteninových frakcí. V podmínkách WET v kombinaci s dusíkatým hnojením byl zjištěn statisticky významný nárůst obsahu u všech HMW i LMW frakcí. V podmínkách DRY nedošlo vlivem hnojení k nárůstu obsahu gluteninů ani jednotlivých gluteninových frakcí.

Z našich měření tedy vyplývá, že dusíkaté hnojení má významný vliv na obsah gluteninů pšenice ozimé kultivaru Tiguan. Obsah gluteninových frakcí není nijak významně ovlivněn dlouhotrvajícím suchem, ale u HMW 3 a LMW 5 GS sucho snižuje efektivitu hnojení.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] HOSNEDL, Václav, ed. *Pšenice - od genomu po rohlík: aktuální poznatky doktorandů získané ve výzkumných laboratořích a na pokusných pozemcích*. Vyd. 1. České Budějovice: Kurent, 2008. ISBN 978-80-87111-12-3.

[2] KUČEROVÁ, Jindřiška. *Technologie cereálií*. Druhé přepracované vydání. V Brně: Mendelova univerzita, 2016. ISBN 9788075094421.

[3] DROBNÍK, Jaroslav. *Biotechnologie a společnost*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 9788024614847.

[4] HŘIVNA, Luděk a Pavel RŮŽEK, ed., Jana PIŠANOVÁ, ed. *Nové trendy v používání dusíkatých hnojiv: sborník vědeckých a odborných prací z konference : 25. října 2006 Praha, 26. října 2006 Brno* [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006 [cit. 2017-04-16]. ISBN 80-865-5596-8. Dostupné z: http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN80-86555-96-8.pdf

[5] JENÍČEK, Vladimír. Trendy vývoje světového zemědělství. *Agricultural Economics*. 2002, **48**(11), 519–529. ISSN 0139-570X.

[6] CHLOUPEK, Oldřich. a Pavlína. HRSTKOVÁ. *Reakce našich plodin na vnější vlivy během posledních 80. let.: Vědecký výbor fytosanitárního a ž ivotního prostředí* [online]. 2004 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2003/vvf-07-03.pdf

[7] *Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin - 2016* [online]. Český statistický úřad, 2017 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: https://www.czso.cz/documents/10180/45994629/2701411702.pdf/1f21342e-ea80-474b-a930-467323b46ea1?version=1.0

[8] *Katwhitfield.com*. In: . b.r. Dostupné také z: https://runnerbeans.files.wordpress.com/2010/04/wheat-berry-diagram.jpg

[9] GABROVSKÁ, Dana., Ilona. HÁLOVÁ, Diana. CHRPOVÁ et al. *Obiloviny v lidské výživě: stručné shrnutí poznatků se zvýšeným zaměřením na problematiku lepku*. 1. vydání. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2015. Publikace České technologické platformy pro potraviny. ISBN 9788088019077.

[10] PŘÍHODA, Josef., Marie. HRUŠKOVÁ a Pavel. SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0530-7.

[11] ČERNÝ, Jiří a Antonín ŠAŠEK. *Bílkovinné signální geny pšenice obecné*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996. ISBN 8085120550.

[12] *Pšenice 2012 "Od genomu po chleba": šlechtitelský seminář 2012 : Praha 5.-6. prosince 2012*. První. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012. ISBN 9788074271229.

[13] *Pšenice 2016: šlechtitelský seminář 2016 : Praha 1.-2. prosince 2016*. První. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2016. ISBN 9788074272110.

[14] HORÁKOVÁ, Vladimíra. *METODIKA ZKOUŠEK UŽITNÉ HODNOTY: PŠENICE* [online]. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2016 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z http://eagri.cz/public/web/file/112381/Psenice2016.pdf

[15] DVOŘÁČEK, V. *Činnosti laboratoře výzkumného týmu kvalita rostlinných produktů: Směrnice S 3* [online]. In: . 4. Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2014, s. 68 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: http://www.vurv.cz/sites/File/VURV%20S-3%20Cinnost%20laboratore%20VT%20KRP,%20vyd_4,%20140830.pdf

[16] ZELENY, Lawrence. A simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem*. 1947, **24**(6), 465-475.

