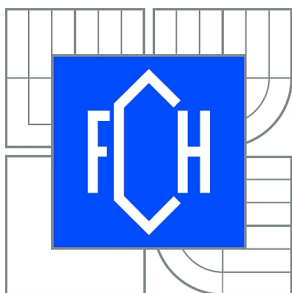




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA OBSAH PROTEINŮ GLIADINOVÉ FRAKCE U OZIMÉ PŠENICE

IMPACT OF ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION ON PROTEIN CONTENT OF
GLIADIN FRACTION IN WINTER WHEAT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. DOMINIKA HAMŘÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0900/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Dominika Hamříková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah proteinů gliadinové frakce u ozimé pšenice

Zadání diplomové práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na složení a obsah lepkových bílkovin u pšenice seté. Zvláště se zaměřit na změny v obsahu gliadinů, které jsou hlavní příčinou celiakie.

V experimentální části sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah proteinů gliadinové frakce v interakci s dusíkatou výživou, suchem a UV zářením.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Dominika Hamříková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byl sledován obsah proteinů gliadinových frakcí ozimé pšenice (*Triticum aestivum*) odrůdy Bohemia pěstované v podmínkách normální (AC) a zvýšené (EC; 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) koncentrace oxidu uhličitého. Kromě toho byla polovina vzorků hnojena dusíkem v množství 200 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Dalšími pozorovanými environmentálními faktory bylo sucho a UV záření. Gliadinové proteiny byly separovány metodou A-PAGE a kvantifikovány počítačovou denzitometrií. Obecně se měnil obsah proteinů v rámci frakcí ω -, β - a α -gliadinů, zatímco u γ -gliadinů nebyl zjištěn žádný nebo téměř žádný významný rozdíl. Jednoznačně největší vliv na obsah gliadinových proteinů měl dusík, který průkazně zvyšuje množství proteinů v pšeničném zrně. Nejvíce subfrakcí reagovalo za podmínek AC, sucha a bez UV záření a za podmínek EC s přirozenými srážkami a UV zářením. Významná byla také interakce dusíku s UV zářením (AC, sucho) i s jeho vyloučením (EC, sucho). Interakce dusíku a přirozených srážek významně zvýšila obsah proteinů za podmínek AC bez UV záření a za podmínek EC s UV zářením. Samotná EC i EC v interakci s jinými faktory se projevila v malé míře. EC s dusíkatou výživou (sucho bez UV záření) zvýšily obsah gliadinových proteinů a EC se současným vyloučením dusíkaté výživy (sucho i přirozené srážky s UV zářením) obsah proteinů snížila.

ABSTRACT

In this diploma thesis protein content of gliadin fractions in winter wheat (*Triticum aestivum*) var. Bohemia was studied. The crop was cultivated in conditions with ambient (AC) and elevated (EC; 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) carbon dioxide concentration. Moreover, half of the samples was fertilized with nitrogen in an amount of 200 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Other observed environmental factors were drought and UV radiation. The gliadin proteins were separated by A-PAGE method and quantified by computer densitometry. Generally the protein content within ω -, β - and α -gliadin fractions varied, while the protein content of γ -gliadins remained unchanged or almost unchanged. Clearly the nitrogen fertilization had the most pronounced impact on the gliadin protein content and it significantly increased the protein content in wheat grain. Most subfractions reacted in conditions of AC, drought and without UV radiation and in conditions of EC with natural rainfall and UV radiation. The interaction of nitrogen fertilization with UV radiation (AC, drought) was significant and so was the interaction of nitrogen fertilization excluding UV radiation (EC, drought). The interaction of nitrogen fertilization and natural rainfall significantly increased the protein content in conditions of AC without UV radiation and in conditions of EC with UV radiation. EC alone and the interaction of EC with other factors had only a small impact. The impact was the most pronounced in interaction with nitrogen fertilization. EC with nitrogen fertilization (drought without UV radiation) increased the gliadin protein content and EC excluding nitrogen fertilization (drought and natural rainfall with UV radiation) decreased the protein content.

KLÍČOVÁ SLOVA

ozimá pšenice, gliadiny, zvýšená koncentrace oxidu uhličitého, dusíkaté hnojení, A-PAGE

KEYWORDS

winter wheat, gliadins, elevated carbon dioxide concentration, nitrogen fertilization, A-PAGE

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

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Velice ráda bych tímto poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, podporu a veškerou pomoc při psaní této práce a také panu Ing. Karlu Klemovi, Ph.D. za skvělou spolupráci během konzultací dané problematiky.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Změny klimatu	9
2.1.1	Co je to změna klimatu	9
2.1.2	Změny klimatu v historii Země	9
2.1.3	Skleníkový efekt	10
2.1.4	Změny koncentrace CO ₂	10
2.2	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	12
2.2.1	Minerální výživa.....	12
2.3	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na pšenici	13
2.3.1	Rozdíly mezi kultivary	13
2.3.2	Vliv minerálních živin	13
2.4	Pšeničné proteiny	15
2.4.1	Albuminy a globuliny	15
2.4.2	Lepek	16
2.5	Lepek a zdraví.....	21
2.6	Metody stanovení lepkových proteinů.....	23
2.6.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	23
2.6.2	ELISA	26
2.6.3	Hmotnostní spektrometrie	27
3	Experimentální část	29
3.1	Materiál	29
3.2	Stanovení obsahu lepkových proteinů metodou A-PAGE.....	30
3.2.1	Přístroje.....	30
3.2.2	Chemikálie.....	30
3.2.3	Příprava roztoků	30
3.2.4	Příprava polyakrylamidového gelu.....	31
3.2.5	Příprava vzorku.....	31
3.2.6	Elektroforéza	31
3.2.7	Fixace a vizualizace bílkovin	31
3.2.8	Vyhodnocení gelů.....	32
3.2.9	Statistické zpracování výsledků.....	32
4	Výsledky.....	33

4.1	Korelační analýza.....	48
5	Diskuse.....	51
6	Závěr.....	54
7	Seznam použitých zdrojů	55
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	65
9	Přílohy	66
9.1	Grafy korelační analýzy	66

1 ÚVOD

Zvyšování koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře je běžný jev, ale současná rychlost nárůstu jeho koncentrace je fenoménem zhruba posledních dvou set let, na čemž má největší podíl činnost člověka. Nejedná se však o problematiku jednoho kritéria, nýbrž o souhru několika faktorů najednou, které svým působením zvyšují koncentraci CO₂ v atmosféře. Tento zdánlivě neškodný plyn se z velké části podílí na změně globálního klimatu naší planety. Ta zahrnuje nejen zvyšování teploty ovzduší, ale také s ní související změny obvyklých meteorologických jevů atp.

Jelikož je oxid uhličitý substrátem, ze kterého rostliny vytváří svou biomasu při fotosyntéze, je jasné, že jeho dostupnost bude ovlivňovat rostliny různými způsoby. Primárně se mění rychlost fotosyntézy, rychlost dýchání, zvyšuje se tvorba biomasy. Kromě toho se ale předpokládá i změna chemického složení rostlinných pletiv, což zahrnuje obsah sacharidů, dusíku a bílkovin. Efekt zvýšené koncentrace CO₂ na rychlost fotosyntézy určuje příjem a obsah minerálních živin a naopak dostupnost živin ovlivňuje míru působení CO₂.

Existuje velká spousta rostlin, jež může být předmětem zkoumání. Je třeba však věnovat pozornost hlavně hospodářským plodinám, které mají funkci zabezpečit výživu lidstva. Pšenice je považována za nejkonzumovanější obilninu na světě. Většina světové produkce je zkonsumována ve formě chleba a jiných pekařských výrobků, těstovin a nudlí. Hlavní proteinovou složkou pšeničných zrn je lepek. Je to bílkovinný komplex tvořený dvěma skupinami proteinů, a to gliadiny a gluteniny, jež jsou zásobními proteiny pšenice. Díky jejich jedinečným funkčním vlastnostem může být vytvořeno těsto pro výrobu kynutého chleba.

Kromě vynikajících funkčních vlastností mají lepkové proteiny i svou stinnou stránku. U geneticky citlivých jedinců mohou mít některé frakce vliv na zdraví. Způsobují totiž různé druhy alergií a intolerancí, například celiakii.

Tato diplomová práce se zabývá stanovením obsahu proteinů gliadinové frakce u ozimé pšenice, která byla pěstována při normální a zvýšené koncentraci CO₂ s dalšími interakcemi environmentálních faktorů, jako je dusíkaté hnojení, sucho a UV záření. Pro stanovení gliadinů byla použita kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE). Cílem bylo zjistit, jak se mění zastoupení jednotlivých podjednotek gliadinové frakce v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ a ostatních faktorů a případně, jak se jednotlivé faktory svým působením ovlivňují navzájem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Změny klimatu

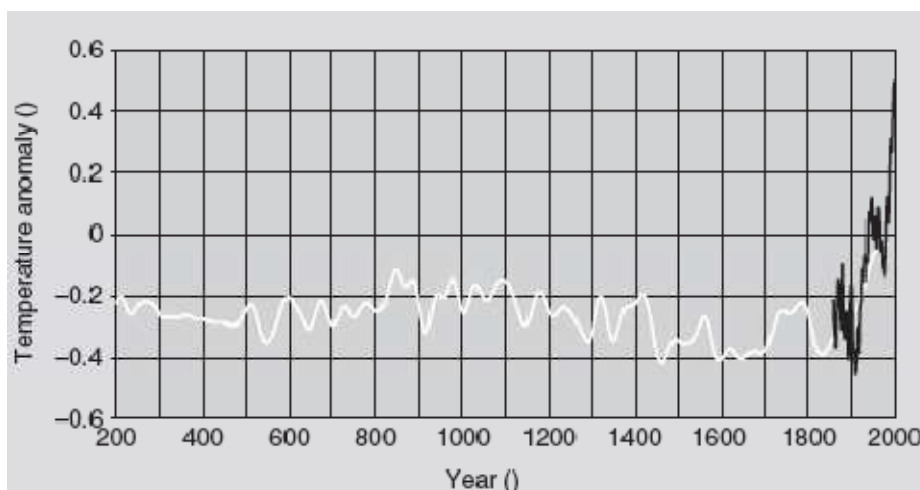
2.1.1 Co je to změna klimatu

Změnou klimatu je myšlena změna meteorologických podmínek trvající několik let, či déle. Může se týkat změny jednoho parametru (např. teplota, srážky), avšak častěji je tato problematika mnohem komplexnější. Ve spojení s globálními vzory počasí mohou tyto změny vyvolat vyrovnávající změny v různých částech světa, ale častěji jsou součástí celkového oteplování nebo ochlazování globálního klimatu [1]. Krauchi [2] popsal globální klimatickou změnu jako “dlouhodobou odchylku klimatických parametrů Země od průměrů a trendů, které charakterizovaly planetu přibližně do počátku 20. století”.

2.1.2 Změny klimatu v historii Země

Změny klimatu Země nejsou novým úkazem. Geologické studie říkají, že doby ledové a meziledové se střídaly s periodou 103, 42 a 24 tisíc let [2].

Autoři z COHMAP (Cooperation Holocene Mapping Project) [3] uvádí, že změny klimatu některých lokalit Země v uplynulých 18 000 letech se odvíjí od změn slunečního záření dopadajícího na vnější povrch naší atmosféry. Dále pak vyvozují závěry, že archeologicky prokázané počátky rozvoje zemědělství spadají do klimaticky příznivého období před 10 000 až 12 000 lety. V současné době se však děje to, že člověk mění klima planety svou vlastní činností. Posledních 30–40 let dokazuje, že existence a činnost naší civilizace dosáhly tak velkých rozměrů, že zasahují jak do vztahů jednotlivých typů ekosystémů, tak také do ekosystému globálního [4]. Rovnováhu systému narušuje rozvoj průmyslové a zemědělské produkce, lesnictví a dopravy. Tento vliv naší populace dokládají zprávy programu Evropské unie Životní prostředí a klima, který je součástí Programu konvence OSN o klimatických změnách. V současné době je rychlost uvolňování skleníkových plynů několikanásobně vyšší, než byly přirozené změny v období posledních 20 000 let [5].



Obr. 1 Povrchová teplota v průběhu posledních dvou tisíciletí [1], [6]

Obr. 1 ukazuje, že teplota 20. století je nejvyšší za poslední dvě tisíciletí. Nedávný nárůst globální teploty a posuny v regionálních srážkách jsou ale jen jednou z částí obav, které vyvolává měnící se klima. Burroughs [1] píše, že z hlediska hospodářského dopadu bude nejškodlivějším důsledkem výrazný nárůst extrémních meteorologických jevů.

2.1.3 Skleníkový efekt

Skleníkový efekt je jev, při kterém záření snadno prostupuje atmosférou a jakmile se půda a přilehlý vzduch ohřejí, turbulentní pohyb vzduchu neodstraní teplo příliš rychle. Protože se hustota atmosféry rapidně snižuje s rostoucí nadmořskou výškou, absorpce zemního záření probíhá hlavně blízko povrchu. Jestliže koncentrace radiačně aktivních plynů v atmosféře vzrůstá a množství solární energie absorbované na povrchu zůstává nezměněné, nejnižší hladina atmosféry se ohřeje. Toto oteplování je výsledkem absorpce nižší atmosférou a následně emise více infračerveného záření nahoru i dolů. Pro dosažení rovnováhy se naopak horní atmosféra ochlazuje [1]. Skleníkové plyny ovlivňují radiační bilanci Země a to tak, že propouští krátkovlnné záření, ale mnohem méně propouští dlouhovlnné záření, které je emitováno povrchem Země [4]. Právě změna složek tvořících atmosféru mění absorpční vlastnosti a to pak narušuje rovnovážnou bilanci záření a mění se klima [7]. Každý plyn se na oteplování podílí jinou mírou. Nejdůležitější je oxid uhličitý (cca 47 %), methan (27 %), freony (10 %), oxid uhelnatý a další sloučeniny uhlíku (9 %) a oxid dusný (4 %) [4]. Nezáleží však jen na jejich zastoupení v atmosféře, ale také na jejich účinnosti. Proto i nízké koncentrace některých plynů mohou značně přispívat k absorpci dlouhovlnného záření [7]. Většina syntetických plynů absorbuje mnohem více než srovnatelné množství CO_2 . Podle matematického modelu [8] pokud se zvýší teplota díky zvýšené koncentraci CO_2 , efekt se ještě zvýší působením vodní páry, která má stejnou funkci jako skleníkové plyny. Při vyšší teplotě se voda více vypařuje a tím se zvyšuje obsah vody v atmosféře. Oteplení ale nebude po celé planetě stejné – nejsilnější bude efekt v okrajových částech zaledněné plochy ve větších zeměpisných šířkách a na druhou stranu ve středních zeměpisných šířkách by mělo být větší sucho.

Důležité je tedy porozumět důsledkům nárůstu radiačně aktivních plynů v atmosféře a to hlavně díky lidské činnosti, protože jejich globální koncentrace rapidně narůstá od poloviny 18. století, tedy od začátku industrializace [7]. Dýchání, vulkanická činnost a jiné přirozené procesy spojené s vylučováním CO_2 do atmosféry jsou v rámci ekosystému dlouhodobě v rovnováze [4].

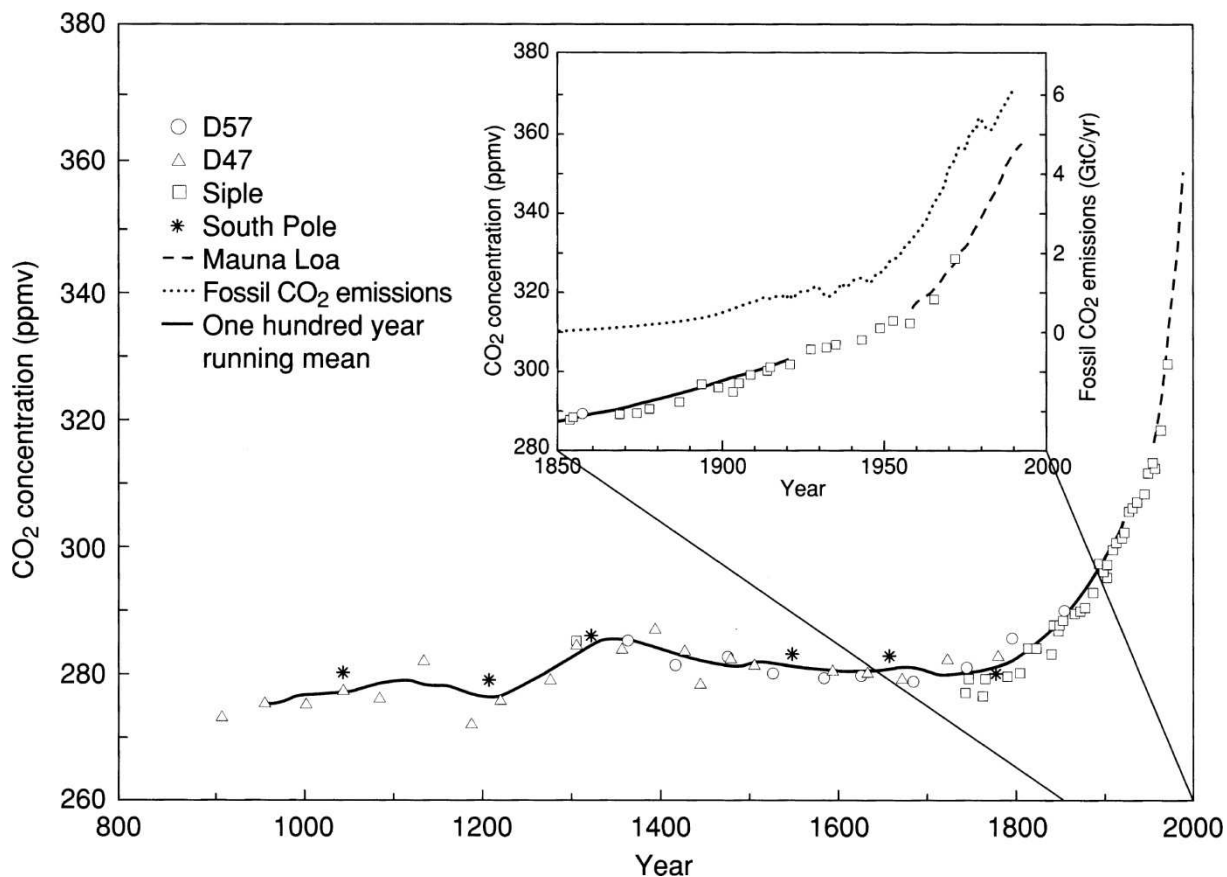
2.1.4 Změny koncentrace CO_2

To, že se zvyšuje koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře, je jasný fakt. Jaké jsou ale podíly jeho zdrojů na této změně? Nejednoznačné jsou i dopady, jež se musí objevit díky jeho působení, ať už se bude měnit počasí na naší planetě, růst rostlin nebo celkově život lidí [7]. Nejproblematictější z hlediska produkce CO_2 je spalování fosilních paliv, dále rozsáhlé kácení lesů zejména v tropických oblastech (cca 15–20 % celkových emisí) a změny využívání půdy [9].

Přechod mezi dobou ledovou a meziledovou a nástup doby ledové jsou spojeny se značným snížením nebo zvýšením koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře a s ním související změnou teploty [10]. Změny koncentrace CO_2 tedy nejsou neobvyklý jev. Problém

je s narůstající rychlostí těchto změn, která způsobuje, že rostliny nestačí přiměřeně reagovat přizpůsobením svých vlastností [7].

Pokud bychom se ohlédli do dávné historie, v období 18 000 až 10 000 př. n. l. koncentrace CO_2 v atmosféře kolísala kolem hodnot 200–280 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a za posledních 650 000 let nikdy nepřevýšila 310 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ [11]. Zatímco před průmyslovou revolucí v polovině 18. století se koncentrace CO_2 pohybovala v rozmezí 270–280 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, Borroughs [1] ve své publikaci uvádí, že hodnota koncentrace CO_2 v roce 2005 činila 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. A o pět let později pak stoupla na 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, jak uvádí Canadell et al. [12]. Ti dále popisují, jak se měnily roční nárůsty koncentrace CO_2 . Zatímco v letech 1970–1979 byl nárůst 1,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, později v období 2000–2006 už nárůst činil 1,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Podle NOAA (National Oceanic & Atmospheric Administration) [13] se současná koncentrace blíží hodnotě 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Hönlisch et al. [14] tvrdí, že současná hladina nemá obdoby za posledních 2,1 milionu let. Názorný je obr. 2, který ukazuje průběh koncentrace za posledních cca 1 000 let.



Obr. 2 Časová závislost koncentrace oxidu uhličitého. [1]

S měnící se koncentrací CO_2 dochází také nejen ke zvyšování koncentrace dalších skleníkových plynů, ale také se zvyšuje depozice dusíku jednak z hnojiv používaných v zemědělství a z produktů spalování. Tato depozice se pohybuje v rozmezí 10–150 kg/ha v závislosti na lokalitě [15]. Proto je třeba počítat se zvýšenou dostupností uhlíku i dusíku. Vzhledem k tomu, že ve většině přirozených ekosystémů je nedostatek dusíku limitujícím faktorem, lze očekávat příznivý vliv na rychlost fixace CO_2 a růst rostlin díky narůstající

depozici dusíku [7]. Holland et al. [16] podle matematických modelů vyvodili, že celková depozice dusíku zvyšuje roční fixaci uhlíku suchozemským porostem o 1,5–2,0 Gt.

2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

Biosféra působí zejména prostřednictvím fotosyntézy jako základní kontrola nad úrovní oxidu uhličitého v atmosféře. Jedná se o dočasný sink (úložiště) pro podíl dodatečného CO₂ vloženého do atmosféry skrze uhlíkový cyklus. Protože produktivita biosféry roste se zvyšující se hladinou CO₂, zpomaluje se nahromadění plynu v atmosféře. Tento mechanismus se uplatnil jako hlavní dopad na dřívější klima a je faktorem oddálení některých následků emisí skleníkového plynu díky spalování fosilních paliv [1].

Přímé účinky zvýšené koncentrace CO₂ se však projevují nejen změnami rychlosti fotosyntézy, ale také fotorespirace a vodivosti průduchů a v neposlední řadě dochází ještě k významným interakcím mezi danými procesy [7]. Například snížení obsahu dusíku způsobuje změnu růstové a udržovací složky dýchání nebo snížení vodivosti průduchů, jež zlepšuje vodní bilanci rostlin, může oddálit vodní deficit během poledne a prodloužit denní fázi s pozitivní fotosyntetickou bilancí. Navíc kromě nárůstu biomasy se i předpokládá změna biochemického složení rostlinných pletiv [17], a to vyšší obsah sacharidů, menší obsah dusíku a bílkovin a z toho vyplývající vyšší poměr C/N [18].

2.2.1 Minerální výživa

Při fotosyntéze se tvoří prekurzory uhlíkatých struktur, na které se pak váží některé minerální živiny a také se produkují redukované kofaktory (NADPH) a energie ve formě ATP. Tyto molekuly jsou důležité pro aktivní příjem živin a jejich akumulaci [7]. Efekt zvýšené koncentrace CO₂ na rychlost fotosyntézy určuje také příjem a obsah minerálních živin a naopak dostupnost živin ovlivňuje míru působení CO₂ na fotosyntézu a produkci rostlin.

Biogenní živiny jsou navzájem nenahraditelné, ale i přes to má jedinečné postavení dusík. Jeho koncentrace je v rostlinách nejvyšší a je obsažen ve všech proteinech. Dostupnost dusíku je v různých lokalitách odlišná, a tak je třeba počítat jak s nedostatkem, tak s přebytkem. Důležitá role dusíku v rostlinách pro tvorbu a hromadění organických látek ovlivňuje hodnocení interakce zvýšené hladiny CO₂, příjmu dusíku a tvorby organických látek. Během akumulace sušiny v obilkách, tzv. generativní fáze růstu, může docházet k urychlenému rozkladu enzymů, např. Rubisco, jež zajišťuje fixaci atmosférického CO₂, vlivem nedostatečné zásoby dusíku ve vegetativních orgánech. Důsledkem by mohlo být to, že se více omezí růst výnosů, které by byly dosaženy při dobré dostupnosti dusíku po celou dobu vegetace [7].

Luo et al. [19] uvádí, že zvýšením koncentrace CO₂ se zvyšuje rychlost jeho fixace a zároveň se snižuje obsah enzymu Rubisco, obsah dusíku v listech klesá o 15–20 %. Jednak se obsah dusíku „naředí“ vyšším obsahem sacharidů, ale také se snižuje množství fotosyntetických bílkovin. Tím se zvyšuje účinnost využití dusíku rostlinami. BassiriRad et al. [20] ze svých experimentů vyvozují, že obecně popisované snížení dusíku v rostlinách pěstovaných v atmosféře se zvýšenou koncentrací CO₂ je způsobeno neschopností kořenů adaptovat se na zvýšené požadavky dusíku.

Dijkstra et al. [18], kteří zkoumali ozimou pšenici, uvádějí, že koncentrace dusíku v sušině se snížila o 5 %, ale vychytávání dusíku na plošnou jednotku půdy bylo při působení zvýšené koncentrace CO₂ vyšší o 11 %.

Nátr [7] ve své publikaci jednoduše shrnuje, že růst rostlin a jejich výnosy nejsou ovlivňovány jedním parametrem, ale míra účinku zvýšené koncentrace CO₂ se odvíjí od působící energie záření, dostupnosti vody, minerálních látek, teploty atd. Zároveň píše, že výnos kulturních rostlin je dán genotypem, průmyslovým hnojením, dostatkem vody a opatřením proti chorobám, škůdcům a plevelům.

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na pšenici

Někdy je těžké zobecnit některé zákonitosti, jimiž se řídí růst rostlin. Variabilita rostlin je vysoká, liší se specifitou struktur, podmínkami růstu a občas se mohou výsledky lišit u jiné odrůdy příslušného druhu. Proto je třeba blíže specifikovat i námi studovanou pšenici setou. Jedná se o velmi významnou plodinu podílející se na výživě lidstva, a proto si zaslouží velkou pozornost [7].

Jablonski et al. [21] provedli meta analýzu studií týkajících se vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na semenné rostliny a obilniny, včetně koncentrace dusíku v semenech a došli k závěru, že růst při zvýšené koncentraci CO₂ má za následek významné snížení dusíku v obilkách pšenice a ječmene, ale naopak nikoli u sóji a rýže.

2.3.1 Rozdíly mezi kultivary

V roce 1997 sledovali Batts et al. [22], jak se mění vývoj a fotosyntetické charakteristiky porostů u dvou kultivarů pšenice v atmosféře se zvýšenou koncentrací CO₂. Rozdíly mezi kultivary byly zjištěny pouze na počátku vegetačního období. Lišily se od sebe průběhem vývoje a rozdílným odnožováním. Po zbytek vegetace byly reakce hodně podobné. Zvýšená koncentrace CO₂ vyvolává intenzivnější odnožování, což se projeví větší hustotou porostu a větší absorpcí záření.

Manderscheid a Weigel [23] porovnávali 6 kultivarů jarní pšenice obecné v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ se zaměřením na růst a fyziologické charakteristiky, přičemž nebyl zjištěn vliv na rychlost fotosyntézy ani na obsah bílkovin nebo obsah chlorofylu v listech. Došlo ke zvětšení plochy listů a také byl zjištěn pozitivní vliv na hmotnost sušiny u starších kultivarů. U obilky činilo toto navýšení 46 %. U nových kultivarů to bylo pouze 28 %.

2.3.2 Vliv minerálních živin

Monje a Bugbee [24] sledovali fotosyntetické charakteristiky porostu pšenice při normální a zvýšené koncentraci CO₂ a dostatku minerálních živin, a sledovali fotosyntetické charakteristiky porostu. U rostlin pěstovaných ve zvýšené koncentraci CO₂ byl výnos zrn o 13 % vyšší a také se zvýšil podíl hmotnosti sušiny kořenů z celkové hmotnosti. Jejich závěrem je, že pokud mají rostliny optimální podmínky pro pěstování, vyšší koncentrace CO₂ zvýší sílu sinku a následně se zrychlí fotosyntéza. Předpokládá se, že dostatečně velký sink zabráni zpětnovazebné inhibici fotosyntézy při dlouhodobém působení CO₂.

Wolfův experiment [25] byl zaměřen na sledování parametrů pšenice pěstované při různé dostupnosti dusíku, fosforu a draslíku a tyto varianty byly navíc vystaveny zvýšené

koncentraci CO₂. Deficit dusíku způsobil značné snížení vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na hmotnost sušiny a podobně se zvýšila i hmotnost sušiny obilek. U většiny variant byl pak také zaznamenán snížený obsah živin vlivem zvýšené koncentrace CO₂, přičemž nejvýraznější rozdíl byl v obilkách.

Fangmeier et al. [26] posuzovali vliv zvýšené koncentrace CO₂ a dávek ozonu a dusíku na koncentraci nutričních prvků a kvalitu zrna u jarní pšenice. V zelených listech se snížil obsah všech prvků (kromě fosforu a železa), ale v zrně se snížil pouze obsah dusíku, vápníku, síry a železa. V důsledku zvýšené koncentrace CO₂ se snížila poptávka po dusíku v zelených tkáních, ale také se zvýšila účinnost jeho využití. Mohlo za to především snížení obsahu Rubisco a represe fotorespirační dráhy a snížená alokace dusíku pro enzymy pohánějící cyklus fotosyntetické oxidace uhlíku. Příjem dusíku tedy neodpovídal příjmu uhlíku. Autoři to vysvětlili tak, že pokud je příjem dusíku z půdy ukončen již po výkvětu, dusík určený zrně pochází z vegetativních fondů způsobujících snížení koncentrace dusíku v zrně při obohacení atmosféry CO₂ (15 %).

Taub et al. [27] udávají pokles proteinů v pšeničném zrně v důsledku zvýšené koncentrace CO₂ o 9,8 %. Účinek zvýšené koncentrace CO₂ byl ovlivněn proměnnými životního prostředí. Například množství proteinů se snížilo více, když byla vyšší koncentrace CO₂ aplikována na rostliny pěstované při nízkých dávkách dusíku, než při vyšších dávkách (16,4 %, resp. 9,8 %). Dále byl zjištěn větší vliv zvýšené koncentrace CO₂ na celé zrně než na pšeničnou mouku, což znamená, že zvýšená koncentrace CO₂ může mít menší vliv na koncentraci proteinů v endospermu než v jiných částech zrna. Dopad na výživu lidí by se tedy mohl lišit podle toho, zda se konzumují výrobky z celých zrn nebo z bílé mouky. Rozdíly mohly nastat v důsledku velmi rozdílných akumulčních modelů strukturních a metabolických proteinů aleuronu a klíčku ve srovnání s hlavními zásobními proteiny endospermu. V pšeničném zrně se strukturní a metabolické proteiny během vývoje obilek akumulují dříve než hlavní zásobní proteiny [28]. Také se zdá, že akumulace strukturních a metabolických proteinů v obilkách je regulována sinkem, zatímco akumulace zásobních proteinů je do značné míry omezena zdrojem dusíku rozvíjejícího se zrna. Z toho plyne předpoklad, že vliv zvýšené koncentrace CO₂ na bílkovinnou výživu člověka by mohl být zmírněn zemědělskými postupy.

Idso a Idso [29] tvrdí, že veškeré účinky zvýšené koncentrace CO₂ na obsah proteinů v plodinách by se mohly zlepšit zvýšeným používáním dusíkatých hnojiv. Výsledky z Taubovy studie [27] ukazují, že zvyšující se množství dusíku v půdě minimalizuje vliv zvýšené koncentrace CO₂ na množství proteinů, ale přesto se i při vysokém přídávku dusíku obsah proteinů snížil téměř o 10 %. Jeho závěry říkají, že i když by bylo možné hnojivo použít ke zmírnění dopadů zvýšené koncentrace CO₂ v atmosféře, nelze ho považovat za univerzální řešení z důvodu ekologických dopadů na ekosystémy a malé dostupnosti hnojiv pro zemědělce v mnoha zemích.

Proteiny jsou nejdůležitější složkou pšeničných zrn zabezpečující kvalitu konečného využití. Změny obsahu a složení pšeničných proteinů významně určují kvalitu mouky pro pekařské účely. Přestože proteinové složení závisí zejména na genotypu pšenice, může být do značné míry ovlivněno environmentálními faktory a jejich interakcemi [28].

Fangmeier et al. [26] uvádí, že s rostoucí koncentrací CO₂ se výrazně snížily hodnoty Zeleného testu, čísla poklesu a obsah suchého a mokrého lepku. I přes příznivý dopad CO₂ na

růst a výnos C3 rostlin, resp. obilnin, bude v budoucnu problémem se snižováním kvality mouky v důsledku zvyšování koncentrace CO₂ v atmosféře.

Novotná et al. [30] porovnávali vliv několika růstových faktorů na pšenici současně. Zvýšená koncentrace CO₂ zvýšila jednak nadzemní biomasu a také výnos zrna. Hnojení dusíkem s vyloučením UV radiace pak umocnilo stimulační efekt zvýšené koncentrace CO₂. Naopak sucho zmírnilo vliv zvýšené koncentrace CO₂. Kromě toho zvýšená koncentrace CO₂ snížila některé kvalitativní parametry (obsah proteinů nebo Zeleného testu).

2.4 Pšeničné proteiny

Pšeničné zrno se skládá ze tří hlavních částí. Těmi jsou obalové vrstvy, klíček a endosperm. Obalové vrstvy (otruby) jsou tvořeny z velké části z nerozpustných polysacharidů, jako je celulóza, které slouží jako zdroj vlákniny. Klíček představuje zárodek, ze kterého vyroste nová rostlina. Nese genetické informace a má vysoký podíl tuku. Největší podíl zrna tvoří endosperm. Je zdrojem zásobních látek pro rostlinu ve fázi klíčení. Z velké části obsahuje škrob (cca 3/4) [31], ale tou nejdůležitější částí jsou bílkoviny. Ty jsou v endospermu zastoupeny 10–13 % [32]. Proteiny jsou ve svém složení a v molekulových hmotnostech vysoce heterogenní. Obsah a jejich kvalita je stěžejní pro pekařskou kvalitu pšeničné mouky.

Podle nedávné studie [33] se obsah celkových proteinů v genotypech běžné pšenice (*Triticum aestivum*) pohyboval od 10,87 do 13,04 % a u tetraploidní pšenice tvrdé (*Triticum durum*) od 11,46 do 16,53 %. Screening provedený Vogelem et al. [34] ovšem ukázal mnohem větší změny v obsahu proteinů, a to od 7 do 22 %, přičemž genetická složka představovala pouze cca 5 %. Větší část změn se vyskytovala v důsledku jiných (environmentálních) faktorů.

Molekulová hmotnost proteinů se obecně pohybuje v řádech tisíců až milionů Daltonů. Pšeničné proteiny mají 30 tisíc až víc než 10 mil. Daltonů [35]. Tím že pšeničné proteiny vykazují vysokou komplexitu a také různé vzájemné interakce, je ztížena celá charakterizace. Obvykle jsou klasifikovány podle rozpustnosti. Po Osbornově extrakci se získá velice heterogenní skupina zahrnující nelepkové proteiny (albuminy a globuliny) a lepkové proteiny (gliadiny a gluteniny). Lepkové proteiny se v přirozeném stavu vyskytují jako oligomery různých polypeptidů, které obsahují více než 35 % hydrofobních aminokyselinových zbytků (isoleucin, leucin, tryptofan, tyrosin, valin, fenylalanin a prolin) [36], přičemž 6–12 % pšeničných proteinů tvoří prolin [37].

2.4.1 Albuminy a globuliny

Albuminy a globuliny se řadí mezi nelepkové proteiny a většina je zapojena do metabolických procesů jako enzymy. Polymerní globuliny (triticiny) pak tvoří minoritní skupinu pšeničných zásobních proteinů (cca 5 % celkových proteinů) [38]. Podle studie Stehna et al. [39] provedené na českých kultivarech pšenice tvoří albuminy a globuliny 22,29–30,81 % z celkových proteinů. Molekulové hmotnosti této proteinové frakce, jak stanovili Žilič et al. [40], se pohybují v rozmezí 76,4–12,4 kDa, ovšem většina proteinů je menší než 25 kDa. Vyskytují se v monomerní formě, ale obsahují i polymerní proteiny, které jsou stabilizované meziřetězcovými disulfidickými vazbami [41]. Albuminy a globuliny se

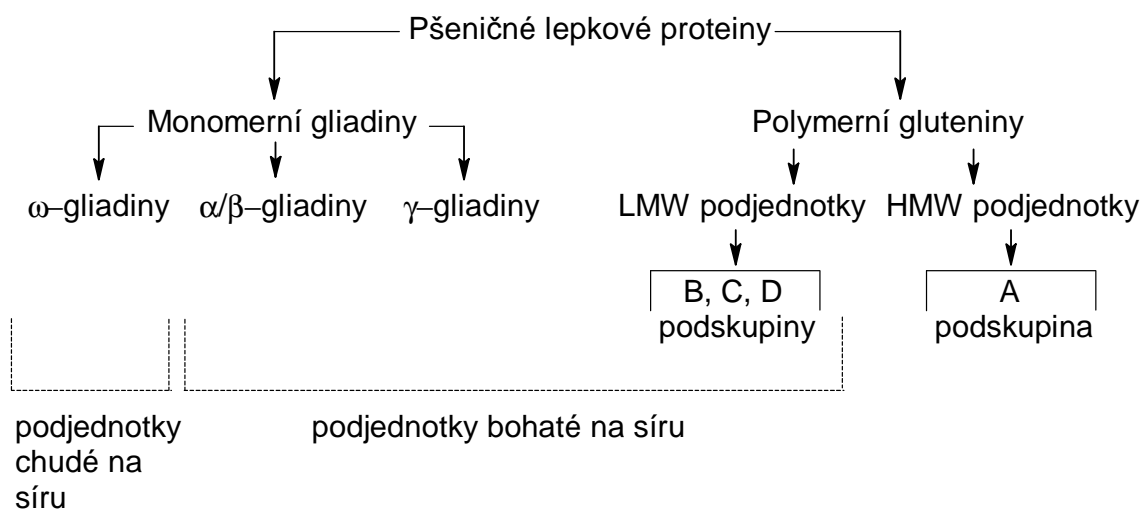
akumulují od výkvětu pšenice do cca 20. dne a potom zůstávají téměř na konstantní úrovni [28].

2.4.2 Lepek

Pšenice je mezi obilovinami jedinečná v tom, že mouka z pšenice obsahuje proteinový komplex, tzv. lepek. Díky němu má vypracované těsto reologické vlastnosti potřebné k výrobě kynutého chleba [42]. Dále uděluje těstu kapacitu absorbovat vodu, kohezivitu, viskozitu a elasticitu. Mezi běžné zdroje lepku patří velká spousta potravin. Lepek je rovněž významný vedlejší produkt při výrobě pšeničného škrobu a je takto celosvětově produkován v obrovském množství [43]. Jednou variantou pro jeho zpracování je enzymová hydrolýza, která se široce používá v potravinářském průmyslu pro zlepšení funkčních vlastností (rozpuštěnost, emulzifikace, schopnost tvořit filmy) nebo příprava silně hydrolyzovaných proteinů pro hypoalergenní diety a nutriční terapie.

Pojem lepek obecně odkazuje na příslušné proteiny pšeničného zrna. Ovšem někdy je nesprávně použit ve vztahu k jiným plodinám (např. kukuřičný lepek). Existuje také nutriční koncept tohoto pojmu, který odkazuje na rozsah proteinů způsobující různé potravinové intolerance. V tom případě pokrývá odpovídající proteiny z žita, tritikále, ječmene a možná ova [32].

Lepek obsahuje stovky proteinových složek, které existují buď ve formě monomerů nebo oligo- a polymerů, které jsou spojeny disulfidickými vazbami. Klasifikace lepkových proteinů je zobrazena ve schématu na obr. 3. Podle alternativní klasifikace se lepek také dělí na tři velké skupiny, a to proteiny bohaté na síru (α -, β -, γ -gliadiny a B-, C-LMW gluteniny), proteiny chudé na síru (ω -gliadiny a D-LMW gluteniny) a vysokomolekulární proteiny (HMW gluteniny).



Obr. 3 Klasifikace lepkových proteinů [44]

Gliadiny a gluteniny jsou považovány za hlavní zásobní proteiny pšenice, které, jak se zdá, nemají žádnou jinou funkci než zajistit rezervu aminokyselin pro rozvíjející se rostlinu během klíčení [32]. Tím, že jsou nerozpustné ve vodě, nemohou být při klíčení rozpuštěny a odvedeny pryč.

Tvoří cca 60–90 % celkových proteinů v zrna a jsou zpravidla bohaté na asparagin, glutamin, arginin a prolin a naopak obsahují velmi málo lysinu, tryptofanu a methioninu [45]. Cystein sice patří mezi minoritní aminokyseliny v lepku (cca 2 %), je ovšem považován za velmi důležitou součást struktury určující zároveň funkčnost lepku [46]. Většina cysteinu tvoří jednak disulfidické vazby mezi jednotlivými proteiny a také vazby v rámci jednoho řetězce (intramolekulární). Tvorba disulfidických vazeb v lepku probíhá i během zrání, kdy se zrno vysušuje a dokonce i při skladování, i když mnohem pomaleji [47]. Kovalentní struktura lepku je navíc spojená nekovalentními vazbami, jako jsou vodíkové vazby, iontové a hydrofobní interakce. I když jsou vodíkové vazby samy o sobě slabé, při tvorbě těsta se jich tvoří velké množství a zajišťují jeho stabilitu. Hydrofobní a iontové interakce se vyskytují v malém množství, ale hrají klíčovou roli při interakcích mezi polymery, což také podporuje stabilitu těsta [37].

Zásobní proteiny se akumulují cca od šestého dne po konec plnění zrna. Také bylo popsáno, že se gliadiny při plnění zrna hromadí dříve než gluteniny. Akumulace proteinových frakcí tedy neprobíhá současně, z čehož vyplývá mění se proteinové složení zrna během jeho vývoje. Důsledkem může být třeba to, že podmínky, které zkracují období plnění zrna, jako je vysoká teplota nebo sucho, ovlivňují rovnováhu proteinových frakcí. Triboi [28] ve své práci píše o vlivu vodního deficitu a jeho interakce s teplotou na akumulaci proteinových frakcí. Analýza kinetiky akumulace gliadinů a vysokomolekulárních a nízkomolekulárních gluteninů u zavlažovaných a nezavlažovaných polí neprokázala významný vliv sucha, avšak sucho zkrátilo období plnění zrna.

Je jasné, že rostlinná výživa má schopnost měnit složení lepku a že dostatek dusíkatých hnojiv nejspíš zvyšuje obsah proteinů. Randall a Wrigley [48] navrhují vysvětlení, že může být tato změna doprovázena nedostatkem síry podle toho, jaké bylo použito hnojivo. To by znamenalo úbytek proteinů bohatých na síru a větší podíl proteinů s nízkým obsahem síry, což jsou ω -gliadiny. Navíc se nejspíš zvyšuje podíl vysokomolekulárních podjednotek gluteninů na úkor proteinů bohatých na síru. Tento fakt musí dále vést k narušení rovnováhy lepkových proteinů v rámci každé frakce.

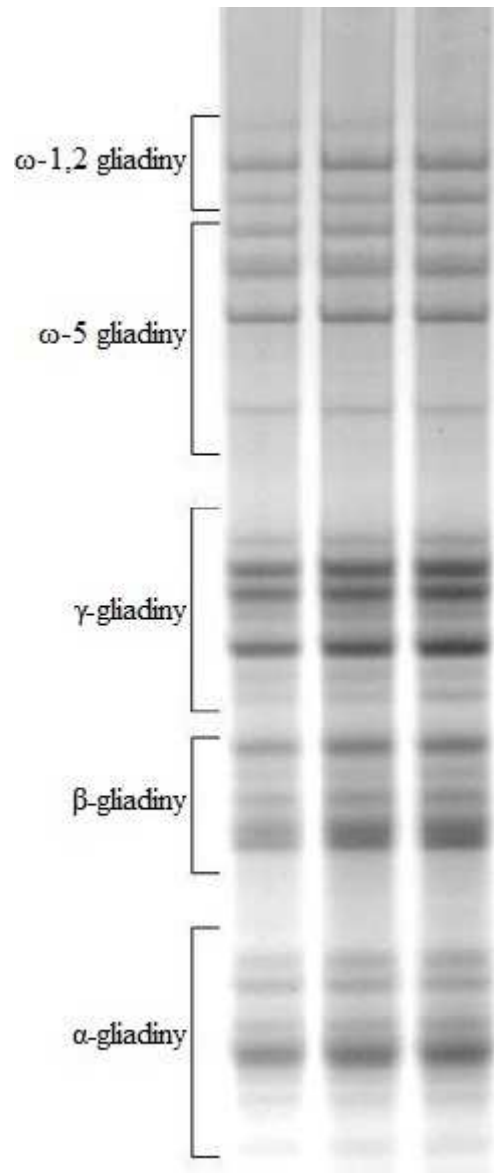
Poměr gliadinů a gluteninů jasně ovlivňuje mechanické vlastnosti těsta. Přesněji řečeno čím více gliadinů lepek obsahuje, tím nižší je odolnost těsta k natahování, zatímco tažnost je vyšší [49]. Polymerní glutenin je většinou zodpovědný za elasticitu těsta a monomerní gliadin je spojen s roztažností. Z toho vyplývá, že poměr těchto proteinů může přímo určovat rovnováhu síly těsta a roztažnosti [32].

2.4.2.1 Gliadiny

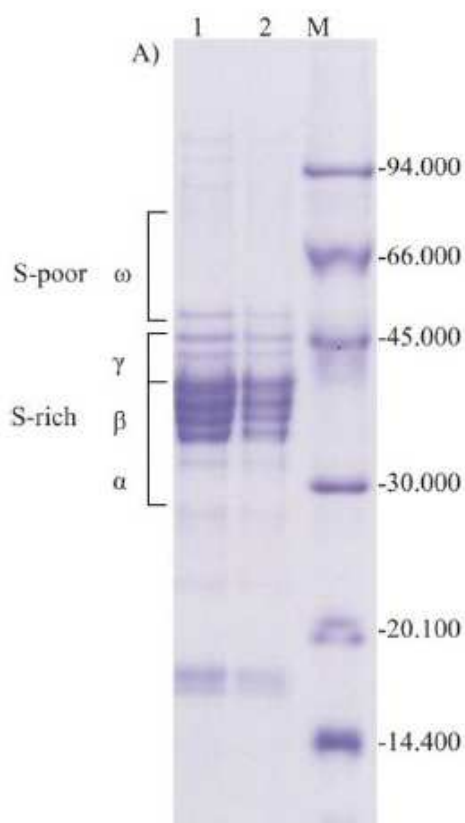
Gliadinové proteiny jsou lepkové proteiny, které se vyskytují ve formě monomerních polypeptidů. Disulfidické vazby, jež jsou v gliadinech přítomny, jsou prakticky všechny intramolekulární. Tyto proteiny mají zastoupení asi 30–40 % z celkových proteinů pšeničné mouky a tvoří polymorfní směs proteinů rozpustných v 70% alkoholu [32].

Když se gliadinové proteiny rozdělí buď elektroforézou nebo pomocí RP-HPLC, vzor se skládá z překrývajících se kombinací polypeptidů odvozených ze šesti bloků gliadinových genů. Prakticky mohou být gliadiny rozděleny do skupin dle elektroforetických mobilit v polyakrylamidovém gelu v kyselém pH (pH 3) (obr. 4), přičemž tyto oblasti

elektroforetických mobilit se označují jako α -, β -, γ - a ω -gliadiny a pohybují se v rozsahu molekulových hmotností od 30 do 74 kDa. Gliadinové polypeptidy mohou být také identifikovány podle vzorů vytvořených SDS-PAGE (obr. 5), ovšem SDS-PAGE neposkytuje tak dobré rozdělení. Kromě toho většina gliadinů má při SDS-PAGE podobnou elektroforetickou mobilitu jako některé gluteninové podjednotky, pokud se neprovede prefrakcionace pro izolaci gliadinů [32], [50].



Obr. 4 A-PAGE gliadinových proteinů [51]



Obr. 5 SDS-PAGE gliadinových proteinů [49]

Mezi největší, ale zároveň nejméně zastoupené, gliadinové frakce se řadí ω -1,2 a ω -5 gliadiny s molekulovými hmotnostmi 52–74 kDa. Podle analýzy Žilić et al. [52] tvoří pouze 0,50–2,53 % extrahovatelných proteinů v rámci genotypů pšenice pro výrobu chleba. α -, β - a γ -gliadiny mají nižší molekulové hmotnosti, a to v rozsahu 30–51 kDa [53], a tvoří v průměru 61,54 % extrahovatelných proteinů [52]. Poměr α/β - a γ -gliadinů ku ω -gliadinům ovlivňuje obsah sirných aminokyselin, kvalitu proteinů pšeničného zrna a strukturu a funkčnost lepku. Vzhledem k tomu, že α - a β -gliadiny jsou spolu úzce spojeny, jsou někdy tyto frakce společně označovány jako α/β nebo jen α .

Co se týká aminokyselinového složení, tak všechny skupiny gliadinů mají složení víceméně podobné. Pouze ω -gliadiny mají buď velmi málo nebo vůbec žádný cystein či methionin a obsahují malá množství základních aminokyselin [53]. Nicméně nejvíce obsahují glutamin, prolin a fenylalanin, které tvoří cca 80 % všech aminokyselin [35]. Z toho vyplývá, že ω -gliadiny nemusí obsahovat vůbec žádné disulfidické vazby. Ostatní gliadiny vytváří intramolekulové disulfidické vazby. U α -gliadinů se vyskytuje šest a u γ -gliadinů osm cysteinových zbytků nacházejících se na C-terminální doméně, přičemž tyto zbytky tvoří tři, resp. čtyři disulfidické vazby [54].

Studie zabývající se sekundární strukturou gliadinů [55] naznačuje, že α -, β - a γ -gliadiny obsahují z 30–35 % α -helix a β -skládaný list (cca 10 % v α gliadinech). Naopak ω -gliadiny neobsahují žádné α -helixy nebo β -skládané listy, ovšem jsou bohaté na konformaci tzv. „ β -turn““. V této studii navíc vyvodili závěry, že ω -gliadiny jsou stabilizovány silnými

hydrofobními interakcemi a hlavními stabilizujícími silami α -, β - a γ -gliadinů jsou kovalentní disulfidické vazby a nekovalentní vodíkové můstky.