[17] KOVAŘÍKOVÁ, Dana a Věra NETOLICKÁ. *Vzdělávací materiál pro předmět Technologická příprava* [online]. In: 2011, s. 56 [cit. 2017-05-13]. Dostupné z https://1url.cz/itm4z

[18] WIESER, Herbert. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007, **24**(2), 115-119. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. ISSN 07400020. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535

[19] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 8086659003.

[20] OSBORNE, Thomas B. a S.H CLAPP. The chemistry of the protein bodies of the wheat-kernel. Part III: Hydrolysis of the wheat proteins. *American Journal of Physiology*. 1906, **17**, 231-265.

[21] *Tuscany-diet.net* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: http://www.tuscany-diet.net/wp-content/uploads/2015/02/wheat-grain-proteins.gif

[22] HUBÍK, Květoslav. *Zásobní bílkoviny endospermu zrna pšenice a ječmene*. První. Praha: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 1991. Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do zemědělské praxe.

[23] BRADOVÁ, Jana. *Optimalizovaná metodika SDS-PAGE pro analýzu LMW - podjednotek gluteninů pšenice*. První. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006. ISBN 8086555984.

[24] CHOPE, Gemma. A., Y. WAN, S. P. PENSON, D. G. BHANDARI, S. J. POWERS, P. R. SHEWRY a M. J. HAWKESFORD. Effects of Genotype, Season, and Nitrogen Nutrition on Gene Expression and Protein Accumulation in Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(19), 4399-4407 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1021/jf500625c. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf500625c

[25] BRADOVÁ, Jana, Václav DVOŘÁČEK a Lenka ŠTOČKOVÁ. *Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice: metodika pro praxi*. První. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011. Metodika pro praxi. ISBN 9788074270567.

[26] BARNEIX, Atilio. J. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2007, **164**(5), 581-590 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.03.009. ISSN 01761617. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161706001246

[27] PAYNE, Peter I., M. A. NIGHTINGALE, A. F. KRATTIGER a L. M. HOLT. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1987, **40**(1), 51-65. DOI: 10.1002/jsfa.2740400108. ISSN 00225142. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740400108

[28] DAMPNEY, P.M.R., A. EDWARDS a C. J. DYER. *Managing nitrogen applications to new Group 1 and 2 wheat varieties* [online]. Cambridge: ADAS Boxworth, 2006 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: https://cereals.ahdb.org.uk/media/365505/pr400_final_project_report.pdf

[29] RAMELLA, Joao R P, K. D C LIBARDI, D D CASTAGNARA, M C MOTTIN, P S. R. DE OLIVEIRA a E P. SEIDEL. Agricultural yield components of dual purpose wheat cv. BRS Tarum under cutting and nitrogen fertilization handlings. *African Journal of Agricultural Research* [online]. 2015, **10**(8), 811-820 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.5897/AJAR2014.9166. ISSN 1991-637x. Dostupné z: http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/68A353C50652

[30] SALEEM, M. F., B. L. MA, H. VOLDENG a Tong-Chao WANG. NITROGEN NUTRITION ON LEAF CHLOROPHYLL, CANOPY REFLECTANCE, GRAIN PROTEIN AND GRAIN YIELD OF WHEAT VARIETIES WITH CONTRASTING GRAIN PROTEIN CONCENTRATION. *Journal of Plant Nutrition* [online]. 2010, **33**(11), 1681-1695 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1080/01904167.2010.496891. ISSN 0190-4167. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904167.2010.496891

[31] KLÍR, Jan a Lada KOZLOVSKÁ. *Zemědělské hospodaření ve zranitelných oblastech: certifikovaná metodika pro praxi* [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012 [cit. 2017-04-17]. ISBN 978-80-7427-123-6. Dostupné z: https://www.vurv.cz/sites/File/metodika%20ZOD%20NS%202012.pdf

[32] RYCHTER, Rostislav a Pavel RYAN. *Výživa a hnojení obilnin* [online]. In: . AF MZLU v Brně, b.r. [cit. 2017-05-14].