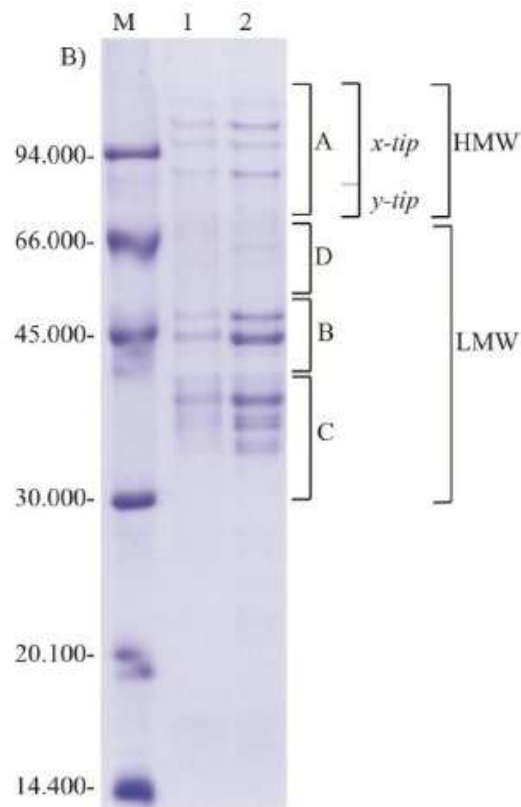
Žilić et al. [49] přirovnávají ve své práci lepek ke dvousložkovému lepidlu, kde gliadiny fungují jako plastifikátor (změkčovač) nebo rozpouštědlo pro gluteniny. Gliadiny podporují viskózní tok a roztažnost, což jsou důležité reologické charakteristiky. Tito autoři také shrnuli, že γ -gliadiny by mohly souviset se silou lepku a β -gliadiny by mohly být spojeny se zvýšeným objemem bochníku. Gliadinové proteiny také mohou interagovat s gluteninovými polymery tvorbou nekovalentních vazeb, což spíše přispívá viskozitě lepku než elasticitě.

2.4.2.2 *Gluteniny*

Gluteniny jsou lepkové polypeptidy, které jsou navzájem propojeny meziřetězcovými disulfidickými vazbami. Kromě toho se u nich ještě stejně jako u gliadinů vyskytují intrařetězcové disulfidické vazby. Tato frakce lepku je v endospermu zastoupena asi ze 45 % z celkových proteinů. Podle analýzy Žilić et al. [52] z toho rozpustné gluteniny činí 9,49–14,91 % celkových proteinů a nerozpustné gluteniny pak v průměru 26,76 % celkových proteinů v genotypch pšenice seté. U tetraploidní pšenice tvrdé se tyto hodnoty pohybovaly v rozmezí 7,24–11,69 %, resp. 24,59 %. Obsah aminokyselin je podobný gliadinům. Obsahují vysoké množství glutaminu a prolinu a mají málo aminokyselin s nabitým postranním řetězcem.

Gluteninové proteiny se běžně rozdělují na dvě velké skupiny, kterými jsou HMW a LMW podjednotky. Tyto skupiny se zásadně liší svými molekulovými hmotnostmi. HMW podjednotky mají molekulové hmotnosti v rozmezí 75–120 kDa a činí cca 5–10 % celkových proteinů. Jde o proteinovou frakci lepku s největšími molekulovými hmotnostmi. Zatímco LMW podjednotky se pohybují svou molekulovou hmotností v oblasti 30–74 kDa a tvoří 20–30 % celkových proteinů [56], [57]. Spolu s gliadiny tedy pokrývají stejnou oblast molekulových hmotností.

Kromě toho mohou být ještě gluteniny rozděleny na základě elektroforetických mobilit na SDS-PAGE do čtyř skupin A, B, C a D, jak ukazuje obr. 6, na kterém je SDS-PAGE gluteninových proteinů. Skupina A zahrnuje HMW gluteninové podjednotky a skupiny B, C a D představují LMW podjednotky. Skupiny B a C se nachází v oblasti molekulových hmotností 42–51 kDa, resp. 30–41 kDa. Do skupiny D patří vysoce kyselé LMW podjednotky o molekulové hmotnosti 52–74 kDa [58]. Pšenice setá obsahuje vždy tři až pět HMW podjednotek, které jsou zakódovány na dlouhém rameni chromozomů. Každý lokus (pozice na chromozomu) se skládá ze dvou pevně vázaných genů, které mohou kódovat dva různé typy HMW podjednotek, a to x-typ o větších molekulových hmotnostech a y-typ o menších molekulových hmotnostech (viz obr. 6) [32].



Obr. 6 SDS-PAGE gluteninových proteinů [49]

Lepkové proteiny mají před vznikem polymeru dvě úrovně agregace. Na první úrovni se pomocí kovalentních vazeb tvoří HMW a LMW podjednotky gluteninu a na druhé úrovni se tvoří a stabilizují pomocí vodíkových a disulfidických vazeb větší agregáty, které se nazývají gluteninový makropolymer [32]. Byl navržen rozvětvený model polymerního lepku, kde se nachází tři gluteninové frakce lišící se molekulovou hmotností (HMW podjednotky, B-LMW podjednotky a C-LMW podjednotky), jež obsahují thiolové a disulfidové skupiny. Model byl navržen tak, že x- a y-typ HMW podjednotek je spojen formou hlava-pata disulfidickými vazbami, což tvoří páteř polymeru. Řetězce LMW podjednotek vytváří větvení y-typu na čtyřech místech [59]. Jiný model říká, že základní řetězec makropolymeru je tvořen jak HMW podjednotkami, tak LMW podjednotkami, přičemž větvení opět probíhá skrz y-typ HMW podjednotek.

Polypeptidové složení pšeničné mouky je jednak dáno genotypem pšenice, a to díky alelickému složení tří HMW podjednotek gluteninu, tří LMW podjednotek a šesti gliadin-kódujícím místům na chromozomu. Četné kombinace alel umožňují velký potenciál pro biodiverzitu. K tomuto kvalitativnímu aspektu se pak přidává úroveň exprese genů určujících absolutní a relativní množství genových produktů. Nakonec poskytují ještě širší odchylky v proteinovém složení vlivy růstových podmínek na úroveň exprese a různou citlivost expresních hladin na jednotlivých genech [32].

2.5 Lepek a zdraví

Lepkové bílkoviny způsobují různé intolerance a alergie. Žilić et al. [49] píší, že v tomto ohledu jsou zatím nejlépe pochopené ω -5 gliadiny, které jsou nejvíce imunoreaktivní frakcí

a vystupují jako hlavní alergeny u cvičením způsobené anafylaxe závislé na pšenici (WDEIA), což je nejnebezpečnější život ohrožující potravinová alergie zprostředkovaná IgE. Nicméně Waga et al. [60] zjistili, že ω -1,2 gliadiny jsou nejspíše stejně imunoreaktivní a α -, β - a γ -gliadiny také rozeznávají specifické IgE, pouze mají asi poloviční vazebnou kapacitu než ω -gliadiny.

Je mnoho proteinů lepku, jež obsahují epitopy stimulující T-buňky, což může způsobit celiakii [61]. Celiakie je způsobena intolerancí na požitý pšeničný lepek nebo příbuzné proteiny z žita a ječmene. Tato nemoc převládá u bělochů (1 z 200 jedinců), ale pouze 20–50 % těchto disponovaných jedinců má subjektivní příznaky. Jde o získanou poruchu, která může být diagnostikována v dětství, ale také později v dospělosti. Imunitní odpovědi jsou chronické záněty tenkého střeva, které nakonec způsobují jeho poškození. Z tohoto důvodu je nutná celoživotní bezlepková dieta. Toto onemocnění je pravděpodobně vyvoláno několika faktory, jež zahrnují environmentální složku a genetické faktory (HLA geny). Kvůli souhře těchto faktorů je těžké identifikovat základní mechanismus patogeneze. HLA geny byly identifikovány jako predispozice k onemocnění (u většiny pacientů HLA DQ2, v menší míře HLA DQ8).

Rashtak a Murray [62] popsali mechanismus imunitní reakce následovně. Geneticky citlivým jedincům se exprimují geny HLA DQ2 či HLA DQ8. Při požití lepkových proteinů dochází k rozpoznání gliadinů T lymfocyty. Ve střevě probíhá reakce gliadinových proteinů s tkáňovou transglutaminázou a to vyvolá selektivní deamidaci glutaminových zbytků. Deamidované komplexy gliadinových peptidů a TTG moderované B-buňkami vyvolávají zesílenou aktivaci specifických T-buněk. Tyto aktivované T-buňky interagují s odpovědí B-buněk a dohromady stimulují vylučování protilátek. Následně vzniká zánětlivý proces, jenž nakonec způsobuje destrukci střevní mukózy.

Podle Vadera et al. [63] je odpověď dominantní u peptidů frakcí α - a ω -gliadinů a naopak méně často pozorovali odpověď u γ -gliadinů a LMW podjednotek gluteninů. Podle faktu, že α - a ω -gliadinové peptidy obsahují čtyři prolinové zbytky, γ -gliadiny pouze dva nebo tři a LMW podjednotky jeden nebo dva, se předpokládá ochrana peptidů prolinem pro degradaci v trávicím traktu, čímž se zvýší pravděpodobnost stimulace T-buněk. Vzhledem k tomu, že gliadinové peptidy mají vysoký obsah prolinu, jsou kritické pro tvorbu aktivních T-buněkových epitopů, jež hrají roli při celiakii. Tyto epitopy jsou v lepkových proteinech tvořeny sekvencemi o čtyřech až osmi aminokyselinách [64]. Takové sekvence objevující se několikrát v alergenních proteinech mohou zvýšit účinnost imunologické reakce a zhoršit příznaky alergie.

Existuje víze, že by někteří jedinci trpící celiakií mohli snášet pšenici, která obsahuje málo epitopů stimulujících T-buňky. Redukce těchto epitopů by mohla být prospěšná u dětí, u kterých by se tím oddálil nebo úplně zastavil nástup nemoci a také by se zmírnily příznaky v případech nediodagnostikovaných jedinců, kterých je značné množství.

Kromě celiakie patří mezi nejznámější nemoci spojené s lepkem ještě alergie na pšenici. V obou případech je reakce na lepek zprostředkovaná aktivací T-buněk. Ovšem u alergie na pšenici je spouštěčem uvolňování chemických mediátorů, jako je histamin, z bazofilů a žírných buněk síťování IgE, které je vyvoláno opakujícími se sekvencemi v lepkových peptidech [65]. Mezi tyto alergie se řadí pekařské astma, potravinová alergie, WDEIA nebo

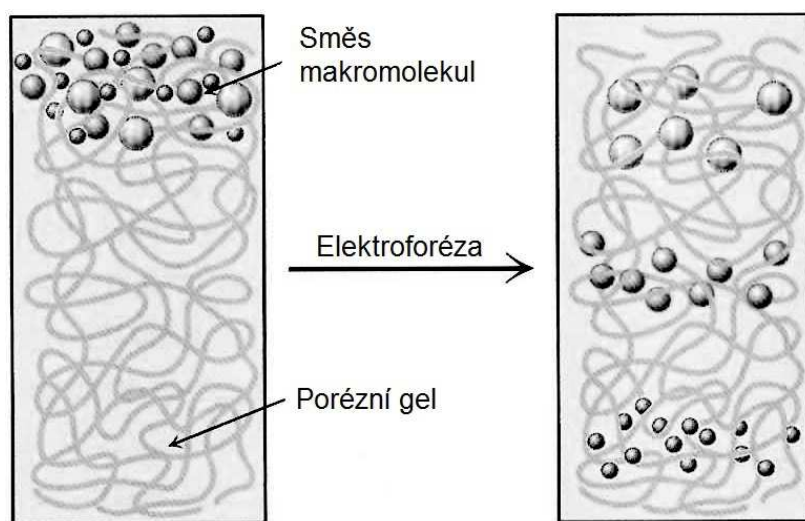
kontaktní kopřivka. Na rozdíl například od WDEIA, kterou způsobuje specifický typ proteinu (ω -5 gliadiny), jsou ostatní alergie spojeny s širším spektrem pšeničných proteinů. Studie s purifikovanými proteiny a specifickými IgE testy se séry pacientů [66] ukázaly, že 60 % mělo IgE na α -gliadiny, β -gliadiny a LMW podjednotky gluteninů, 55 % na γ -gliadiny, 48 % na ω -gliadiny a 26 % na HMW podjednotky gluteninů.

2.6 Metody stanovení lepkových proteinů

2.6.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza je elektromigrační technika, jejímž principem je migrace nabitých částic a molekul v elektrickém poli. To lze využít při analýze složek, které jsou schopny získat náboj, mezi které patří nukleové kyseliny, proteiny a peptidy nebo některá barviva [67]. Tato technika se stala hlavním nástrojem v biochemii, molekulární biologii, analytické chemii a proteomice. Kromě analytických účelů může být také využita jako preparativní metoda pro částečnou purifikaci molekul před použitím jiných technik, např. hmotnostní spektrometrie [68].

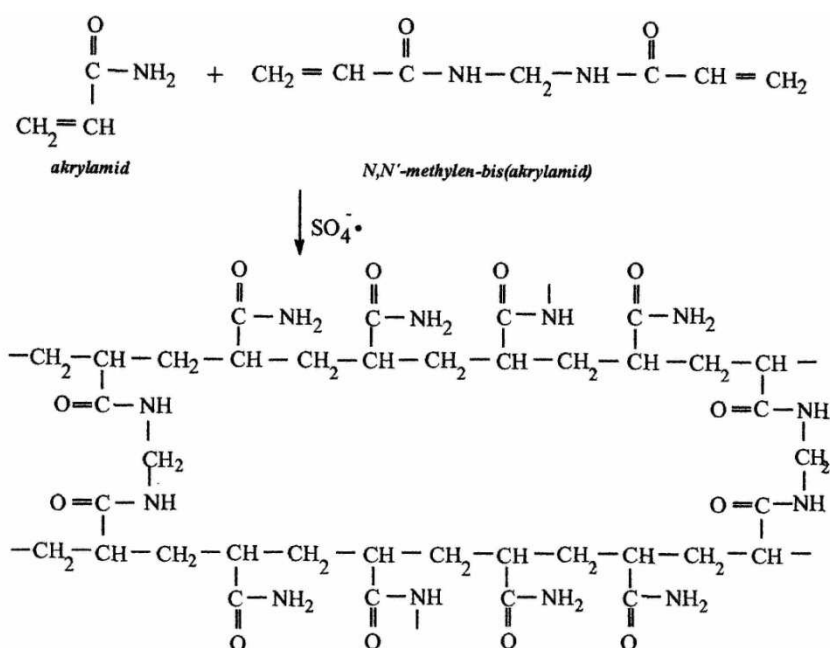
V analýze potravin se elektroforetické metody využívají zejména k separaci a detekci proteinů. Proteiny jsou amfoterní molekuly, což znamená, že mohou vystupovat jako anionty i kationty [67]. Tyto nabitě molekuly umístěné do elektrického pole se pohybují ke katodě nebo anodě v závislosti od náboje konstantní rychlostí. Nejdůležitějšími faktory, které ovlivňují relativní mobilitu molekul, jsou celkový náboj, poměr velikosti náboje a molekuly, tvar molekuly a teplota, porozita a viskozita matrice, přes niž molekuly migrují. Celkový náboj je určen počtem pozitivních a negativních nábojů v molekule. U proteinů to ovlivňují postranní řetězce aminokyselin a skupiny vznikající při posttranslačních modifikacích, jako je deamidace, acylace nebo fosforylace [68]. To platí ovšem pouze, pokud jsou proteiny v prostředí, které má odlišnou hodnotu pH, než odpovídá jejich izoelektrickému bodu. V tomto případě se molekuly proteinů chovají elektroneutrálně a elektrické pole tak nemá žádný vliv.



Obr. 7 Separace molekul v polyakrylamidovém gelu [68]

Separací prostředí je tvořeno kompaktním polyakrylamidovým gelem, který vystupuje jako nevodivé médium. Tento gel má vysokou mechanickou stabilitu, je transparentní

a chemicky inertní [67]. Principiálně gel funguje jako molekulové síto napomáhající separaci molekul na základě jejich velikosti (obr. 7). Jeho základní složkou je akrylamid, jenž může být zesíťován nejčasněji N, N'-metylenbisakrylamidem za přítomnosti katalyzátoru a iniciátoru (obr. 8). Jako iniciátor a zdroj volných radikálů se používá peroxodisíran amonný. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin) katalyzuje polymerační reakci stabilizací těchto volných radikálů. Rychlost polymerace je dána koncentrací iniciátoru a katalyzátoru. Kvůli vývoji tepla je velice důležité rychlost polymerace udržet na optimální hladině. Příliš mnoho tepla by mohlo způsobit vady ve struktuře gelu a někdy i rozbití skleněných kazet. Koncentrace klíčových komponent by měla být upravena tak, aby kompletní polymerace proběhla během 20–60 minut. Výsledkem polymerace je síto o předem určených velikostech pórů, což je ovlivněno množstvím akrylamidu a bisakrylamidu. Polymerace je připravena ve skleněných kazetách bez přístupu kyslíku, jehož radikály mohou působit jako pohlcovače volných radikálů inhibující reakci [68].



Obr. 8 Vznik polyakrylamidu [69]

Elektrické pole je zavedeno do systému platinovými elektrodami, které jsou umístěny v rezervoáru s pufrém. Přenos elektrického pole je zajištěn skrze migrující ionty pufru, a to způsobuje vývoj Jouleova tepla. Generované teplo způsobuje difuzi a konvektivní mísení zón (bandů) [68]. To je důvod, proč je v některých případech nutné použít chladičské zařízení. Pufry jsou složeny ze sloučenin poskytujících určité hodnoty pH a pufrovací sílu. Jejich přesné složení ovšem opět závisí na separovaném analytu a vybrané metodě [67].

Separované molekuly nejsou po rozdělení viditelné, a proto je třeba je obarvit, aby se zviditelnila jejich pozice. Tradičně se pro detekci používá barvivo Coomassie Brilliant Blue, které lze použít i při kvantifikaci vzorku. Další variantou je pak barvení stříbrem.

Podle toho, co je předmětem analýzy a jaké jsou cíle, se používají různé separační metody jako elektroforéza v kyselé nebo zásadité oblasti, SDS elektroforéza nebo izoelektrická fokusace. Pokud se analyzuje vysoce komplexní směs proteinů, využívá se 2-D elektroforéza založená na kombinaci dvou separačních technik [67].

2.6.1.1 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s použitím dodecylsulfátu sodného je nejběžnější z elektroforetických metod. Pokud jsou molekuly proteinů vystaveny přítomnosti detergentu SDS, proteiny denaturují, tzn. ruší se individuální náboje a terciární struktury molekul. SDS štěpí vodíkové vazby a natahuje polypeptidové řetězce. Obvykle se ještě přidává redukční činidlo dithiothreitol (DTT), které štěpí disulfidické vazby. Po těchto změnách mají všechny proteiny stejný tvar a jednotný záporný náboj. Molekuly tak v elektrickém poli putují k anodě rychlostí závislou na délce polypeptidového řetězce (molekulové hmotnosti) [67].

Velmi ostré zóny lze získat při diskontinuální elektroforéze, kde se používají dva gely – dolní dělicí gel a horní zaostřovací gel. V zaostřovacím gelu je nejpohyblivější chloridový anion, poté následují zóny bílkovin podle elektroforetických pohyblivostí a poslední zónou je glycin. Vytváří se ostře ohraničené těsně za sebou následující zóny iontů a vzniká stupňovitý gradient potenciálu. Samozaostřující efekt znamená, že pokud se nějaký iont zpozdí za svou zónou, vyšší potenciál ho dostatečně urychlí, aby se opět připojil ke své zóně. V dělicím gelu je vyšší pH a mění se pohyblivost iontů a dochází k rozdělení zón od sebe. Pohyb čela indikuje nízkomolekulární barvivo bromfenolová modř [70].

2.6.1.2 A-PAGE

A-PAGE je elektroforéza probíhající za nativních podmínek. To znamená, že molekuly v tomto případě nejsou denaturovány a zůstává jim sekundární a terciární struktura, která může hrát důležitou roli při separaci. Díky tomu je možné separovat molekuly jak podle velikosti, tak podle jejich tvaru a velikosti náboje [67].

Nukleové kyseliny, peptidy a snadno rozpustné kyselé proteiny jsou separovány jako anionty v zásaditých pufrch, zatímco některé hydrofobní a zásadité proteiny mohou být analyzovány pouze v kyselých gelech, kde mají proteiny pozitivní náboj a v elektrickém poli se pohybují směrem ke katodě, což je jeden z hlavních rozdílů proti SDS-PAGE [67]. Za nativních podmínek je velmi důležitá teplota a to z toho důvodu, že hodnoty pK pufrových iontů a analytu se mění s různou teplotou [67].

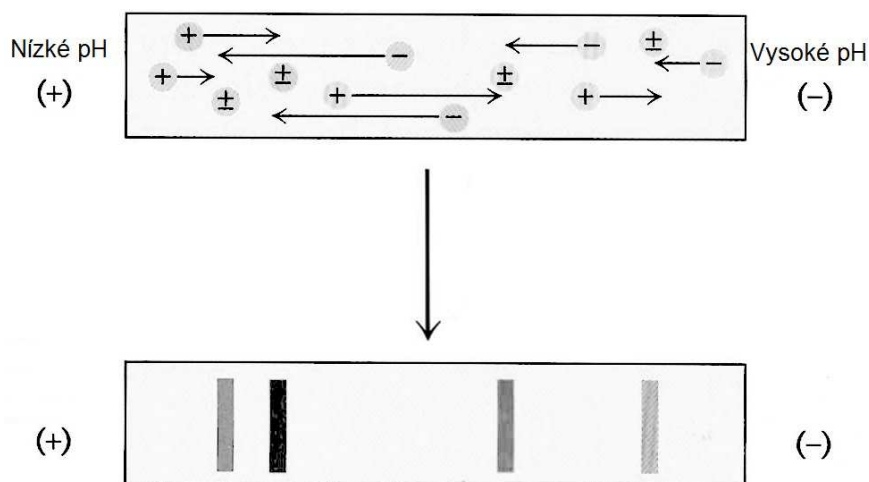
Zkratka A-PAGE znamená kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Název je odvozen od pH systému, které se pohybuje běžně kolem hodnoty 3,0. Vlivem kyselého pH dochází k protonaci postranních řetězců aminokyselin a celkový náboj proteinů je kladný. A-PAGE umožňuje rozdělení proteinů o podobné velikosti na základně odlišnosti jejich náboje (např. modifikované formy stejného proteinu). Do systému se přidává močovina jako činidlo narušující vodíkové vazby v proteinech. Navíc zvyšuje koeficient tření proteinů a tak mění jejich elektroforetické mobility [71].

2.6.1.3 2-D elektroforéza

Dvoudimenzionální elektroforéza je vhodná metoda pro separaci vysoce komplexních proteinových směsí. Kombinuje totiž zároveň dvě separační metody, a to izoelektrickou fokusaci a elektroforézu v polyakrylamidovém gelu za použití SDS. V prvním kroku se při izoelektrické fokusaci proteiny rozdělí v gradientu pH podle jejich izoelektrického bodu (obr. 9). Každá molekula se pohybuje podle svého náboje ke katodě nebo anodě a zastaví se v místě, které odpovídá dané hodnotě pH. V druhém kroku se tyto zóny aplikují na SDS gel,

kde se následně proteiny rozdělí podle jejich velikosti. Tato metoda disponuje vysokou rozlišovací schopností. Pokud se použije dostatečně velký gel, je možné rozlišit několik tisíc proteinů.

Proteinové spoty mohou být dále zpracovány tak, že jsou vyříznuty z gelu, odbarveny a poté, co se proteiny enzymaticky naštěpí, jsou připraveny pro analýzu hmotnostní spektrometrií [68].



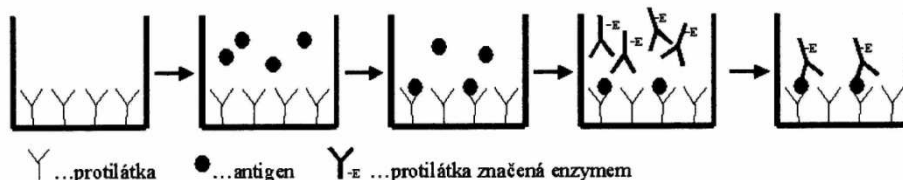
Obr. 9 Izoelektrická fokusace [68]

2.6.2 ELISA

Zkratka ELISA pochází z anglického „enzyme-linked immuno-sorbent assay“. Je to citlivá neprecipitační imunochemická metoda, která je schopná detekovat nízké koncentrace antigenu a protilátky. Pro lepší citlivost stanovení imunokomplexu antigen-protilátka se na jeden z imunoreaktantů váže vhodná značka. V heterogenních imunoanalýzách jsou to nejčastěji enzymy, které umožňují bezpečné, citlivé a poměrně jednoduché stanovení. Mezi nejčastěji používané enzymy patří peroxidasa a alkalická fosfatasa. Ty katalyzují přeměnu substrátu na barevný nebo fluoreskující produkt, od něhož se odvíjí spektrofotometrické nebo fluorimetrické stanovení. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky [70].

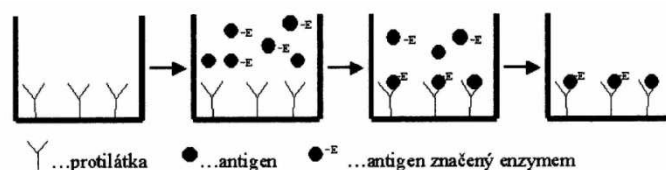
Jako pevný nosič se nejčastěji používají stěny jamek mikrotitračních destiček z tvrzeného polystyrenu. Jsou vhodné pro analýzu většího souboru vzorků, nikoli pro ojedinělé analýzy. Nejcitlivější provedení umožňují stanovit množství analytu $10^{-12} - 10^{-9}$ g [70].

Tuto metodu lze provést jako kompetitivní a nekompetitivní. Při nekompetitivní enzymové imunoanalýze (obr. 10) nejdříve reaguje protilátka vázaná na pevný nosič s antigenem ve vzorku. Až se ustaví rovnováhy, systém se promyje a na zachycený antigen se váže další protilátka označená enzymem. Po promytí se změří enzymová aktivita zachycená na pevnou fázi [70].

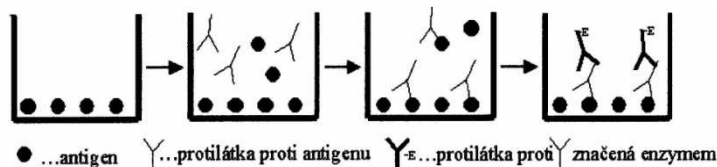


Obr. 10 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza

Kompetitivní ELISA má přímé a nepřímé provedení. Při přímé kompetitivní enzymové imunoanalýze (obr. 11) protilátka vázaná na pevný nosič reaguje zároveň s antigenem ze vzorku a s označeným antigenem, které soutěží o omezený počet vazebných míst protilátky. Po ustavení rovnováhy se systém promyje a změří se enzymová aktivita zachycená na pevné fázi. Čím více antigenu je ve vzorku, tím nižší je zjištěná enzymová aktivita. U nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (obr. 12) je první část kompetitivní a další je nekompetitivní. Antigen vázaný na pevný nosič soutěží s antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky, která se do systému přidává v roztoku. Čím více antigenu obsahuje vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Když se ustaví rovnováha a systém se promyje, množství navázané protilátky se zjišťuje v nekompetitivní fázi. Proti navázané protilátce se použije označená protilátka. Výhodou oproti přímé metodě je univerzálnost použití označené protilátky [70].



Obr. 11 Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza



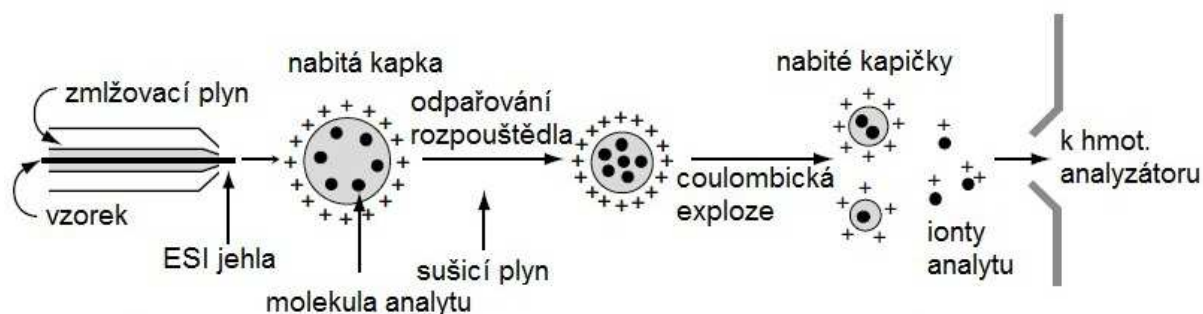
Obr. 12 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

2.6.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je instrumentální technika, která je založená na separaci iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z), při níž dochází k interakci iontů a elektrického nebo magnetického pole. Tato metoda je jednak nejpřesnější při určování hmotností iontů a molekul, ale také můžeme pomocí charakteristického hmotnostního spektra účinně identifikovat různé látky.

Hmotnostní spektrometr tvoří tři základní části, a to jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Prvním krokem je převedení analyzovaných molekul z kapalných nebo pevných vzorků ionizací na molekulární nebo kvazimolekulární ionty v iontovém zdroji. Tato část silně závisí na použité ionizační technice. Existuje mnoho ionizačních technik, které se jednoduše rozdělují na měkké a tvrdé ionizační techniky. Tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace. Její princip je založen na interakci molekul s elektrony o energii 70 eV,

čímž je z neutrální molekuly vyražen elektron a vzniká radikál kation. Ten se díky přebytečné energii rozpadá a tvoří se menší fragmenty, které jsou následně analyzovány. Každý fragmentový ion odvozený od molekulového iontu může znovu podléhat fragmentaci. Mezi měkké ionizační techniky se řadí chemická ionizace či elektrosprej. Tímto způsobem se přenáší mnohem menší energie a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci, proto se používají například, pokud se zjišťuje molekulová hmotnost látek. Základem elektrospreje je vodivá kapilára a protielektroda. Při vložení stejnosměrného napětí dochází k redistribuci náboje v kapiláře. Záporné ionty se přitáhnou ke stěně kapiláry a kladné ionty se shromažďují uprostřed, přičemž tlak tyto kladně nabité ionty vytlačuje ven. Ze špičky jsou vytrhovány nabitě kapky a jsou rozprašovány do prostoru. Vysoušením se kapky zmenšují a náboj se koncentruje, až dojde k explozi kapky a vznikne více menších. To se opakuje, dokud z analytu nejsou samostatné ionty. Celý princip je znázorněn na obr. 13. Elektrosprej je vhodný pro iontové analyty nebo jiné polární sloučeniny s molekulovou hmotností v rozmezí 100 až více než 1 000 000 Da, jako jsou třeba proteiny [72]. Vhodnost iontového zdroje záleží na polaritě, molekulové hmotnosti, tepelné stabilitě analytu a komplexitě zkoumaného vzorku.



Obr. 13 Princip ionizace elektrosprejem [72]

Vzniklé ionty jsou dále vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle jejich poměru m/z . To, aby se mohly ionty pohybovat z jednoho konce na druhý bez jediné překážky (jiné molekuly), je zabezpečeno vakuem jak v analyzátoru, tak v oblasti detektoru. Analyzátorů je na výběr několik. Jsou to kvadrupól, iontová past, time-of-flight (TOF), iontová cyklotronová rezonance (FT-ICR) nebo Orbitrap. Pohyb iontů v analyzátoru může být ovládán elektrickým nebo magnetickým polem tak, aby je to vedlo do detektoru v závislosti na jejich m/z [73].

Separované ionty jsou detekovány a jejich signál obsahuje informace o hodnotách m/z zároveň s jejich intenzitou v tzv. hmotnostním spektru. Nejčastějšími detektory jsou elektronový násobič, fotonásobič a mikrokanálová destička (MCP) [72].

Hmotnostní spektrometrie je klíčový nástroj pro analýzu proteinů. U peptidů a proteinů jsou především žádoucí informace týkající se aminokyselinové sekvence molekul. Důležitým prvkem proteomické analýzy je separace peptidů a proteinů, aby se zjednodušila komplexní směs. Pro tyto případy existují hmotnostní spektrometry, kterým předchází například GC nebo HPLC. Těmto zařízením se souhrnně říká tandemová MS. Spektra z hmotnostní spektrometrie lze uchovávat a v budoucnu mohou být použity pro vyhledávání v databázích k identifikaci proteinů [73].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Experiment byl realizován v Centru výzkumu globální změny AV ČR. V roce 2013 byla pro jeho účely vybudována Experimentální stanice v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem (obr. 14) nacházející se v oblasti Českomoravské vrchoviny v nadmořské výšce 575 m. Zmíněnou oblast charakterizují bohaté srážky s průměrným ročním úhrnem srážek 610 mm a průměrná roční teplota 7,2 °C. Půdním typem je zde modální kambisol s geologickým podložím zvětralá rula v hloubce 60–90 cm a půdním druhem hlinitopísčité půda s podílem se zastoupením písčité frakce 45–60 % a obsahem jílnatých částic pohybujícím se do 16 %. Kyselost půdy je v této lokalitě v rozmezí pH_{KCl} 4–5.

Stanici tvoří 24 komor umožňujících sledování několika parametrů najednou. Jednak je zde zajištěna automatická fumigace zvýšenou koncentrací CO_2 , dále regulace srážek a také omezená propustnost pro UV záření. Komory mají tvar šestiúhelníku, jehož opsaná kružnice má průměr 4 m, a výška komor je 2 m. Jejich strop tvoří otočné lamely, které otevíráním a uzavíráním na základě signálu ze srážkoměru regulují množství srážek (dry vs. wet). Jako materiál byly použity dva typy transparentních akrylátů, přičemž jeden typ je propustný pro UV-A i UV-B záření (UV^+) a druhý propouští částečně jen UV-A záření (UV^-). Vzduch se zvýšenou (EC) nebo normální (AC) koncentrací CO_2 je do komor vháněn pomocí ventilačního systému v celém obvodu komory.

Ozimá pšenice odrůdy Bohemia byla vyseta 10.–11. 10. 2013 v hustotě 4 MKS na ha (miliony klíčivých semen). Fumigace zvýšenou koncentrací CO_2 ($700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) byla zahájena v růstové fázi poloviny sloupkování (v polovině května). Plocha uvnitř komor byla rozdělena na dvě části, z nichž jedna byla hnojena dávkou dusíku $200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (N^+) na konci odnožování. Jako hnojivo byl použit vápenatý ledek. Druhá část zůstala zcela bez hnojení (N^-). Celkově bylo založeno 48 „políček“, které pokryly kombinace všech zkoumaných faktorů, přičemž každá kombinace byla založena ve třech opakováních. Sklizeň zralého zrna byla provedena ručně s následným výmlatem pomocí maloparcelní sklízecí mlátičky (Wintersteiger).



Obr. 14 Kultivační komory na experimentální stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem [74]

3.2 Stanovení obsahu lepkových proteinů metodou A-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle metody Polišenské et al. [75] a ČSN 46 1085-2.

3.2.1 Přístroje

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

Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF

Vortex – Stuart, firma MERCI

Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE

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

Zdroj – Major Science MP-500P

Třepačka LT2, firma KAVALIER

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

Bis-akrylamid (SIGMA ALDRICH)

Močovina (LACHEMA)

Kyselina askorbová (LACH-NER)

Síran železnatý heptahydrát (LACHEMA)

Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)

2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)

Pyronin G (SIGMA ALDRICH)

Kyselina octová – ledová (SIGMA ALDRICH)

Glycin (SIGMA ALDRICH)

Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)

3.2.3 Příprava roztoků

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

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

Extrakční roztok pro gliadiny: 25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu G bylo doplněno destilovanou vodou do 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Elektrodový tlumivý roztok: 4,0 ml ledové kyseliny octové a 0,4 g glycinu byly doplněny destilovanou vodou do 1 000 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a lze ho použít pouze jednou.

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

Fixační roztok: 100 g kyseliny trichloroctové bylo doplněno destilovanou vodou do 1 000 ml.

Barvicí roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo rozpuštěno v ethanolu a doplněno ethanolom na celkový objem 100 ml.

3.2.4 Příprava polyakrylamidového gelu

Do cca 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo přidáno 10,00 g akrylamidu, 0,40 g bisakrylamidu, 6,00 g močoviny, 0,10 g kyseliny askorbové a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna do objemu 100 ml gelovým tlumivým roztokem. Poté byla tato směs vychlazená v mrazicí části chladničky na teplotu cca 6 °C. Do vychlazeného roztoku bylo současně přidáno 0,2 ml roztoku peroxodisíranu amonného a 0,3 ml TEMEDu. Tento roztok byl ihned nalit až po okraj do gelové kazety, která byla předem vychlazená také na teplotu 6 °C. Do horní části kazety byl umístěn hřeben, aby se vytvořily prohlubně pro dávkování vzorku. Polymerace by měla proběhnout během 5 minut. Gel je možné použít cca po 60 minutách od zpolymerování gelu v kazetě nebo je možné jej uchovat do druhého dne v chladničce.

3.2.5 Příprava vzorku

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

3.2.6 Elektroforéza

Poté co byl hřeben vytažen z gelu, byly vzniklé prohlubně promyty elektrodoým tlumivým roztokem. Aparatura na elektroforézu byla naplněna elektrodoým tlumivým roztokem. Zdroj byl připojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody, kterou je anoda, k záporné elektrodě ve spodní části aparatury. Po dobu 60 minut byla spuštěna elektroforéza na prázdno bez vzorků (tzv. „předelektroforéza“) při konstantním napětí 480 V. Po uplynutí této doby byla elektroforéza vypnuta a do jamek byly nadávkovány připravené extrakty v množství 10 µl. Příklad byl znovu zapnut, přičemž elektroforéza probíhala za stejných podmínek po dobu 4 hodin. Vzhledem k velikosti vloženého napětí je nutné elektrodoým tlumivý roztok v průběhu elektroforézy chladit.

3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin

Po skončení elektroforézy byl gel uvolněn do misky s destilovanou vodou. Voda z misky byla vylita a gel byl převrstven 300 ml fixačního roztoku, ke kterému bylo přidáno 15 ml barvicího roztoku. Gel musí být zcela ponořen. Barvení bylo ukončeno po 24 hodinách. Delší čas nemá na barvení vliv. Kvůli odstranění barviva byl gel promyt vodou z vodovodu. Gel byl

uchováván na skle zabalený do potravinářské fólie, která jej chrání před vyschnutím, při teplotě 4 °C.

3.2.8 Vyhodnocení gelů

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

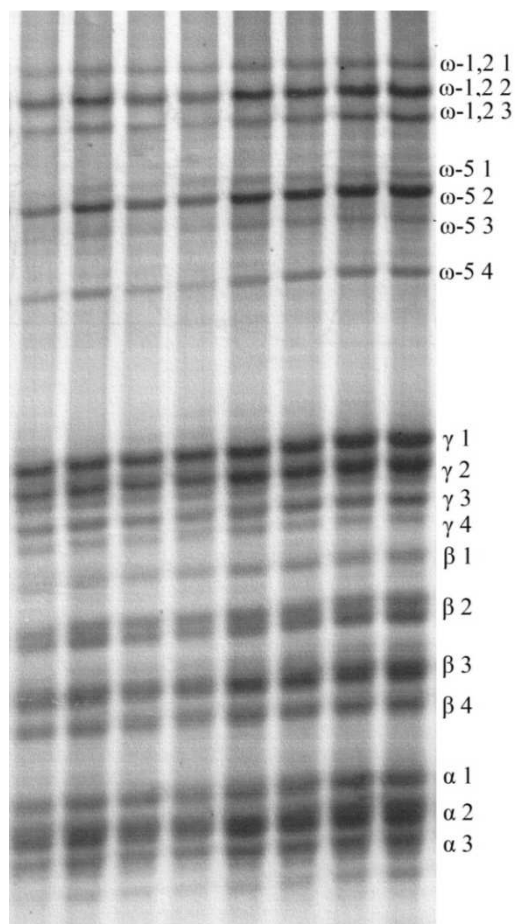
3.2.9 Statistické zpracování výsledků

Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického software Statistica 12 (StatSoft, USA). Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů, tj. vlivu zvýšené koncentrace CO₂, výživy dusíkem, UV záření, stresu sucha a jejich vzájemných interakcí bylo použito vícefaktorové analýzy variance (ANOVA). Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry jednotlivých variant pak bylo využito následného (post-hoc) testování s použitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0.05$. Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry pak byly varianty zařazeny do homogenních skupin, které jsou v grafech vyznačeny pomocí malých písmen nad sloupci. Rozdílná písmena vyjadřují průkazný rozdíl při hladině pravděpodobnosti $p = 0.05$. Výsledky byly graficky zpracovány v programu SigmaPlot 11 (SysStat, USA) ve formě sloupcových grafů s chybovými úsečkami znázorňujícími směrodatné odchylky.

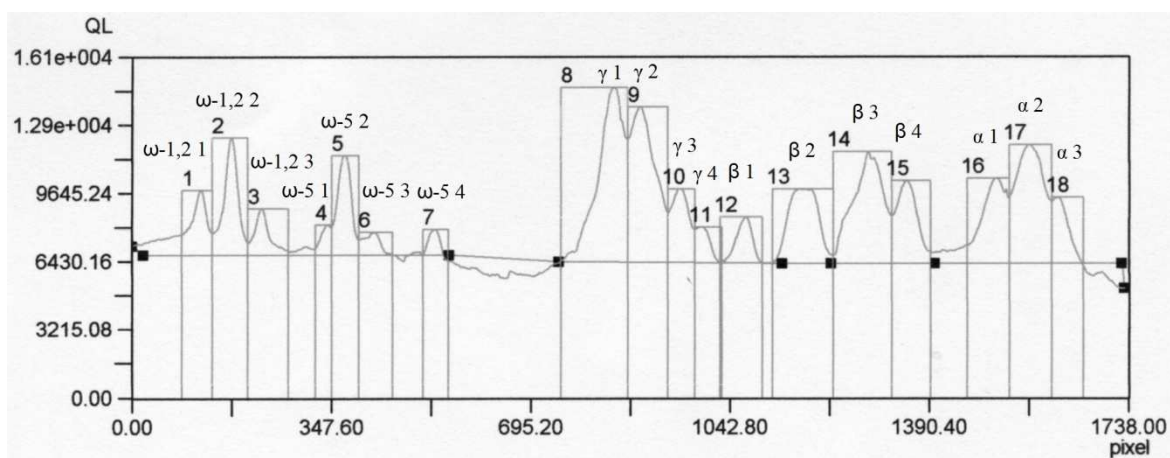
Korelační analýza byla provedena v programu MS Excel. Závislosti mezi obsahem jednotlivých bílkovinných frakcí byly vyhodnoceny formou tabulky korelačních koeficientů R , které byly porovnány s normativními hodnotami při hladině významnosti $p = 0.05$ pro daný počet případů $n = 48$. Průkazné závislosti mezi jednotlivými bílkovinnými frakcemi byly vyneseny do bodových grafů a proloženy lineární závislostí. V grafech jsou uvedeny rovnice regresní závislosti i hodnota indexu korelace R^2 .

4 VÝSLEDKY

Na obr. 15 je pro lepší orientaci znázorněn popis jednotlivých frakcí gliadinových proteinů, které budou diskutovány v této části. Gel je výsledkem experimentální části této diplomové práce a proteinové spektrum odpovídá pšenici seté odrůdy Bohemia. Obr. 16 pak znázorňuje převedení jednotlivých zón v gelu na spektrum píků, s jejichž plochami se dále pracovalo.



Obr. 15 Rozdělení gliadinových proteinů pomocí A-PAGE s popisem jednotlivých frakcí u pšenice seté odrůdy Bohemia



Obr. 16 Převedení zón na píky

Tab. 1a ANOVA - Čtyřstupňová analýza variance. Statistické vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů a jejich interakčních účinků na obsah proteinů jednotlivých frakcí (ω -1,2, ω -5 a γ -gladiny)

	ω -1,2 1	ω -1,2 2	ω -1,2 3	ω -5 1	ω -5 2	ω -5 3	ω -5 4	γ 1	γ 2	γ 3	γ 4
UV	0,001	0,004	0,013	0,021	0,016	0,177	0,310	0,931	0,669	0,905	0,002
CO ₂	0,249	0,054	0,197	0,930	0,080	0,033	0,018	0,748	0,004	0,002	0,422
sucho	0,237	0,153	0,079	0,124	0,342	0,042	0,043	0,493	0,131	0,230	0,072
N	0,001	< 0,01	< 0,01	0,004	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,537	0,020	< 0,01	0,606
UV*CO ₂	0,154	0,202	0,010	0,456	0,012	0,006	0,975	0,086	0,225	0,442	0,986
UV*sucho	0,794	0,788	0,984	0,790	0,362	0,460	0,406	0,836	0,526	0,409	0,482
CO ₂ *sucho	0,813	0,911	0,718	0,464	0,239	0,211	0,669	0,195	0,469	0,651	0,523
UV*N	0,056	0,711	0,322	0,807	0,296	0,042	0,925	0,161	0,184	0,844	0,176
CO ₂ *N	0,649	0,203	0,648	0,287	0,477	0,098	0,371	0,014	0,117	0,479	0,203
sucho*N	0,356	0,608	0,667	0,370	0,034	0,366	0,094	0,732	0,480	0,336	0,935
UV*CO ₂ *sucho	0,914	0,867	0,453	0,942	0,366	0,225	0,126	0,741	0,113	0,099	0,141
UV*CO ₂ *N	0,512	0,152	0,632	0,804	0,940	0,182	0,193	0,285	0,099	0,502	0,041
UV*sucho*N	0,013	0,026	0,037	0,739	0,039	0,028	0,379	0,806	0,903	0,881	0,509
CO ₂ *sucho*N	0,942	0,419	0,687	0,101	0,799	0,602	0,114	0,211	0,057	0,623	0,005

Tab. 1b ANOVA - Čtyřstupňová analýza variance. Statistické vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů a jejich interakčních účinků na obsah proteinů jednotlivých frakcí (β - a α -gliadiny)

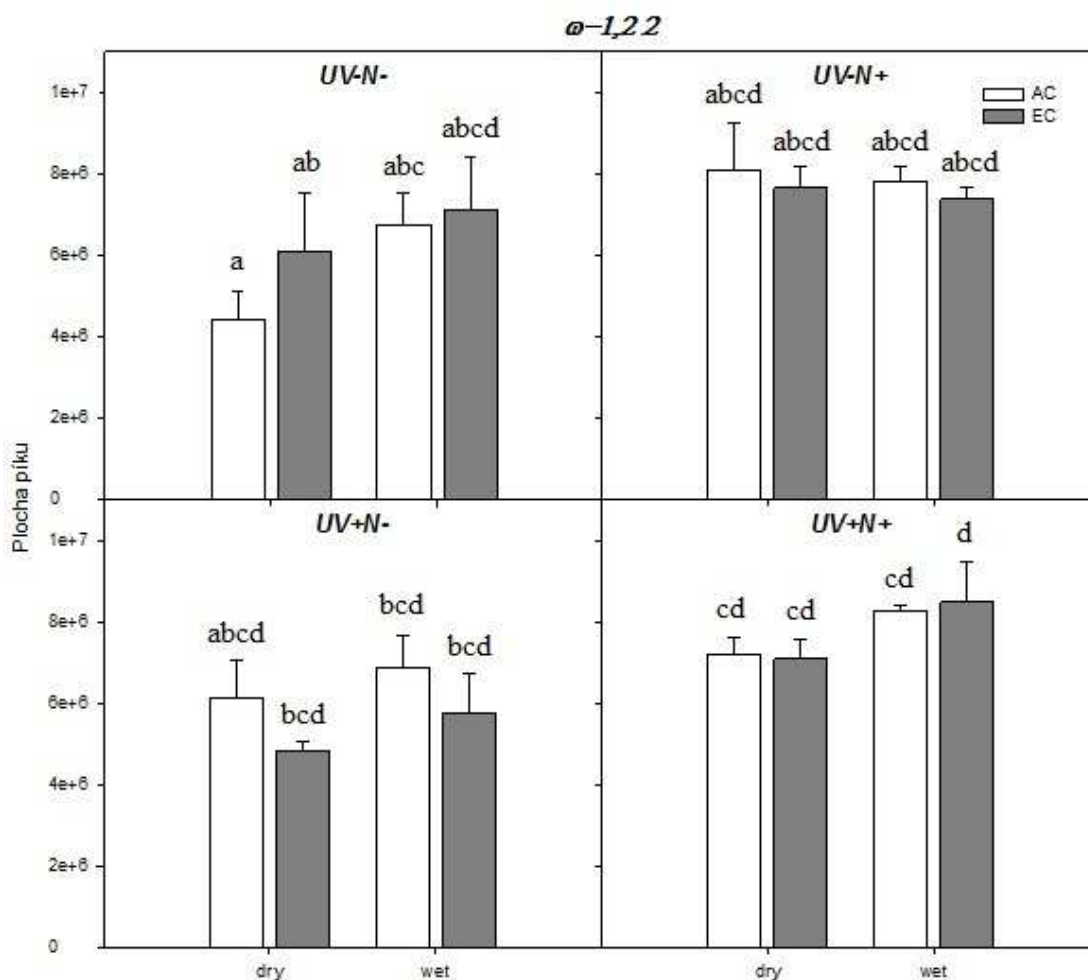
	β 1	β 2	β 3	β 4	α 1	α 2	α 3
UV	< 0,01	0,111	0,671	0,949	0,733	0,112	0,083
CO ₂	0,001	0,028	0,021	0,737	0,528	0,034	0,500
sucho	0,772	0,077	0,263	0,001	0,001	0,012	0,008
N	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
UV*CO ₂	0,208	0,856	0,362	0,262	0,063	0,148	0,070
UV*sucho	0,748	0,298	0,429	0,698	0,467	0,814	0,845
CO ₂ *sucho	0,440	0,6018	0,915	0,659	0,678	0,375	0,675
UV*N	0,407	0,843	0,630	0,269	0,609	0,744	0,980
CO ₂ *N	0,020	0,493	0,394	0,033	0,841	0,388	0,058
sucho*N	0,854	0,532	0,570	0,793	0,109	0,121	0,315
UV*CO ₂ *sucho	0,892	0,215	0,295	0,109	0,345	0,654	1,000
UV*CO ₂ *N	0,004	0,145	0,029	0,007	0,006	0,012	0,005
UV*sucho*N	0,061	0,920	0,332	0,624	0,017	0,074	0,979
CO ₂ *sucho*N	0,190	0,638	0,528	0,220	0,453	0,124	0,870

Tab. 1 zahrnuje hladiny významnosti p určující průkaznost účinků jednotlivých faktorů, jež byly hodnoceny, a jejich interakčních účinků na jednotlivé frakce gliadinových proteinů. Na gelu bylo detekováno osmnáct proteinových frakcí, přičemž tři frakce patří do skupiny ω -1,2 gliadinů, po čtyřech do skupin ω -5, γ a β a tři do skupiny α -gliadinů (obr. 15) a v tabulce jsou seřazeny od těch s největšími molekulovými hmotnostmi po ty nejmenší. Červeně zvýrazněné hodnoty v tab. 1 odpovídají hodnotám p menším než je 0,05, což znamená, že byl zjištěn průkazný vliv daného faktoru. Pokud je hodnota menší než 0,01, vliv je vysoce průkazný.