[33] PALÍK, Slavoj. *Metodika pěstování ozimé pekárenské pšenice*. První. Kroměříž: Agrotest fyto, 2009. ISBN 9788086888071.

[34] LYNCH, Patrick. *2016 Climate Trends Continue to Break Records*. b.r. Dostupné také z: https://www.nasa.gov/feature/goddard/2016/climate-trends-continue-to-break-records

[35] *Globally Averaged CO2 Levels Reach 400 parts per million in 2015* [online]. World meteorological organization, 2016 [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: https://public.wmo.int/en/media/press-release/globally-averaged-co2-levels-reach-400-parts-million-2015

[36] MANN, Michael E., Stefan RAHMSTORF, Kai KORNHUBER, Byron A. STEINMAN, Sonya K. MILLER a Dim COUMOU. Influence of Anthropogenic Climate Change on Planetary Wave Resonance and Extreme Weather Events. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**, 45242- [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1038/srep45242. ISSN 2045-2322. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/srep45242

[37] LI, Yong, Y. YIN, Q. ZHAO a Z. WANG. Changes of Glutenin Subunits due to Water–Nitrogen Interaction Influence Size and Distribution of Glutenin Macropolymer Particles and Flour Quality. *Crop Science* [online]. 2011, **51**(6), 2809- [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.2135/cropsci2011.01.0009. ISSN 0011-183x. Dostupné z: https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/51/6/2809

[38] JOHANSSON, Eva, M. PRIETO-LINDE a J.O. JONSSON. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chemistry* [online]. 2001, **78**(1), 19-25 [cit. 2017-06-14]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/profile/Eva_Johansson7/publication/228425307_Effects_of_Wheat_Cultivar_and_Nitrogen_Application_on_Storage_Protein_Composition_and_Breadmaking_Qualitylinks/0deec536c8bd264d98000000/Effects-of-Wheat-Cultivar-and-Nitrogen-Application-on-Storage-Protein-Composition-and-Breadmaking-Quality.pdf

[39] WIESER, Herbert a Werner SEILMEIER. The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. London: John Wiley, 1998, **76**(1), 49-55 [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199801)76:149::AID-JSFA9503.0.CO;2-2. ISSN 00225142. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(199801)76:1%3c49::AID-JSFA950%3e3.0.CO%3b2-2/full

[40] SINGH, Sandeep, G. SINGH, P. SINGH a N. SINGH. Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat varieties. *Food Chemistry* [online]. 2008, **108**(1), 130-139 [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.054. ISSN 03088146. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460701093X

[41] DAI, Zhongmin, Y. YIN, Y. LI, L. CAO a Z. WANG. Variation of high-molecular-weight glutenin subunits and glutenin macropolymer particle distribution in wheat grains produced under different water regimes. *The Crop Journal* [online]. 2013, **1**(1), 84-89 [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.1016/j.cj.2013.07.001. ISSN 22145141. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214514113000020

[42] JIANG, Dong, H. YUE, B. WOLLENWEBER et al. Effects of Post-Anthesis Drought and Waterlogging on Accumulation of High-Molecular-Weight Glutenin Subunits and Glutenin Macropolymers Content in Wheat Grain. *Journal of Agronomy and Crop Science* [online]. 2009, **195**(2), 89-97 [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.1111/j.1439-037X.2008.00353.x. ISSN 09312250. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-037X.2008.00353.x

8. SEZNAM ZKRATEK

N	anorganický dusík
NIR	Near-infrared spectroscopy
HMW GS	High molecular weight glutenin subunit
LMW GS	Low molecular weight glutenin subunit
DNA	deoxyribonucleic acid
MAS	Marker Assisted Selection
PRC	Polymerase Chain Reaction
NASA	National Aeronautics and Space Administration
WMO	World Meteorological Organization
AV ČR	Akademie věd České republiky