Z výsledků vyplývá jednoznačný a vysoce průkazný vliv dusíkatého hnojení na prakticky všechny gliadinové proteiny s výjimkou první a čtvrté frakce γ -gliadinů a také γ 2 gliadinů, kde byla hladina významnosti p na úrovni 0,020. Průkazný vliv UV záření se vyskytl u první a druhé frakce ω -5 gliadinů na hladinách 0,021 a 0,016 a u třetí frakce ω -1,2 gliadinů (0,013). U ostatních ω -1,2 gliadinů a také γ 4 a β 1 byl vliv UV záření vysoce průkazný. Vliv zvýšené

koncentrace oxidu uhličitého se průkazně projevil u třetí a čtvrté frakce ω -5 gliadinů (0,033 a 0,018), β 2 a β 3 (0,028 a 0,021) a α 2 (0,034). Vysoce průkazný se ukázal vliv zvýšené koncentrace CO_2 na 3 frakce, a to γ 2, γ 3 a β 1. V rámci třetí a čtvrté frakce ω -5 gliadinů byl také zjištěn průkazný vliv sucha na hladině 0,042, resp. 0,043 ještě spolu s frakcí α 2 gliadinů (0,012). Na ostatní α -gliadiny a frakci β 4 byl pak tento vliv vysoce průkazný.

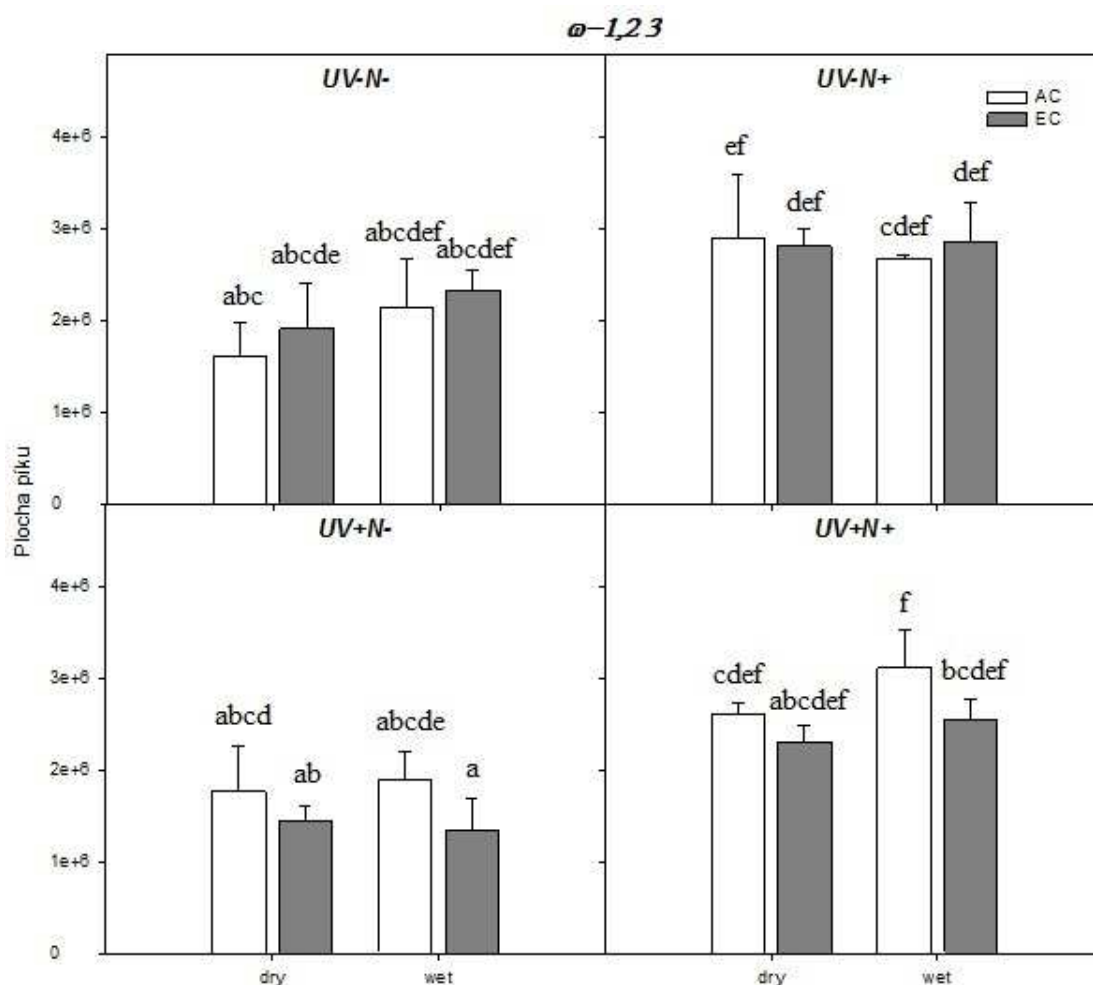
V rámci vzájemných interakcí jednotlivých faktorů byl zjištěn průkazný vliv interakce UV záření a zvýšené koncentrace CO_2 na druhou frakci ω -5 gliadinů na hladině 0,012 a vysoce průkazný byl pak vliv u třetí frakce ω -5 gliadinů a ω -1,2 gliadinů. Vliv interakce UV záření a dusíkatého hnojení byl průkazný pouze u třetí frakce ω -5 gliadinů na hladině 0,042. Druhá frakce ω -5 gliadinů byla průkazně ovlivněna interakcí dusíkatého hnojení a sucha (0,034) a interakce dusíkatého hnojení a zvýšené koncentrace CO_2 průkazně ovlivnila gliadinové frakce γ 1, β 1 a β 4 (0,014, 0,020 a 0,033). Vliv interakce sucha a UV záření či zvýšené koncentrace CO_2 nebyl prokázán u žádné skupiny gliadinů.



Obr. 17 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N^- vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce ω -1,2 2. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným

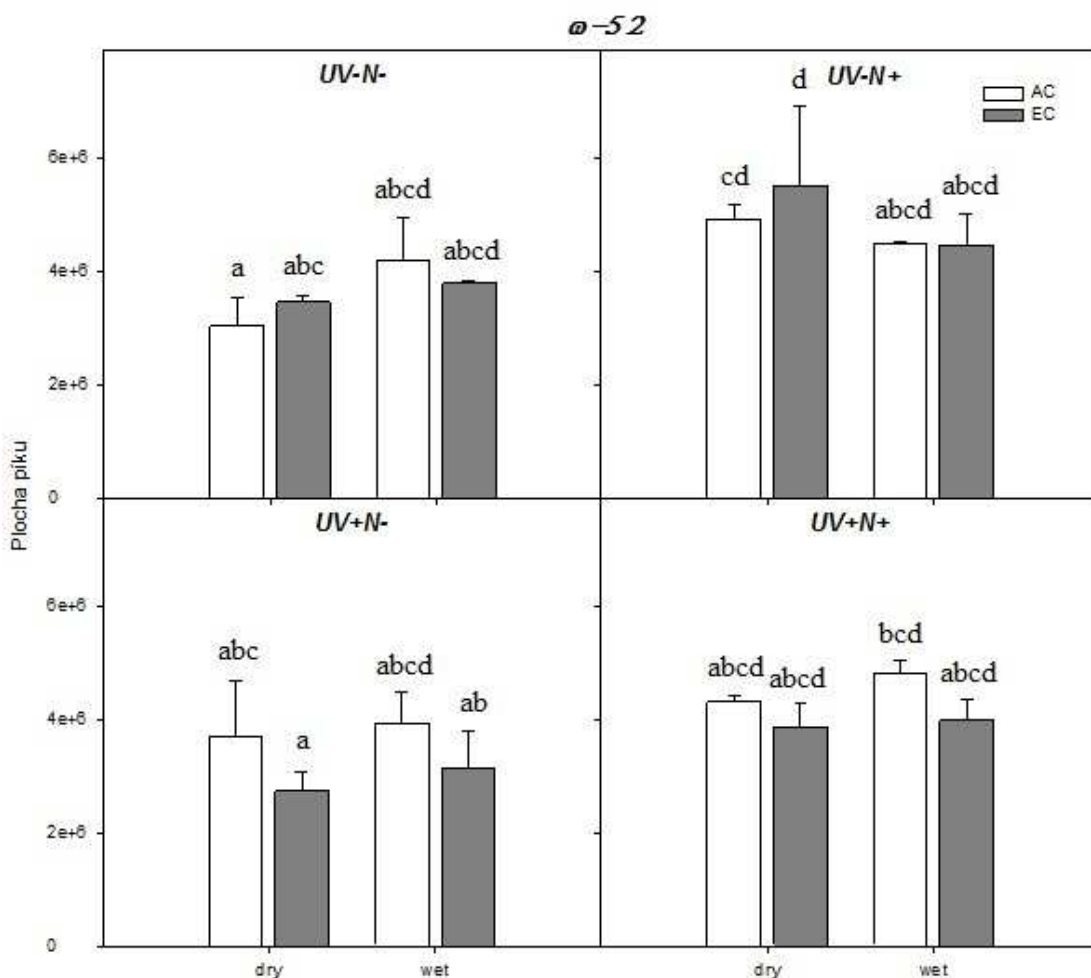
testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Grafy na obr. 17–28 umožňují srovnání vlivu všech zkoumaných parametrů a jejich interakcí současně v rámci jednotlivých gliadinových frakcí, přičemž písmenné označení každého sloupce v grafu určuje, zda existuje mezi variantami statisticky průkazný rozdíl (následné testování ANOVA, Tukeyho test) na hladině významnosti $p = 0,05$. Při detailnějším náhledu byl u druhé frakce ω -1,2 gliadinů (obr. 17) zjištěn průkazný rozdíl jejich množství pouze při interakci UV záření a dusíkatého hnojení, kdy množství ω -1,2 gliadinů bylo vyšší u variant hnojených dusíkem vystavených UV záření než u variant bez dusíkatého hnojení s vyloučením UV záření za sucha jak při normální koncentraci CO_2 , tak při zvýšené. V ostatních případech byly rozdíly neprůkazné.



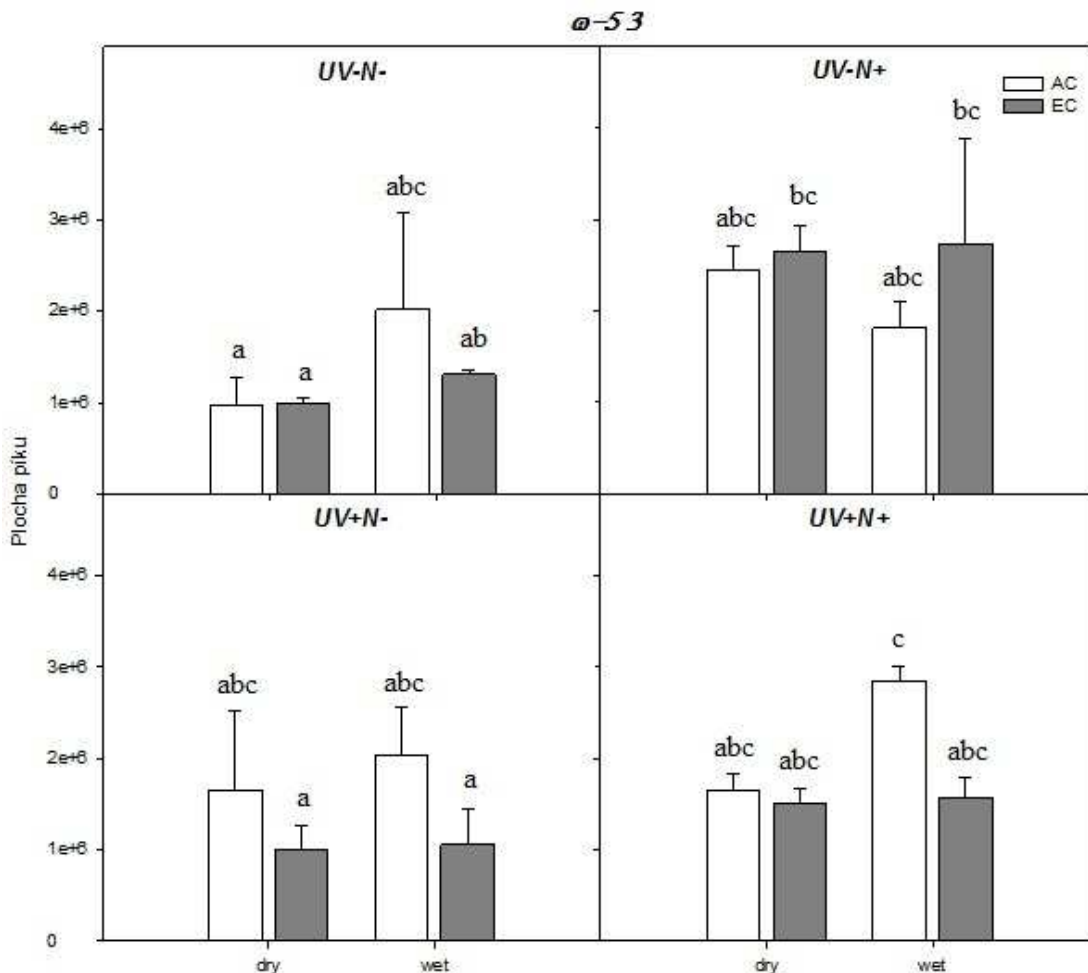
Obr. 18 Graf zobrazující srovnání ploch píkku všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce ω -1,2 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

V rámci třetí frakce ω -1,2 gliadinů (obr. 18) byl jednoznačně prokázán vliv dusíkatého hnojení za normální koncentrace CO_2 a sucha a při vyloučení UV záření. Dále byl vliv dusíku prokázán při normální i zvýšené koncentraci CO_2 a současném působení UV záření s přirozenou úrovní srážek. Dusíkaté hnojení zvýšilo obsah proteinů této frakce ve všech těchto případech. Kromě toho byl zjištěn průkazný vliv zvýšené koncentrace CO_2 při interakci s dusíkatým hnojením za sucha a s vyloučením UV záření, přičemž obsah proteinů se také zvýšil. Za sucha, ale při současném působení UV záření měla zvýšená koncentrace CO_2 vliv s vyloučením dusíkatého hnojení a stejně tak při přirozených srážkách. V obou případech se však množství proteinů snížilo. Vliv sucha se projevil současně s vyloučením dusíkatého hnojení za podmínek normální koncentrace CO_2 a vystavení UV záření, a to snížením obsahu proteinů této frakce. Interakce dusíku s vyloučením UV záření zvýšila obsah proteinů za zvýšené koncentrace CO_2 a sucha.



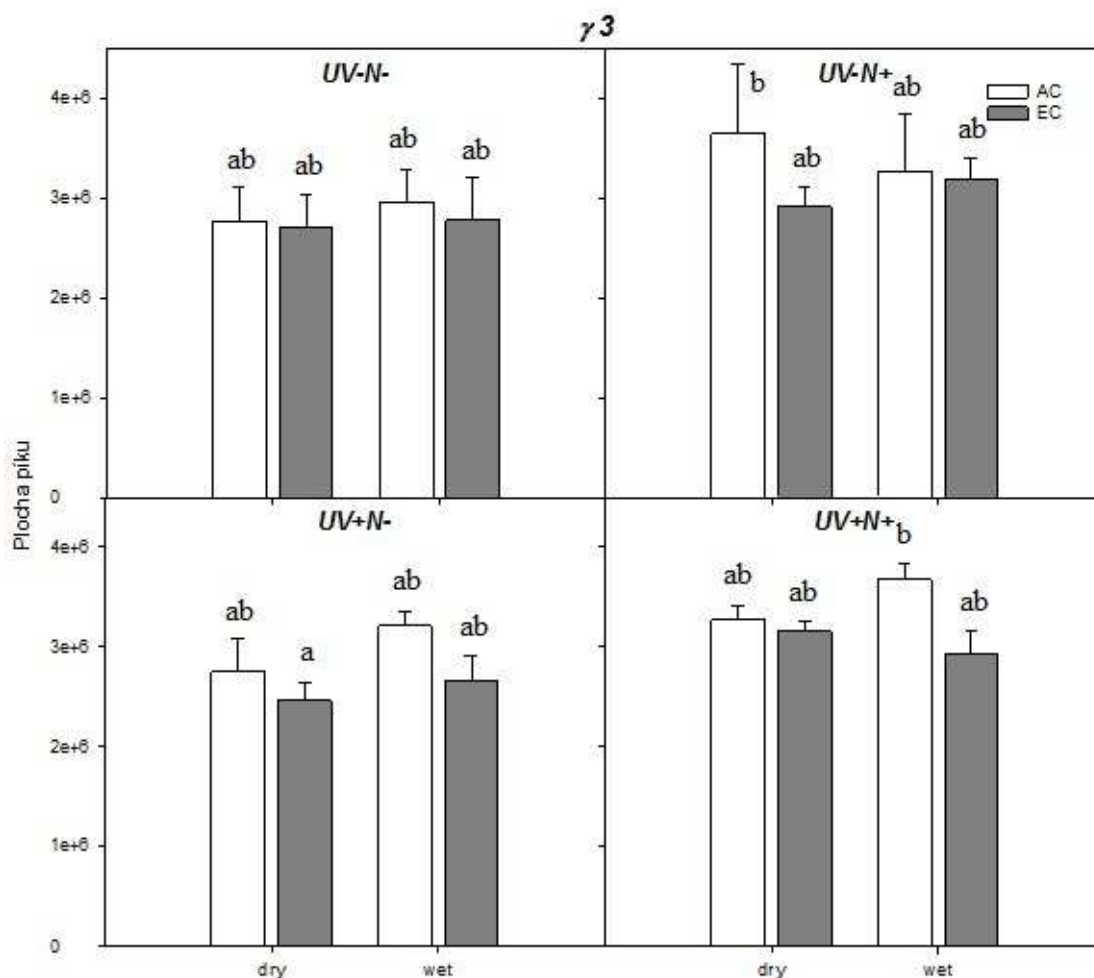
Obr. 19 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N⁺, sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV⁺) v rámci gliadinové frakce ω -5.2. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Z grafu na obr. 19 vyplývá průkazný vliv dusíku na frakci ω -5 2, a to jak při normální koncentraci CO_2 , tak při zvýšené koncentraci CO_2 za podmínek sucha s vyloučením UV záření, přičemž množství proteinů se v obou případech zvýšilo. Interakce dusíku s vyloučením UV záření za zvýšené koncentrace CO_2 a sucha také zvýšila obsah proteinů. V ostatních případech byly rozdíly neprůkazné.



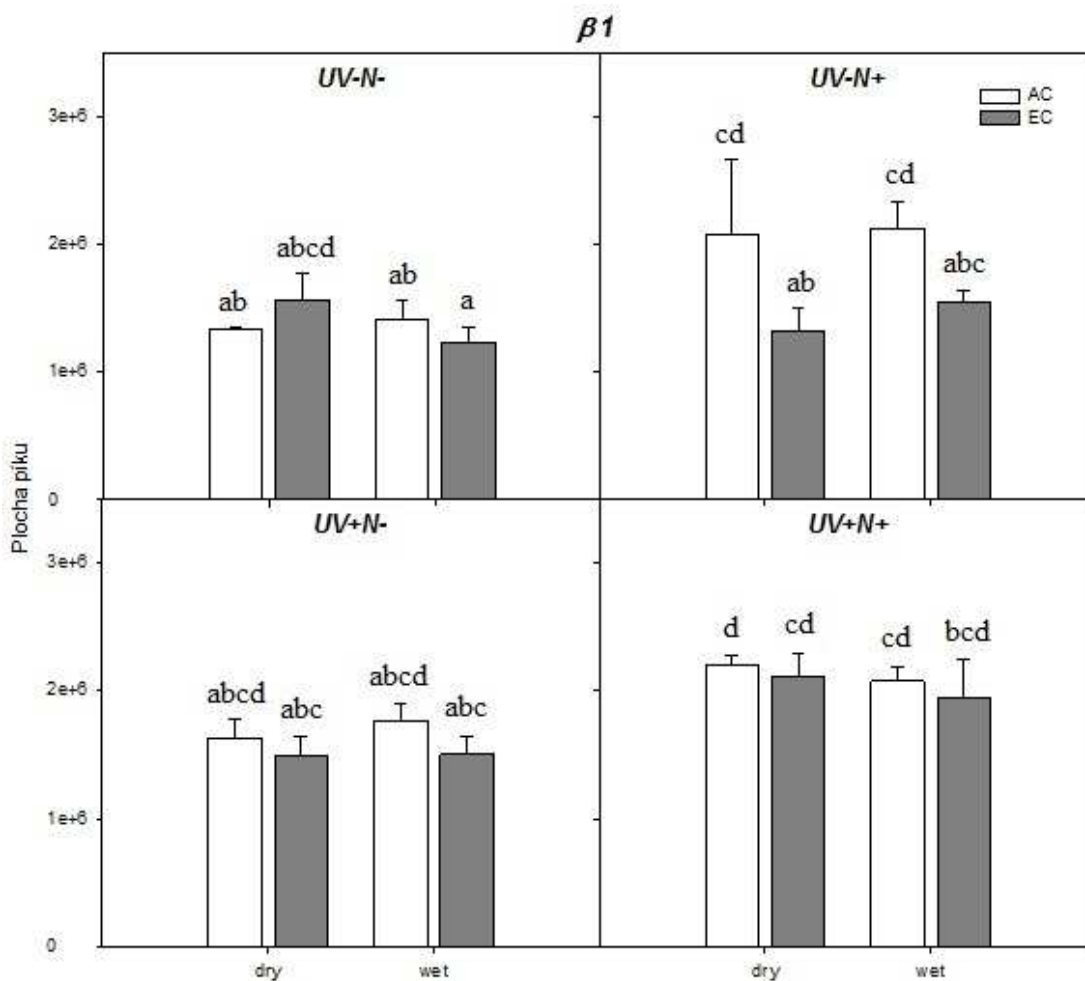
Obr. 20 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce ω -5 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Na obr. 20 byl také zjištěn průkazný vliv dusíkatého hnojení za podmínek sucha s vyloučením UV záření, ale tentokrát při zvýšené koncentraci CO_2 . Současně byly průkazné rozdíly dusíkatého hnojení v interakci s vyloučením sucha při zvýšené koncentraci CO_2 a bez působení UV záření. Dále byly zjištěny průkazné rozdíly při interakci dusíkatého hnojení a zvýšené koncentrace CO_2 za sucha a bez UV záření a naopak při interakci dusíkatého hnojení a normální koncentrace CO_2 při přirozených srážkách a působení UV záření. Obsah proteinů byl ve všech těchto variantách vyšší. Interakce dusíku s vyloučením UV záření také zvýšila obsah proteinů, a to za zvýšené koncentrace CO_2 a sucha i při přirozených srážkách.



Obr. 21 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N^- vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce $\gamma 3$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

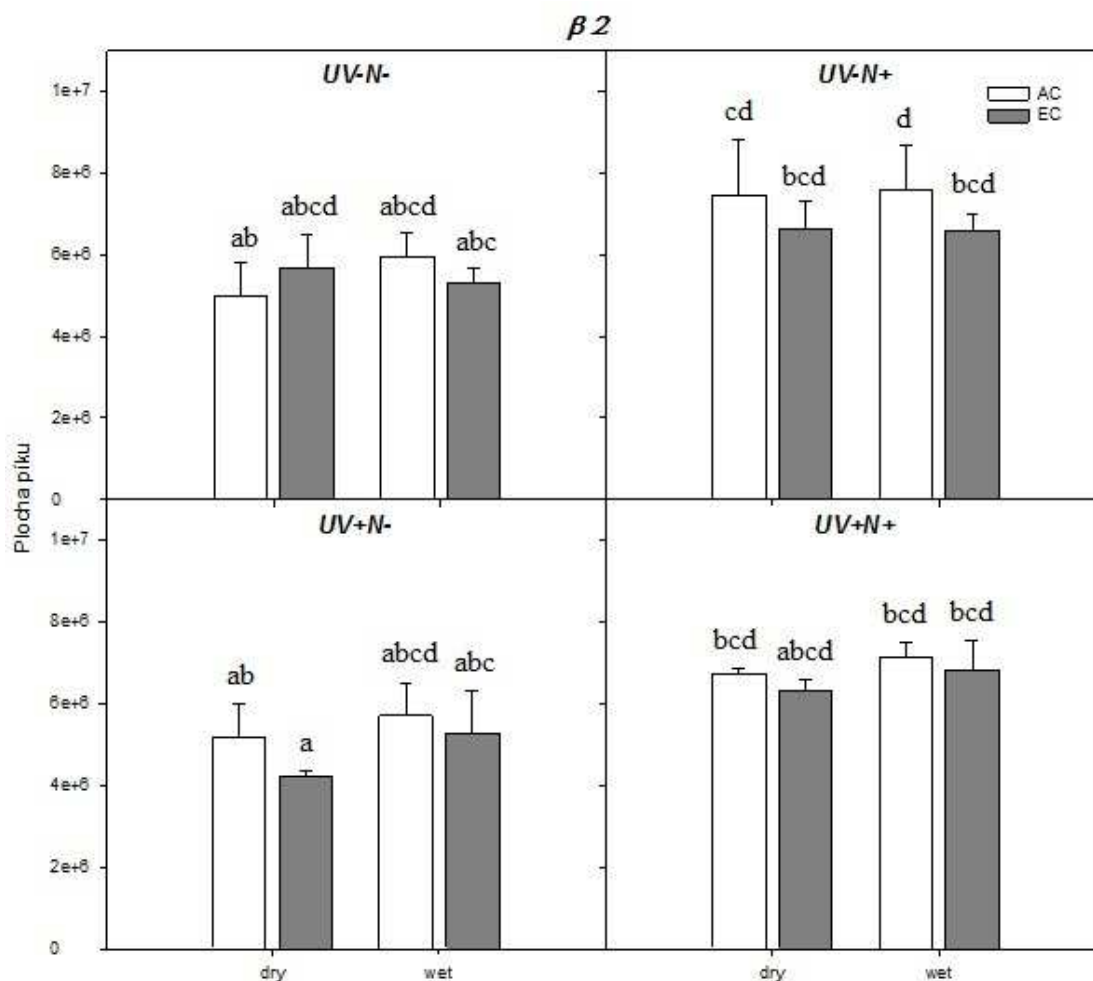
U třetí frakce γ -gliadinů (obr. 21) byl zjištěn průkazný rozdíl pouze mezi variantou pěstovanou ve zvýšené koncentraci CO_2 za sucha a současného působení UV záření s vyloučením dusíkatého hnojení a mezi variantou pěstovanou v normální koncentraci CO_2 při dostatku dusíku a srážek a při současném působení UV záření, přičemž vyšší obsah proteinů obsahovala druhá varianta. Ostatní rozdíly nebyly průkazné.



Obr. 22 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N⁺, sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV⁺) v rámci gliadinové frakce $\beta 1$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

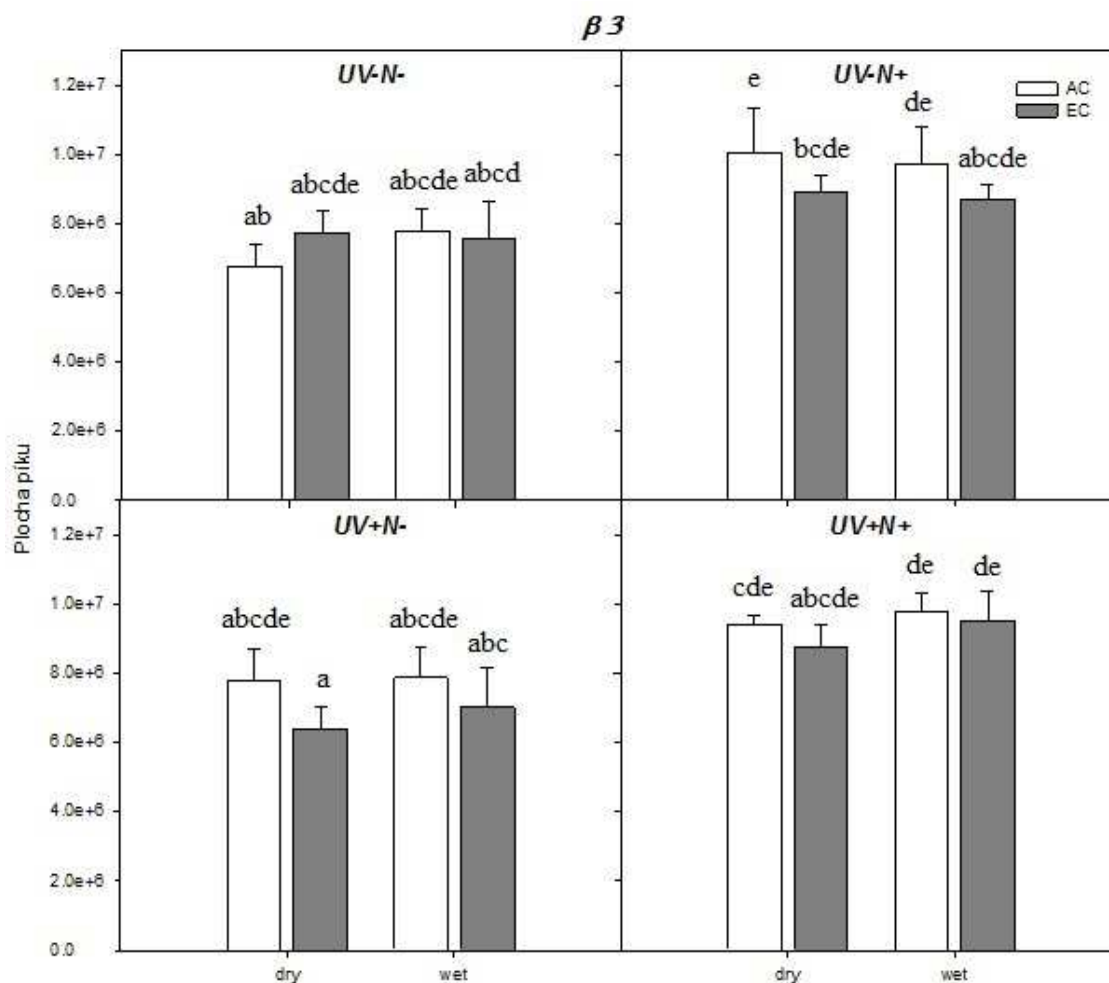
V rámci první frakce β -gliadinů (obr. 22) byl zjištěn průkazný rozdíl mezi variantami normální a zvýšené koncentrace CO₂, a to za podmínek sucha bez UV záření, pokud měla pšenice při vývoji dostatek dusíku, přičemž zvýšená koncentrace CO₂ obsah proteinů snížila. Podobný rozdíl se vyskytl i v případě varianty fumigované zvýšenou koncentrací CO₂ za sucha oproti normální koncentraci s přirozenou úrovní srážek za stejných podmínek dostupnosti UV záření a dusíku, kdy zvýšená koncentrace CO₂ v interakci se suchem snížila obsah proteinů této frakce. Průkazný vliv dusíku zvyšující obsah proteinů byl zjištěn při normální koncentraci CO₂ s vyloučením UV záření, a to za sucha i při přirozených srážkách. Interakce UV záření s dusíkatou výživou průkazně zvýšila obsah proteinů jednak při normální koncentraci CO₂ za sucha i za přirozených srážek a také při zvýšené koncentraci CO₂ a přirozených srážkách. Dále se zde také projevil průkazný vliv samotného UV záření v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ za sucha a s dostatkem dusíku, kdy došlo k nárůstu množství proteinů působením UV záření. Vliv zvýšené koncentrace CO₂ byl zjištěn pouze

v interakci s vyloučením dusíkatého hnojení při působení sucha a UV záření. V tomto případě se obsah proteinů snížil.



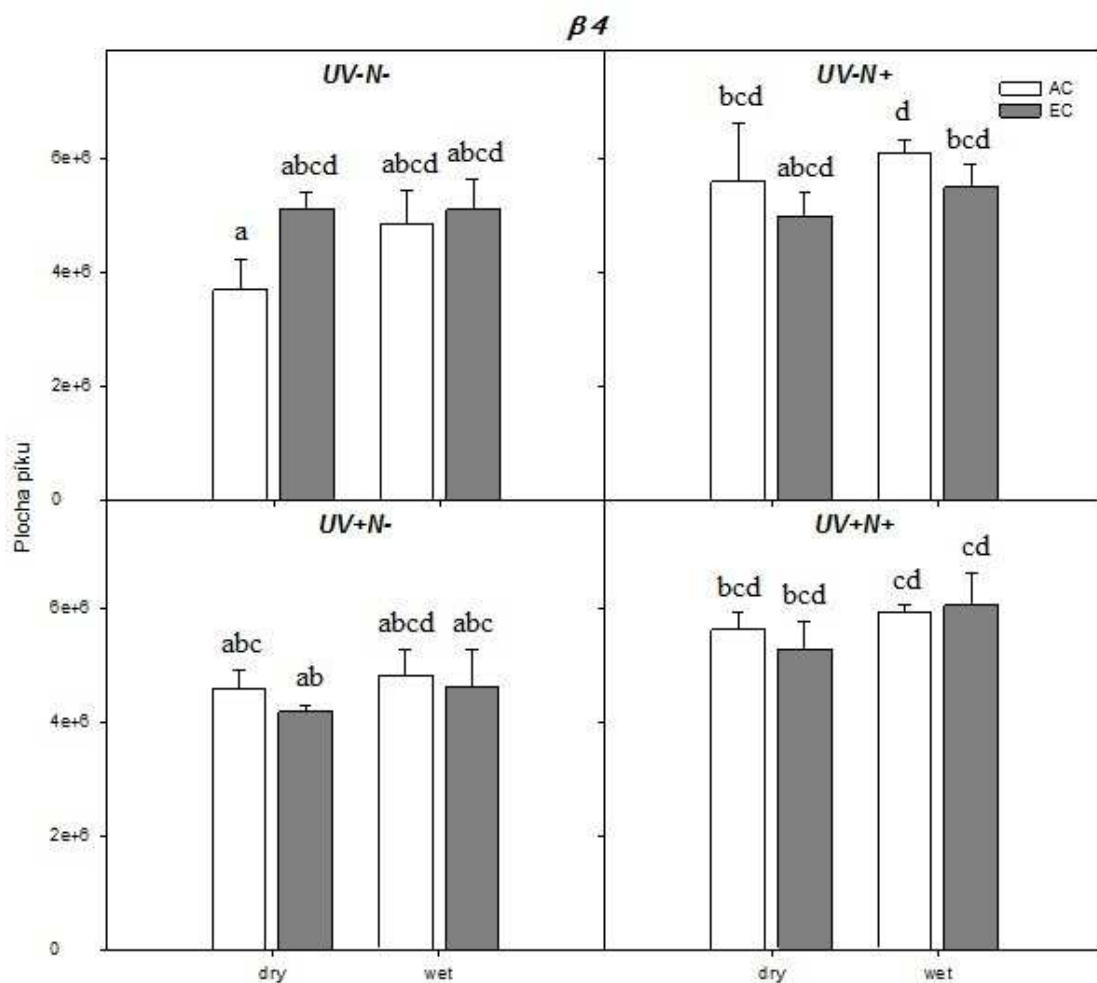
Obr. 23 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N^- vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce $\beta 2$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

U druhé frakce β -gliadinů (obr. 23) byl zjištěn vliv dusíkatého hnojení v podmínkách normální koncentrace CO_2 za sucha a bez UV záření. Dusíkatá výživa zvýšila obsah proteinů. Kromě toho byly také zjištěny průkazné rozdíly při interakci dusíkatého hnojení a přirozených srážek v podmínkách normální koncentrace CO_2 s vyloučením UV záření a stejně tak v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 za současného působení UV záření, přičemž obsah proteinů se v obou případech zvýšil. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 se projevil pouze v interakci s vyloučením dusíkatého hnojení, a to za podmínek s přirozenou úrovní srážek a bez UV záření nebo také za podmínek sucha s UV zářením, kdy došlo ke snížení obsahu proteinů. Navíc se projevilo významné zvýšení obsahu proteinů při interakci dusíkaté výživy s vyloučením UV záření za sucha a normální i zvýšené koncentrace CO_2 .



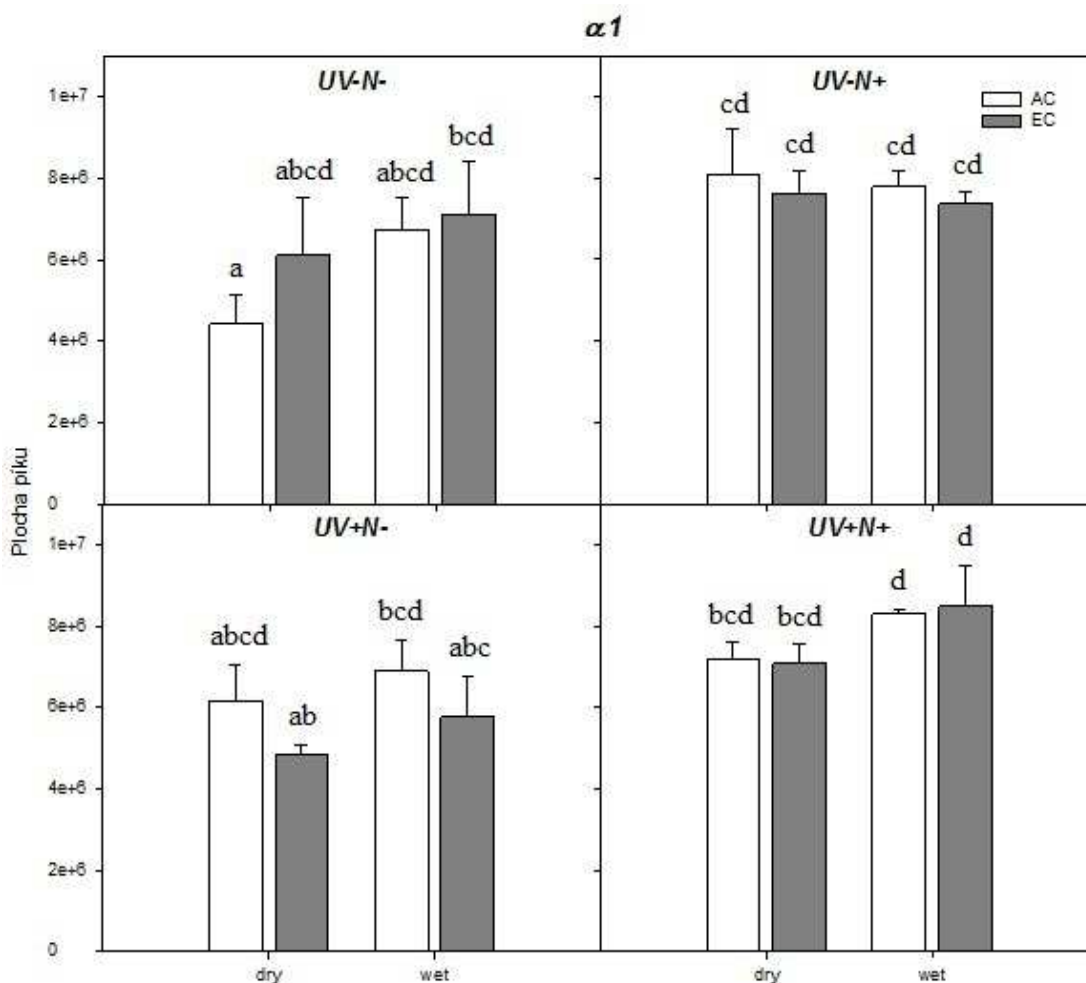
Obr. 24 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce $\beta 3$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Průkazný vliv dusíku byl zjištěn i u třetí frakce β -gliadinů (obr. 24), a to za normální koncentrace CO_2 , sucha a s vyloučením UV záření, ale také za zvýšené koncentrace CO_2 , přirozených srážkách a působení UV záření. Výživa dusíkem zvýšila množství proteinů této frakce. Interakce dusíku a přirozených srážek měla vliv na zvýšení obsahu proteinů ve dvou případech – buď za normální koncentrace CO_2 s vyloučením UV záření, nebo také za zvýšené koncentrace CO_2 při současném působení UV záření. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 se projevil pouze v interakci s vyloučením dusíkatého hnojení při působení UV záření jednak za sucha, tak i při normálních srážkách. Za těchto podmínek se obsah proteinů v rámci frakce snížil. Interakce dusíku s UV zářením významně zvýšila obsah proteinů v podmínkách normální koncentrace CO_2 a sucha. A také se obsah proteinů zvýšil při interakci dusíku s vyloučením UV záření za sucha a ovšem ve zvýšené koncentraci CO_2 .



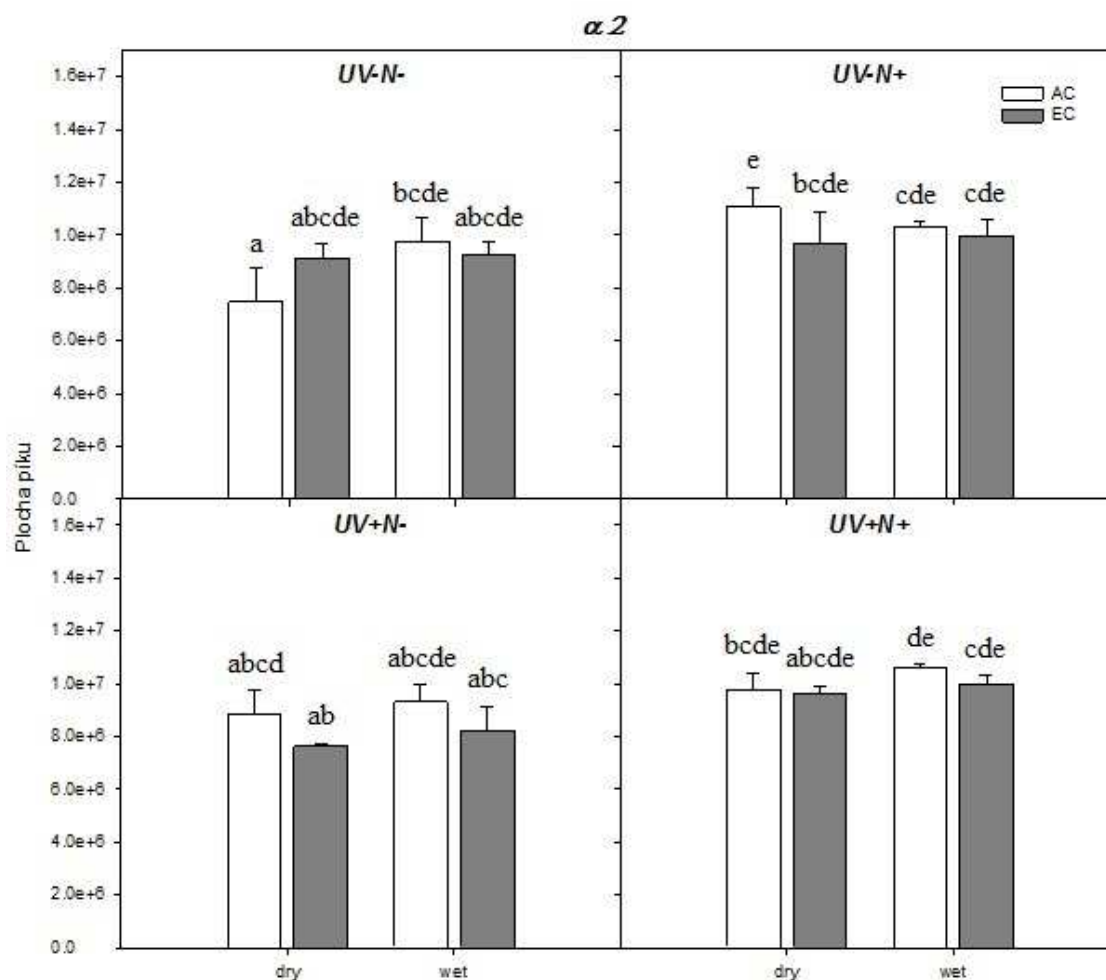
Obr. 25 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N⁻ vs. N⁺, sucho – dry vs. wet, UV záření – UV⁻ vs. UV⁺) v rámci gliadinové frakce $\beta 4$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

U čtvrté β -gliadinové frakce (obr. 25) byl průkazný vliv dusíku za podmínek normální koncentrace CO₂ a sucha bez UV záření. Dále měla vliv interakce dusíkatého hnojení s normální úrovní srážek, a to při normální koncentraci CO₂ bez UV záření a při zvýšené koncentraci CO₂ s UV zářením. A Kromě toho byl zjištěn významný rozdíl u interakce dusíku s UV zářením za sucha a normální koncentrace CO₂. Všechny tyto interakce zvýšily množství gliadinových proteinů frakce $\beta 4$.



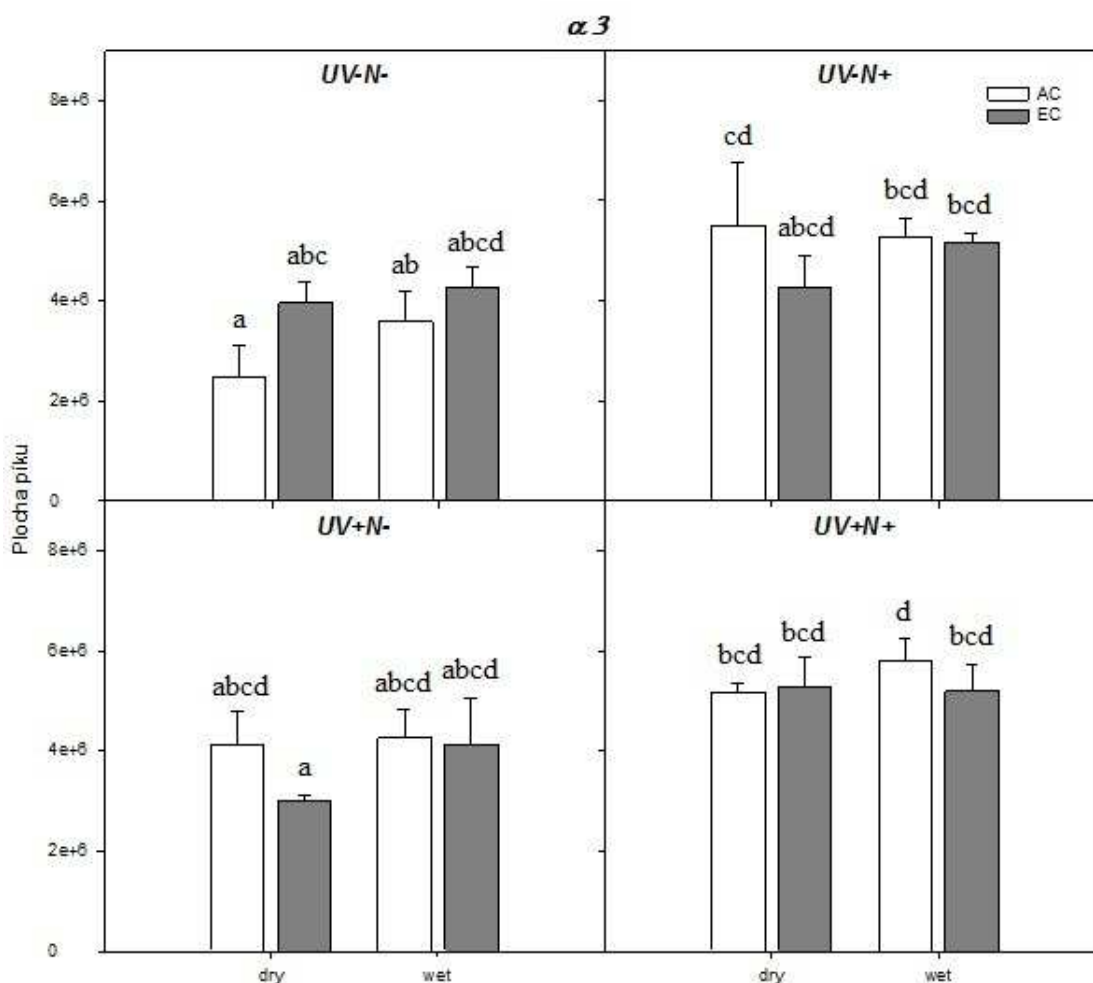
Obr. 26 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N⁺, sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV⁺) v rámci gliadinové frakce $\alpha 1$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

V podmínkách bez UV záření a dusíkatého hnojení byl u první frakce α -gliadinů (obr. 26) zjištěn průkazný rozdíl mezi variantou s normální koncentrací CO₂ a za sucha a variantou se zvýšenou koncentrací CO₂ s běžnou úrovní srážek, přičemž druhá varianta měla obsah proteinů vyšší. Dále byl zjištěn průkazný vliv dusíku za normální koncentrace CO₂, sucha a bez UV záření a také za zvýšené koncentrace CO₂ s přirozenou úrovní srážek a při působení UV záření. V obou případech byl obsah proteinů vyšší. Vliv CO₂ se projevil dvěma způsoby – jednak v interakci s dusíkatým hnojením za sucha a bez UV záření se obsah proteinů zvýšil, ale také v interakci s vyloučením dusíkatého hnojení při normálních srážkách a působení UV záření se obsah proteinů snížil. Kromě toho byl zjištěn zvýšený obsah proteinů při interakci dusíku s přirozenými srážkami v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ se současným působením UV záření a také při interakci srážek s UV zářením za normální koncentrace CO₂ bez dusíkaté výživy. Navíc se obsah proteinů významně zvýšil i v rámci interakce dusíku s UV zářením za sucha a normální koncentrace CO₂ a pak také při interakci dusíku s vyloučením UV záření za sucha ovšem při zvýšené koncentraci CO₂.



Obr. 27 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N^+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV^+) v rámci gliadinové frakce $\alpha 2$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

V rámci druhé frakce α -gliadinů (obr. 27) byl zjištěn průkazný rozdíl ve vlivu sucha za podmínek normální koncentrace CO_2 bez přístupu UV záření a bez aplikace dusíkatého hnojení, které mělo za následek snížení množství proteinů. Dále byl zjištěn průkazný vliv dusíku na zvýšení obsahu proteinů v podmínkách normální koncentrace CO_2 za sucha a bez UV záření. Průkazný vliv interakce zvýšené koncentrace CO_2 a dusíku se projevil vyšším množstvím proteinů v podmínkách sucha bez UV záření a v podmínkách přirozených srážek s působícím UV zářením se projevila interakce zvýšené koncentrace CO_2 s vyloučením dusíkatého hnojení naopak nižším množstvím proteinů. Kromě toho byla také zjištěna interakce dusíku s přirozenými srážkami jednak za normální koncentrace CO_2 s vyloučením UV záření, ale také za zvýšené koncentrace CO_2 s UV zářením, kdy v obou případech došlo k navýšení obsahu proteinů. Významné zvýšení obsahu proteinů bylo patrné i při interakci dusíku s UV zářením a také dusíku s vyloučením UV záření za sucha a normální koncentrace CO_2 .



Obr. 28 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojení – N vs. N⁺, sucho – dry vs. wet, UV záření – UV vs. UV⁺) v rámci gliadinové frakce $\alpha 3$. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Průkazný vliv dusíku byl u poslední gliadinové frakce $\alpha 3$ (obr. 28) zjištěn opět u variant pěstovaných v podmínkách normální koncentrace CO₂ za sucha a s vyloučením UV záření a zvýšené koncentrace CO₂ za sucha, ale za současného působení UV záření. Obsah proteinů byl významně vyšší. Vliv interakce dusíku a sucha se projevil při normální koncentraci CO₂ s vyloučením UV záření a vliv dusíku v kombinaci s přirozenými srážkami byl průkazný ve zvýšené koncentraci CO₂ za současného působení UV záření. V obou případech bylo množství proteinů vyšší. Zvýšená koncentrace CO₂ průkazně snížila množství proteinů v této frakci, pouze pokud bylo současně vyloučeno dusíkaté hnojení oproti variantě s normální koncentrací CO₂, a to za podmínek sucha s působením UV záření. Interakce dusíku s UV zářením zvýšila obsah proteinů při normální koncentraci CO₂ jak za sucha, tak při normální úrovni srážek.

4.1 Korelační analýza

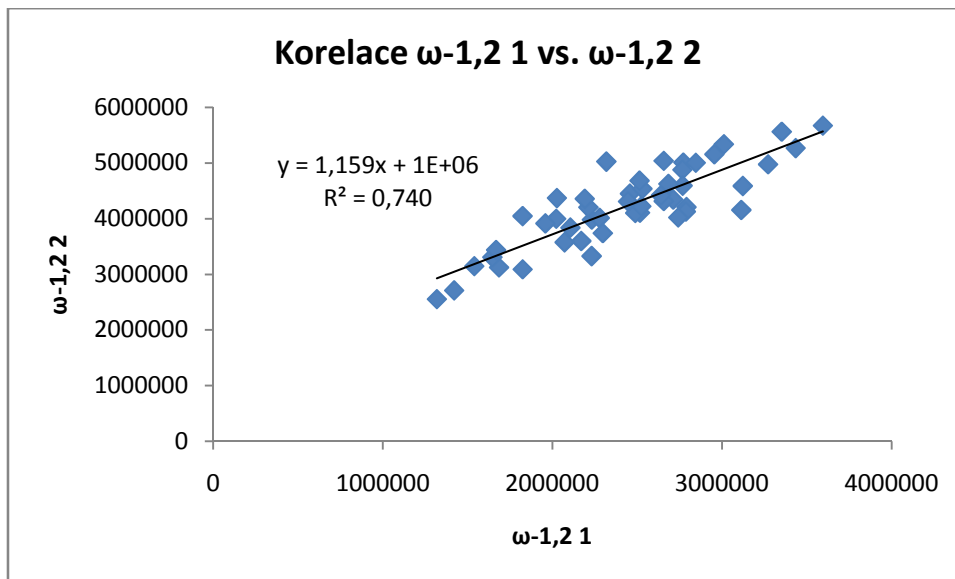
Tab. 2 Hodnoty korelačních koeficientů pro všechny gliadinové frakce

	Celkové proteiny	ω -1,2 1	ω -1,2 2	ω -1,2 3	ω -5 1	ω -5 2	ω -5 3	ω -5 4	γ 1	γ 2	γ 3
Celkové proteiny	1										
ω -1,2 1	0,4740	1									
ω -1,2 2	0,6533	0,8605	1								
ω -1,2 3	0,7789	0,7852	0,8564	1							
ω -5 1	0,4638	0,2580	0,4311	0,5538	1						
ω -5 2	0,6573	0,7780	0,8471	0,7798	0,2522	1					
ω -5 3	0,5914	0,5975	0,8048	0,7647	0,4182	0,7795	1				
ω -5 4	0,7308	0,5965	0,7764	0,7160	0,4730	0,7569	0,7361	1			
γ 1	-0,1416	0,0475	-0,1050	-0,1464	-0,1917	-0,0590	-0,3376	-0,0573	1		
γ 2	0,4531	0,5130	0,6058	0,5697	0,3692	0,5274	0,5124	0,5754	0,2855	1	
γ 3	0,6357	0,5243	0,6546	0,7015	0,3149	0,5986	0,6311	0,6085	0,1765	0,7974	1
γ 4	0,0020	-0,0885	0,0095	0,0262	0,3913	-0,1080	0,0444	0,1891	0,1904	0,3894	0,2972
β 1	0,6590	0,1132	0,2932	0,4425	0,3885	0,2731	0,2325	0,4126	0,3331	0,5892	0,6771
β 2	0,8132	0,6315	0,7884	0,8167	0,4237	0,7755	0,6420	0,7757	0,1295	0,7166	0,7894
β 3	0,8048	0,5727	0,7563	0,7982	0,4679	0,7444	0,6041	0,7243	0,1315	0,6977	0,7751
β 4	0,6893	0,5445	0,6788	0,7486	0,5313	0,6241	0,5241	0,6794	0,1636	0,6333	0,6727
α 1	0,7024	0,5968	0,7484	0,7613	0,4711	0,7406	0,6364	0,7248	0,0164	0,6381	0,6495
α 2	0,6955	0,6907	0,8491	0,8221	0,5294	0,7702	0,7077	0,7876	0,0005	0,7349	0,7197
α 3	0,7713	0,4267	0,6353	0,7747	0,5964	0,5769	0,5589	0,6197	-0,1139	0,5982	0,6721

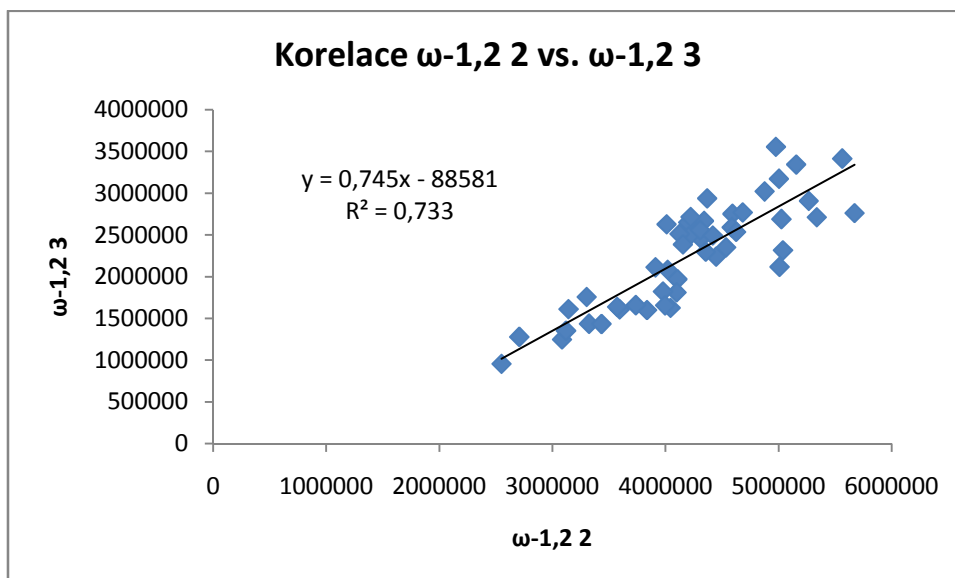
	$\gamma 4$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
Celkové proteiny								
ω -1,2 1								
ω -1,2 2								
ω -1,2 3								
ω -5 1								
ω -5 2								
ω -5 3								
ω -5 4								
$\gamma 1$								
$\gamma 2$								
$\gamma 3$								
$\gamma 4$	1							
$\beta 1$	0,3167	1						
$\beta 2$	0,0941	0,6648	1					
$\beta 3$	0,1561	0,7155	0,9475	1				
$\beta 4$	0,3251	0,6457	0,8626	0,8814	1			
$\alpha 1$	0,2386	0,5142	0,8478	0,8839	0,8915	1		
$\alpha 2$	0,2355	0,5190	0,8705	0,8652	0,8651	0,8886	1	
$\alpha 3$	0,3098	0,6797	0,7989	0,8250	0,8666	0,8229	0,8184	1

Hodnoty korelačních koeficientů v tab. 2 naznačují míru závislosti mezi množstvím jednotlivých gliadinových podjednotek. Korelace znamená, že vzájemný vztah mezi dvěma veličinami má lineární charakter. Kritická hodnota korelačního koeficientu určující průkazně závislý vztah při hladině statistické významnosti 0,05 je 0,2848. Hodnoty, které jsou větší, než je kritická hodnota říkají, že množství daných podjednotek je průkazně závislé. Závislosti s nejvyššími korelačními koeficienty (vyšší než 0,8) byly vyneseny do grafů. Příklady takových grafů jsou uvedeny na obr. 29 a 30, které zobrazují korelaci mezi podjednotkami ω -1,2 1 a ω -1,2 2, resp. ω -1,2 2 a ω -1,2 3. Tyto podjednotky jsou v rámci jejich množství silně závislé. Zbylé grafy (obr. 31–51) jsou uvedeny v příloze 9.1.

Podle výsledků v tab. 2 byla silná korelace prokázána prakticky mezi všemi podjednotkami β - a α -gliadinů. Naopak nebyla korelace průkazná u frakcí $\gamma 1$ a $\gamma 4$ se všemi ostatními gliadiny, kromě $\gamma 2$ a $\beta 1$, resp. ω -5 1, $\gamma 2$ a $\gamma 3$, $\beta 1$ a $\beta 4$ a $\alpha 3$. U ostatních frakcí byly vztahy průkazně závislé téměř všechny.



Obr. 29 Korelace $\omega-1,2 1$ vs. $\omega-1,2 2$ s korelačním koeficientem 0,8605 ($p = 0,01$).



Obr. 30 Korelace $\omega-1,2 2$ vs. $\omega-1,2 3$ s korelačním koeficientem 0,8564 ($p = 0,01$).

5 DISKUSE

Na základě výsledků našeho experimentu byl vyhodnocen vliv jednotlivých faktorů na množství proteinů v každé gliadinové frakci. Jednoznačně nejmarkantnější vliv na obsah gliadinových proteinů měla výživa dusíkem, která průkazně zvyšuje množství proteinů v pšeničném zrně, a to za velmi různorodých podmínek. Nejvíce podjednotek významně reagovalo při podmínkách normální koncentrace CO₂ za sucha a bez UV záření. Jedná se o proteiny frakcí ω-1,2 3, ω-5 2, všechny β (1–4) i α-gliadiny (1–3). V ostatních podmínkách již neměl vliv takový rozsah. Za normální koncentrace CO₂ při přirozených srážkách bez UV záření byly ovlivněny pouze proteiny frakce β 1 a při působení UV záření zase pouze ω-1,2 3. Za zvýšené koncentrace CO₂ byl zaznamenán největší vliv při přirozených srážkách se současným působením UV záření, což se týkalo frakcí ω-1,2 3, β 3 a α 1. Za sucha a bez UV záření byl významný rozdíl u ω-5 2 a ω-5 3, s UV zářením pouze u α 3.

Kromě samostatných vlivů se projevíly také interakce jednotlivých parametrů. Významnou roli zde hraje opět dusík, jehož interakce se projevila v mnoha případech. Velmi významná byla interakce dusíkaté výživy a UV záření. Nejvíce podjednotek ovlivnila v podmínkách normální koncentrace CO₂ a sucha. Jsou to ω-1,2 2, β 1, β 3, β 4 a všechny α-gliadiny. Při přirozených srážkách se vliv projevil pouze u frakcí β 1 a α 3. Za zvýšené koncentrace CO₂ a sucha se významně zvýšilo množství proteinů jen u ω-1,2 2 gliadinů a s přirozenými srážkami u β 1 gliadinů. Interakce dusíku se současným vyloučením UV záření se projevila naopak hlavně v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ a sucha, a to u ω-1,2 3, ω-5 2, ω-5 3, β 2, β 3 a α 1 gliadinů. Navíc ještě frakce ω-5 3 reagovala při zvýšené koncentraci CO₂ s přirozenými srážkami a β 2 a α 2 gliadiny při normální koncentraci CO₂ a za sucha.

Obsah proteinů v gliadinových frakcích také významně zvýšil vliv interakce dusíku s přirozenými srážkami. Nejvíce v podmínkách normální koncentrace CO₂ s vyloučením UV záření (β 2, β 3, β 4 a α 2) a zvýšené koncentrace CO₂ při působení UV záření (β 3, β 4 a všechny α-gliadiny). ω-1,2 3 gliadiny zvýšily svůj obsah za normální koncentrace CO₂ s UV zářením a ω-5 3 a β 2 gliadiny za zvýšené koncentrace bez UV záření. Dusík v interakci se suchem významně zvýšil obsah proteinů pouze u frakce α 3 v podmínkách normální koncentrace CO₂ bez UV záření.

Daniel a Triboi [76] zjistili různý vliv dodávek dusíku na podíly (relativní množství) jednotlivých frakcí v rámci celkových gliadinů. Podle jejich studie podíl ω-gliadinů slabě vzrostl, zatímco podíl α/β-gliadinů klesl a podíl γ-gliadinů zůstal stálý. Wieser a Seilmeier [77] uvádí nejen zřetelnější vliv na gliadiny oproti gluteninům, ale také větší vliv na hlavní proteinové typy (α/β-, γ-gliadiny a LMW podjednotky) v porovnání s minoritními frakcemi lepku (ω-gliadiny a HMW podjednotky). Navíc se vlivem vyšší hladiny dusíku podíl ω-gliadinů zvýšil a podíl γ-gliadinů se snížil, jak uvádějí i jiní autoři [78], [79], [80]. To zhruba odpovídá i našim výsledkům bez ohledu na ostatní faktory při pěstování. V rámci samotného množství se v jejich práci [77] obsah všech proteinů v jednotlivých frakcích zvýšil, nicméně u α/β- a γ-gliadinů byly rozdíly markantnější než u ω-1,2 a ω-5 gliadinů, i když ty vykazovaly nejvyšší relativní nárůst. Wieser a Seilmeier tento fakt vysvětlují tím, že zřejmě produkce ω-gliadinů byla podpořena vyšší dostupností dusíku pravděpodobně kvůli jejich extrémně vysokému obsahu glutaminu (ω-1,2: 44 %, ω-5: 55 %). Úbytek proteinů při vyloučení dusíkaté výživy je v literatuře [81] vysvětlen tím, že pokud byla po výkvětu

vynechána dusíkatá výživa, snížila se jak rychlost, tak doba trvání akumulace proteinů. Triboni [28] naopak tvrdí, že dusíkatá výživa nemá vliv na dobu trvání akumulace proteinových frakcí. Podle něj jsou v dospělosti rozdíly ve složení proteinových frakcí hlavně kvůli rozdílům v celkovém množství dusíku nahromaděného v průběhu plnění zrna.

Průkazný pokles obsahu proteinů vlivem zvýšené koncentrace CO₂ byl v rámci našeho experimentu zjištěn pouze u první frakce β-gliadinů v případě, kdy byla pšenice pěstována za sucha bez UV záření a s dostatkem dusíku. Stejně tak se pouze u této frakce projevil vliv UV záření za podmínek zvýšené koncentrace CO₂ a sucha s dusíkatou výživou, ale obsah proteinů se naopak zvýšil.

Interakce zvýšené koncentrace CO₂ s jinými faktory se projevila v malé míře stejně tak, jako samotná zvýšená koncentrace CO₂. V největším rozsahu to bylo v souvislosti s dusíkatou výživou. Interakce dusíkatého hnojení a zvýšené koncentrace CO₂ měla významný vliv pouze v podmínkách sucha bez UV záření. Obsah proteinů se zvýšil v rámci ω-1,2 3, ω-5 3, α 1 a α 2 gliadinů. Kromě toho měla průkazný vliv také interakce zvýšené koncentrace CO₂ s vyloučením dusíku oproti normální koncentraci CO₂ s dusíkatou výživou, ovšem v tomto případě se obsah proteinů snížil. Za sucha s UV zářením reagovaly frakce ω-1,2 3, β 1, β 2, β 3 a α 3, při přirozených srážkách s UV zářením ω-1,2 3, ω-5 3, β 3 a α 1 a α 2 a při přirozených srážkách bez UV záření pouze β 2 gliadiny.

Ke snížení obsahu proteinů také došlo při interakci zvýšené koncentrace CO₂ a sucha v podmínkách s dusíkatou výživou a bez UV záření, ale významný rozdíl se projevil pouze u β 1 gliadinů. Naopak interakce zvýšené koncentrace CO₂ s přirozenými srážkami se projevila pouze za podmínek bez dusíku i UV záření, a to u frakce α 1, kde se obsah proteinů zvýšil. V této frakci se navíc zvýšil obsah proteinů i při interakci UV záření s přirozenými srážkami za normální koncentrace CO₂ s vyloučením dusíkaté výživy.

Wroblewitz et al. [82] ve svém článku popsali zvýšený podíl ω-gliadinů, zejména ω-5 gliadinů, v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ se sníženými dávkami dusíku, zatímco α/β-gliadiny se snížily a γ-gliadiny se snížily jen nepatrně. Högy et al. [83] porovnávali samotné množství gliadinových frakcí a jejich výsledky ukazují pokles gliadinových proteinů, který byl zřetelnější u ω-1,2 a ω-5 gliadinů než u α/β- a γ-gliadinů. Tyto výsledky potvrzují i další studie se srovnatelným experimentem [17], [84]. Fangmeier [26] uvádí, že výsledky z předchozích celoevropských studií naznačují podobnou ztrátu proteinů v pšeničném zrně za zvýšené koncentrace CO₂ bez ohledu na množství dodávek dusíku. Respektive snížení kvality zrna indukované oxidem uhličitým nemůže být jednoduše překonáno zvýšením dusíkatého hnojení, jelikož to může vést spíše k větší produkci biomasy a výnosu, než k lepší redistribuci dusíku do zrn. Na druhou stranu Kimball et al. [85] tvrdí, že účinek zvýšené koncentrace CO₂ lze kompenzovat nadměrným hnojením dusíkem a predikují, že v polovině století by se mělo používat dvakrát tolik dusíku, aby byla zachována stále stejná kvalita pšeničné mouky. Podle Wiesera et al. [17] vykazují zřetelnější pokles gliadiny bohaté na dusík a glutamin, které jsou důležité pro viskoelastické vlastnosti, a gluteniny zůstávají neovlivněné. Kromě toho by podle nich měla být při zvýšené koncentraci CO₂ zvýšena účinnost využitelnosti dusíku, která se ale snižuje se zvyšující se dávkou dusíku a zdaleka převáží pozitivní účinek CO₂ [86].

K významnému snížení obsahu proteinů vlivem sucha podle našich výsledků došlo u jediné frakce, a to α 2 v podmínkách normální koncentrace CO₂ bez UV záření a dusíku. Yang et al.

[87] zaznamenali pokles proteinů vlivem sucha v rámci α/β - a γ -gliadinové frakce. Altenbach et al. [81] zkoumali vliv teploty, sucha a dusíkaté výživy na akumulaci pšeničných proteinů a došli k závěru, že sucho za režimu s vyšší teplotou zkrátilo dobu maximálního obsahu vody a dobu akumulace škrobu, ale neovlivnilo načasování a akumulaci proteinů a vysychání zrna. V další studii [28] se říká, že sucho po výkvětu snížilo rychlost akumulace gliadinů o 40 % při nižší teplotě a o 30 % při vyšší teplotě.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření a jejich vzájemných interakcí na obsah proteinů gliadinové frakce.

Vzorky ozimé pšenice odrůdy Bohemia byly kultivovány na Experimentální stanici Centra výzkumu globální změny Akademie věd ČR v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem nacházejícím se v oblasti Českomoravské vrchoviny. Stanici tvoří 24 komor umožňujících automatickou fumigaci zvýšenou koncentrací CO₂, dále regulaci srážek a také omezenou propustnost pro UV záření u poloviny komor. Vzduch se zvýšenou koncentrací CO₂ obsahoval oxid uhličitý v koncentraci 700 μmol·mol⁻¹, přičemž fumigace byla zahájena v polovině května. Pšenice byla vyseta 10.–11. 10. 2013 v hustotě 4 MKS na ha. Plocha uvnitř komor byla rozdělena na dvě části, z nichž jedna byla hnojena dávkou dusíku 200 kg·ha⁻¹. Druhá část zůstala zcela bez hnojení. Sklizeň zralého zrna byla provedena ručně.

Separace proteinů gliadinových frakcí byla provedena metodou A-PAGE podle Polišíenské et al. [75] a ČSN 46 1085-2, obsah proteinů byl stanoven počítačovou denzitometrií.

Jednoznačně nejmarkantnější vliv na obsah gliadinových proteinů měla výživa dusíkem, která průkazně zvyšuje množství proteinů v pšeničném zru. Nejvíce podjednotek významně reagovalo při podmínkách normální koncentrace CO₂ za sucha a bez UV záření (ω-1,2 3, ω-5 2, všechny β i α-gliadiny). Za zvýšené koncentrace CO₂ byl zaznamenán největší vliv při přirozených srážkách se současným působením UV záření (ω-1,2 3, β 3 a α 1). V ostatních podmínkách již neměl vliv takový rozsah.

Kromě samostatných vlivů se projevíly také interakce jednotlivých parametrů. Významnou roli zde hraje opět dusík. Velmi významná byla interakce dusíkaté výživy a UV záření. Nejvíce podjednotek ovlivnila v podmínkách normální koncentrace CO₂ a sucha (ω-1,2 2, β 1, β 3, β 4 a všechny α-gliadiny). Interakce dusíku se současným vyloučením UV záření se projevila naopak hlavně v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ a sucha (ω-1,2 3, ω-5 2, ω-5 3, β 2, β 3 a α 1). Při interakci dusíku s přirozenými srážkami se obsah proteinů významně zvýšil nejvíce v podmínkách normální koncentrace CO₂ s vyloučením UV záření (β 2, β 3, β 4 a α 2) a zvýšené koncentrace CO₂ při působení UV záření (β 3, β 4 a všechny α-gliadiny).

Interakce zvýšené koncentrace CO₂ s jinými faktory i samotná zvýšená koncentrace CO₂ se projevíly v malé míře. Interakce dusíkatého hnojení a zvýšené koncentrace CO₂ měla významný vliv na zvýšení obsahu proteinů pouze v podmínkách sucha bez UV záření (ω-1,2 3, ω-5 3, α 1 a α 2 gliadiny). Kromě toho měla průkazný vliv také interakce zvýšené koncentrace CO₂ s vyloučením dusíku oproti normální koncentraci CO₂ s dusíkatou výživou, ovšem v tomto případě se obsah proteinů snížil. Za sucha s UV zářením reagovaly frakce ω-1,2 3, β 1, β 2, β 3 a α 3 a při přirozených srážkách s UV zářením ω-1,2 3, ω-5 3, β 3 a α 1 a α 2.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BURROUGHS, W. J. *Climate change: a multidisciplinary approach*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2007, xi, 378 p. ISBN 05-218-7015-1.
- [2] KRÄUCHI, N. Potential impacts of a climate change on forest ecosystems. *Forest Pathology*. 1993, vol. 23, issue 1, s. 28-50. DOI: 10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x>
- [3] COHMAP Members. Climatic Changes of the Last 18,000 Years: Observations and Model Simulations. *Science*. 1988-08-26, vol. 241, issue 4869, s. 1043-1052. DOI: 10.1126/science.241.4869.1043. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.241.4869.1043>
- [4] MAREK, M. V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011, 253 s. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [5] JOOS, F. a R. SPAHNI. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008-02-05, vol. 105, issue 5, s. 1425-1430. DOI: 10.1073/pnas.0707386105. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707386105>
- [6] MANN, M. E. a P. D. JONES. Global surface temperatures over the past two millennia. *Geophysical Research Letters*. 2003, vol. 30, issue 15. DOI: 10.1029/2003GL017814. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1029/2003GL017814>
- [7] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-858-6662-5.
- [8] RAMANATHAN, V. The Greenhouse Theory of Climate Change: A Test by an Inadvertent Global Experiment. *Science*. 1988-04-15, vol. 240, issue 4850, s. 293-299. DOI: 10.1126/science.240.4850.293. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.240.4850.293>
- [9] SMITH, T. M., W. P. CRAMER, R. K. DIXON, R. LEEMANS, R. P. NEILSON a A. M. SOLOMON. The Global Terrestrial Carbon Cycle. *Terrestrial Biospheric Carbon Fluxes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, s. 19. DOI: 10.1007/978-94-011-1982-5_2. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1982-5_2
- [10] RAYNAUD, D., J. JOUZEL, J. M. BARNOLA, J. CHAPPELLAZ, R. J. DELMAS a C. LORIUS. The Ice Record of Greenhouse Gases. *Science* [online]. 1993, vol. 259, issue 5097, s. 926-934 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1126/science.259.5097.926.
- [11] SOLOMON, S. *Climate change 2007: the physical science basis : contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. New York: Cambridge University Press, 2007, viii, 996 p. ISBN 05-217-0596-7.

- [12] CANADELL, J. G., C. LE QUERE, M. R. RAUPACH, C. B. FIELD, E. T. BUITENHUIS, P. CIAIS, T. J. CONWAY, N. P. GILLETT, R. A. HOUGHTON a G. MARLAND. Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007-11-20, vol. 104, issue 47, s. 18866-18870. DOI: 10.1073/pnas.0702737104. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702737104>
- [13] Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. *ESRL Global Monitoring Division - Global Greenhouse Gas Reference Network* [online]. 2015 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/index.html>
- [14] HÖNISCH, B., N. G. HEMMING, D. ARCHER, SIDDALL a J. F. MCMANUS. Atmospheric Carbon Dioxide Concentration Across the Mid-Pleistocene Transition. *Science*. 2009-06-18, vol. 324, issue 5934, s. 1551-1554. DOI: 10.1126/science.1171477. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171477>
- [15] BAZZAZ, F. A. Elevated CO₂ and plant productivity in the 21st century can we feed billions and preserve biological diversity?. GARAB, G. *Photosynthesis: Mechanisms and effects*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998, s. 3923-3940. ISBN 0-7923-5546-6.
- [16] HOLLAND, E. A., B. H. BRASWELL, J.-F. LAMARQUE, A. TOWNSEND, J. SULZMAN, J.-F. MÜLLER, F. DENTENER, G. BRASSEUR, H. LEVY, J. E. PENNER a G.-J. ROELOFS. Variations in the predicted spatial distribution of atmospheric nitrogen deposition and their impact on carbon uptake by terrestrial ecosystems. *Journal of Geophysical Research*. 1997, vol. 102, D13, s. 15849-15866. DOI: 10.1029/96JD03164. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1029/96JD03164>
- [17] WIESER, H., R. MANDERSCHIED, M. ERBS a H.-J. WEIGEL. Effects of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, vol. 56, issue 15, s. 6531-6535. DOI: 10.1021/jf8008603. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>
- [18] DIJKSTRA, P., AD. H. M. C. SCHAPENDONK, KO. GROENWOLD, M. JANSEN a S. C. Van De GEIJN. Seasonal changes in the response of winter wheat to elevated atmospheric CO₂ concentration grown in Open-Top Chambers and field tracking enclosures. *Global Change Biology* [online]. 1999, vol. 5, issue 5, s. 563-576 [cit. 2015-02-21]. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1999.00249.x.
- [19] LUO, Y., C. B. FIELD a H. A. MOONEY. Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated [CO₂]: interactions among carbon, nitrogen, and growth*. *Plant, Cell and Environment*. 1994, vol. 17, issue 11, s. 1195-1204. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1994.tb02017.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1994.tb02017.x>

- [20] BASSIRIRAD, H., K. L. GRIFFIN, J. F. REYNOLDS a B. R. STRAIN. Plant and Soil [online]. 1997, vol. 190, issue 1, s. 1-9 [cit. 2015-02-20]. DOI: 10.1023/a:1004206624311.
- [21] JABLONSKI, L. M., X. WANG a P. S. CURTIS. Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytologist* [online]. 2002, vol. 156, issue 1, s. 9-26 [cit. 2015-02-21]. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00494.x.
- [22] BATTIS, G. R., J.I.L. MORISON, R. H. ELLIS, P. HADLEY a T. R. WHEELER. Effects of CO₂ and temperature on growth and yield of crops of winter wheat over four seasons. *Developments in Crop Science*. 1997, vol. 25, s. 67-76. DOI: 10.1016/S0378-519X(97)80009-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378519X97800098>
- [23] MANDERSCHIED, R. a H. J. WEIGEL. Photosynthetic and growth responses of old and modern spring wheat cultivars to atmospheric CO₂ enrichment. *Agriculture, Ecosystems*. 1997, vol. 64, issue 1, s. 65-73. DOI: 10.1016/S0167-8809(97)00020-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880997000200>
- [24] MONJE, O. a B. BUGBEE. Adaptation to high CO₂ concentration in an optimal environment: radiation capture, canopy quantum yield and carbon use efficiency. *Plant, Cell and Environment*. 1998, vol. 21, issue 3, s. 315-324. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1998.00284.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.1998.00284.x>
- [25] WOLF, J. Effects of nutrient supply (NPK) on spring wheat response to elevated atmospheric CO₂. *Plant and Soil*. 1996, vol. 185, issue 1, s. 113-123. DOI: 10.1007/BF02257568. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02257568>
- [26] FANGMEIER, A., L. DE TEMMERMAN, L. MORTENSEN, K. KEMP, J. BURKE, R. MITCHELL, M. VAN OIJEN a H.-J. WEIGEL. Effects on nutrients and on grain quality in spring wheat crops grown under elevated CO₂ concentrations and stress conditions in the European, multiple-site experiment 'ESPACE-wheat'. *European Journal of Agronomy*. 1999, vol. 10, 3-4, s. 215-229. DOI: 10.1016/S1161-0301(99)00012-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S116103019900012X>
- [27] TAUB, D. R., B. MILLER a H. ALLEN. Effects of elevated CO₂ on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Global Change Biology* [online]. 2008, vol. 14, issue 3, s. 565-575 [cit. 2015-02-21]. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01511.x.
- [28] TRIBOI, E., P. MARTRE, A.-M. TRIBOI-BLONDEL. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*. 2003-05-13, vol. 54, issue 388, s. 1731-1742. DOI: 10.1093/jxb/erg183. Dostupné z: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erg183>

- [29] IDSO, S. B. a K. E. IDSO. Effects of atmospheric CO₂ enrichment on plant constituents related to animal and human health. *Environmental and Experimental Botany*. 2001, vol. 45, issue 2, s. 179-199. DOI: 10.1016/S0098-8472(00)00091-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847200000915>
- [30] NOVOTNÁ, K., P. RAJSNEROVÁ, B. VESELÁ, K. KLEM. Interactive effects of elevated CO₂ concentration, drought and nitrogen nutrition on yield and grain quality of spring barley and winter wheat. Rukopis článku na "14th Conference of Experimental Plant Biology" 8th to 11th September 2015 on the grounds of Mendel University in Brno.
- [31] Cereální suroviny. In: KUČEROVÁ, Jindřiška. *Zpracování zemědělských produktů - rostlinná část* [online]. 2015 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3576
- [32] WRIGLEY, C. W, F. BÉKÉS a W. BUSHUK. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACCI International, c2006, x, 466 p. ISBN 978-189-1127-519.
- [33] ŽILIC, S., D. DODIG, V. Hadži-Tašković ŠUKALOVIĆ, M. MAKSIMOVIĆ, G. SARATLIĆ a B. ŠKRBIĆ. Bread and durum wheat compared for antioxidants contents, and lipoxygenase and peroxidase activities. *International Journal of Food Science*. 2010, vol. 45, issue 7, s. 1360-1367. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02251.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2010.02251.x>
- [34] VOGEL, K. P., V. A. JOHNSON a P. J. MATTERN. Protein and Lysine Contents of Endosperm and Bran of the Parents and Progenies of Crosses of Common Wheat1. *Crop Science*. 1978, vol. 18, issue 5, s. 751-. DOI: 10.2135/cropsci1978.0011183X001800050014x. Dostupné z: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/18/5/CS0180050751>
- [35] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007, vol. 24, issue 2, s. 115-119. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535>
- [36] ZILIC, S., D. DODIG, M. MILASINOVIC-SEREMESIC, V. KANDIC, M. KOSTADINOVIC, S. PRODANOVIC a D. SAVIC. Small grain cereals compared for dietary fibre and protein contents. *Genetika*. 2011a, vol. 43, issue 2, s. 381-395. DOI: 10.2298/GENSR1102381Z. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0534-00121102381Z>
- [37] SIVAM, A. S., D. SUN-WATERHOUSE, S. Y. QUEK a C. O. PERERA. Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review. *Journal of Food Science*. 2010, vol. 75, issue 8, R163-R174. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x>

- [38] SINGH, N.K., K.W. SHEPHERD, P. LANGRIDGE a L.C. GRUEN. Purification and biochemical characterization of triticin, a legumin-like protein in wheat endosperm. *Journal of Cereal Science*. 1991, vol. 13, issue 3, s. 207-219. DOI: 10.1016/S0733-5210(09)80001-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521009800015>
- [39] STEHNO, Z., V. DVOŘÁČEK a L. DOTLAČIL. Wheat protein fractions in relation to grain quality characters of the cultivars registered in the Czech Republic 2004-2006. In: *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*, 24-29 August 2008, Brisbane, Qld., Australia. Sydney: Sydney University Press, 2008, s. 556-559. ISBN 9781920899141.
- [40] ZILIC, S., M. BARAC, M. PESIC, V. HADZI-TASKOVIC-SUKALOVIC, D. DODIGA, S. MLADENOVIC-DRINIC a M. JANKOVIC. Genetic variability of albumin-globulin content, and lipoxygenase, peroxidase activities among bread and durum wheat genotypes. *Genetika*. 2011b, vol. 43, issue 3, s. 503-516. DOI: 10.2298/GENSR1103503Z. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0534-00121103503Z>
- [41] GUPTA, R. B., K. W. SHEPHERD a F. MACRITCHIE. Genetic control and biochemical properties of some high molecular weight albumins in bread wheat. *Journal of Cereal Science*. 1991, vol. 13, issue 3, s. 221-235. DOI: 10.1016/S0733-5210(09)80002-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521009800027>
- [42] UTHAYAKUMARAN, S. Small and large strain rheology of wheat gluten. *Rheologica Acta*. 2002-1-1, vol. 41, 1-2, s. 162-172. DOI: 10.1007/s003970200015. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s003970200015>
- [43] DAY, L., M. A. AUGUSTIN, I. L. BATEY a C. W. WRIGLEY. Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science*. 2006, vol. 17, issue 2, s. 82-90. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405002487>
- [44] SHEWRY, P. R., A. S. TATHAM, J. FORDE, M. KREIS a B. J. MIFLIN. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*. 1986, vol. 4, issue 2, s. 97-106. DOI: 10.1016/S0733-5210(86)80012-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521086800121>
- [45] SHEWRY, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*. 2007, vol. 46, issue 3, s. 239-250. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.06.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073352100700118X>
- [46] WIESER, H. The use of redox agents in breadmaking. CAUVAIN, S. *Breadmaking: improving quality*. Second edition. Oxford: Elsevier, 2012, s. 447. ISBN 9780857090607.

- [47] WRIGLEY, C. W. a F. BÉKÉS. Glutenin-protein formation during the continuum from anthesis to processing. *Cereal Foods World*. 1999, vol. 44, s. 562-565.
- [48] RANDALL, P. J. a C. W. WRIGLEY. Effects of sulfur deficiency on the yield, composition and quality of grain from cereals, oilseeds and legumes. In: Edited by POMERANZ, Y. *Advances in cereal science and technology*. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc, 1986, s. 171-206. ISBN 9780913250457.
- [49] ŽILIC, S. Wheat Gluten: Composition and Health Effects. WALTER, D. B. *Gluten: sources, composition and health effects*. New York: Nova Biomedical, c2013, s. 71-86. Food science and technology series (Nova Science Publishers). ISBN 1626183430.
- [50] KHELIFI, G., G. BRANLARD a M. BOURGOIN-GRENECHE. Diversity of some D zone omega gliadins of bread wheat as revealed by 2 step A-PAGE/SDS-PAGE technique. *J. Genetic. Breeding*. 1992, č. 46, s. 351-358.
- [51] DZIUBA, M., D. NALECZ, I. SZERSZUNOWICZ a J. WAGA. Proteomic Analysis of Wheat α /A- and β -Gliadins. *Czech Journal of Food Sciences: potravinářské vědy*. Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2014, vol. 32, issue 5, s. 437-442.
- [52] ŽILIC, S., M. BARAC, M. PEŠIC, D. DODIG a D. IGNJATOVIĆ-MICIĆ. Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011c, vol. 12, issue 12, s. 5878-5894. DOI: 10.3390/ijms12095878. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5878/>
- [53] ABDEL-AAL, E.-S. M., D. A. SALAMA, P. HUCL, F. W. SOSULSKI a W. CAO. Electrophoretic Characterization of Spring Spelt Wheat Gliadins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, vol. 44, issue 8, s. 2117-2123. DOI: 10.1021/jf950752q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950752q>
- [54] MULLER, S. a H. WIESER. The Location of Disulphide Bonds in Monomeric γ -type Gliadins. *Journal of Cereal Science*. 1997, vol. 26, issue 2, s. 169-176. DOI: 10.1006/S0733-5210(97)90100-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521097901004>
- [55] TATHAM, A. S. a P. R. SHEWRY. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of α -, β -, γ - and ω -Gliadins. *Journal of Cereal Science*. 1985, vol. 3, issue 2, s. 103-113. DOI: 10.1016/S0733-5210(85)80021-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521085800217>
- [56] GOESAERT, H., K. BRIJS, W. S. VERAVERBEKE, C. M. COURTIN, K. GEBRUERS a J. A. DELCOUR. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science*. 2005, vol. 16, 1-3, s. 12-30. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224404001906>

- [57] PAYNE, P. I. Endosperm Proteins. Genetic approach to plant biochemistry. S.l.: Springer, 1986, s. 207-231.
- [58] GIANIBELLI, M. C., O. R. LARROQUE, F. MACRITCHIE a C. W. WRIGLEY. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry*. 2001, vol. 78, issue 6, s. 635-646. DOI: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635. Dostupné z: <http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635>
- [59] LINDSAY, M. P. a J. H. SKERRITT. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs. *Trends in Food Science*. 1999, vol. 10, issue 8, s. 247-253. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)00004-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224400000042>
- [60] WAGA, J. Purified Wheat Gliadin Proteins as Immunoglobulin E Binding Factors in Wheat Mediated Allergies. *American Journal of Plant Sciences*. 2011, vol. 02, issue 03, s. 476-483. DOI: 10.4236/ajps.2011.23056. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ajps.2011.23056>
- [61] SOLLID, L. M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology*. 2002, vol. 2, issue 9, s. 647-655. DOI: 10.1038/nri885. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri885>
- [62] RASHTAK, S. a J. A. MURRAY. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Alimentary Pharmacology*. 2012, vol. 35, issue 7, s. 768-781. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2012.05013.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2012.05013.x>
- [63] VADER, W., Y. KOOY, P. VAN VEELLEN, A. DE RU, D. HARRIS, W. BENCKHUIJSEN, S. PEÑA§, L. MEARIN‡, J. W. DRIJFHOUT a F. KONING. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*. 2002, vol. 122, issue 7, s. 1729-1737. DOI: 10.1053/gast.2002.33606. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502000057>
- [64] WAGA, J. a A. SKOCZOWSKI. Development and characteristics of ω -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica*. 2014, vol. 195, issue 1, s. 105-116. DOI: 10.1007/s10681-013-0984-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10681-013-0984-1>
- [65] SAPONE, A., J. C. BAI, C. CIACCI, J. DOLINSEK, P. HR GREEN, M. HADJIVASSILIOU, K. KAUKINEN, K. ROSTAMI, D. S SANDERS, M. SCHUMANN, R. ULLRICH, D. VILLALTA, U. VOLTA, C. CATASSI a A. FASANO. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*. 2012, vol. 10, issue 1. DOI: 10.1186/1741-7015-10-13. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/13>

- [66] TATHAM, A. S. a P. R. SHEWRY. Allergy to wheat and related cereals. *Clinical*. 2008, vol. 38, issue 11, s. 1712-1726. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x>
- [67] SCHEIBE, B. a R. WESTERMEIER. Gel Electrophoresis in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008-09-09. DOI: 10.1201/9781420045673.ch19. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420045673.ch19>
- [68] MAGDELDIN, S. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.
- [69] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [70] HAMŘÍKOVÁ, D. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah enzymu Rubisco u buku lesního a smrku ztepilého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 76 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [71] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular Info@* [online]. 2011 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html>
- [72] HAJŠLOVA, J., K. MASTOVSKA a T. CAJKA. Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008-09-09. DOI: 10.1201/9781420045673.ch10. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420045673.ch10>
- [73] YATES, J. R. Mass Spectral Analysis in Proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004-06-09, vol. 33, issue 1, s. 297-316. DOI: 10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538>
- [74] Jarní exkurze Centra výzkumu globální změny. In: *Týden vědy a techniky* [online]. 2014 [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: http://www.tydenvedy.cz/o-festivalu/jarni-exkurze-do-sveta-vedy/jarni-dny-otevrenych-dveri/Centrum_vyzkumu_globalni_zmeny.html
- [75] POLIŠENSKÁ, I., L. NEDOMOVÁ a S. CUPÁK. *Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforézy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]*. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 2010, 12 s. ISBN 978-80-86888-08-8.
- [76] DANIEL, C. a E. TRIBOI. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science*. 2000, vol. 32, issue 1, s. 45-56. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138>

- [77] WIESER, H. a W. 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*. 1998, č. 76, s. 49-55.
- [78] DUPONT, F. M., W. J. HURKMAN, W. H. VENSEL, R. CHAN, R. LOPEZ, C. K. TANAKA a S. B. ALTENBACH. Differential accumulation of sulfur-rich and sulfur-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development. *Journal of Cereal Science*. 2006, vol. 44, issue 1, s. 101-112. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.04.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521006000543>
- [79] DUPONT, F. M., W. J. HURKMAN, W. H. VENSEL, Ch. TANAKA, K. M. KOTHARI, O. K. CHUNG a S. B. ALTENBACH. Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy*. 2006, vol. 25, issue 2, s. 96-107. DOI: 10.1016/j.eja.2006.04.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1161030106000414>
- [80] ALTENBACH, S. B, Ch. K TANAKA, W. J HURKMAN, L. C WHITEHAND, W. H VENSEL a F. M DUPONT. Differential effects of a post-anthesis fertilizer regimen on the wheat flour proteome determined by quantitative 2-DE. *Proteome Science*. 2011, vol. 9, issue 1. DOI: 10.1186/1477-5956-9-46. Dostupné z: <http://www.proteomesci.com/content/9/1/46>
- [81] ALTENBACH, S. B., F. M. DUPONT, K. M. KOTHARI, R. CHAN, E. L. JOHNSON a D. LIEU. Temperature, Water and Fertilizer Influence the Timing of Key Events During Grain Development in a US Spring Wheat. *Journal of Cereal Science*. 2003, vol. 37, issue 1, s. 9-20. DOI: 10.1006/jcs.2002.0483. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521002904832>
- [82] WROBLEWITZ, S., L. HÜTHER, R. MANDERSCHIED, H.-J. WEIGEL, H. WÄTZIG a S. DÄNICKE. Effect of Rising Atmospheric Carbon Dioxide Concentration on the Protein Composition of Cereal Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014-07-16, vol. 62, issue 28, s. 6616-6625. DOI: 10.1021/jf501958a. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf501958a>
- [83] HÖGY, P., H. WIESER, P. KÖHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, M. ERBS, S. WEBER a A. FANGMEIER. Does elevated atmospheric CO₂ allow for sufficient wheat grain quality in the future. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2009, č. 82, s. 114-121.
- [84] HÖGY, P., M. BRUNNBAUER, P. KOEHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, J. FRANZARING, D. ZHUNUSBAYEVA a A. FANGMEIER. Grain quality characteristics of spring wheat (*Triticum aestivum*) as affected by free-air CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany*. 2013, vol. 88, s. 11-18. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847211003145>

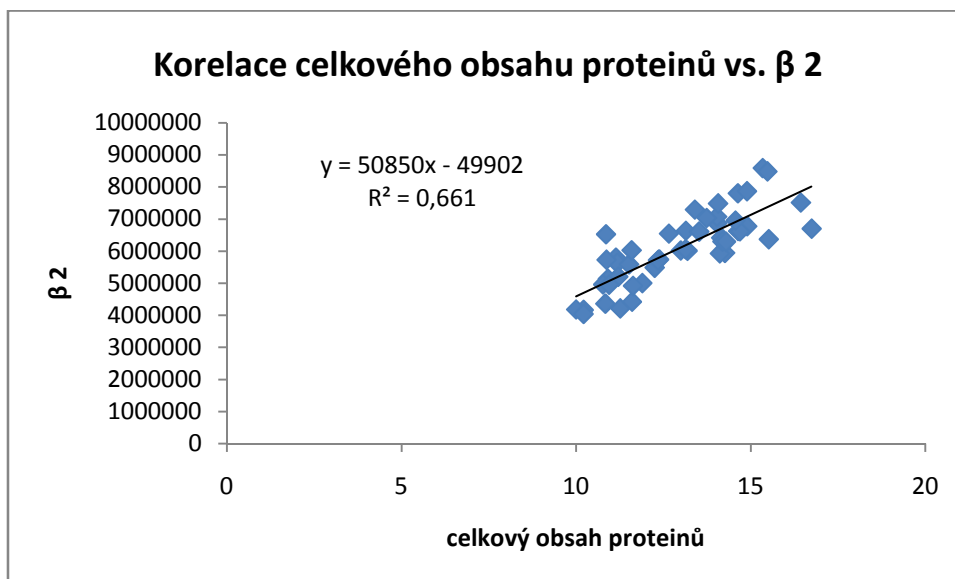
- [85] KIMBALL, B. A., C. F. MORRIS, P. J. PINTER, G. W. WALL, D. J. HUNSAKER, F. J. ADAMSEN, R. L. LAMORTE, S. W. LEAVITT, T. L. THOMPSON, A. D. MATTHIAS a T. J. BROOKS. Elevated CO₂, drought and soil nitrogen effects on wheat grain quality. *New Phytologist*. 2001, vol. 150, issue 2, s. 295-303.
- [86] CABRERA-BOSQUET, L., G. MOLERO, J. BORT, S. NOGUÉS a J. L. ARAUS. The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and Δ 13 C in durum wheat potted plants. *Annals of Applied Biology*. 2007, vol. 151, issue 3, s. 277-289. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00195.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7348.2007.00195.x>
- [87] YANG, F., A. D. JØRGENSEN, H. LI, I. SØNDERGAARD, Ch. FINNIE, B. SVENSSON, D. JIANG, B. WOLLENWEBER a S. JACOBSEN. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain. *PROTEOMICS*. 2011, vol. 11, issue 9, s. 1684-1695. DOI: 10.1002/pmic.201000654. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000654>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

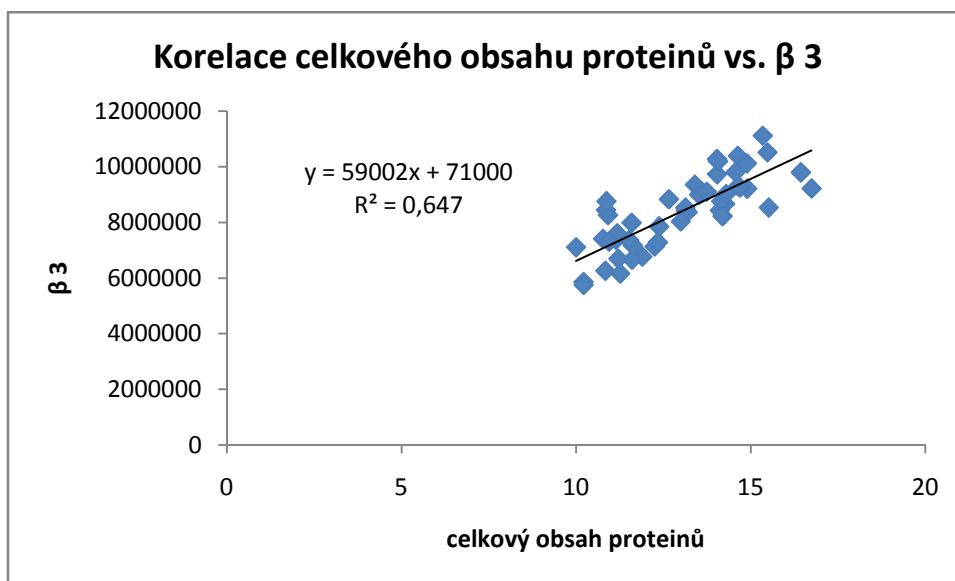
AC	normální koncentrace CO ₂
ANOVA	analýza variance (rozptylu)
A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
ATP	adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
COHMAP	Cooperation Holocene Mapping Project
ČSN	česká technická norma
DTT	dithiothreitol
EC	zvýšená koncentrace CO ₂
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HLA	human leukocyte antigen; hlavní histokompatibilní systém u člověka
HMW	vysokomolekulární podjednotky gluteninů
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IgE	imunoglobulin E
LMW	nízkomolekulární podjednotky gluteninů
MCP	mikrokanálová destička
MKS	miliony klíčivých semen
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NOAA	National Oceanic & Atmospheric Administration
OSN	Organizace spojených národů
RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxyláza/oxygenáza
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za použití SDS
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
TOF	Time-Of-Flight
TTG	tkáňová transglutamináza
UV	ultrafialové záření
WDEIA	cvičením způsobená anafylaxe závislá na pšenici

9 PŘÍLOHY

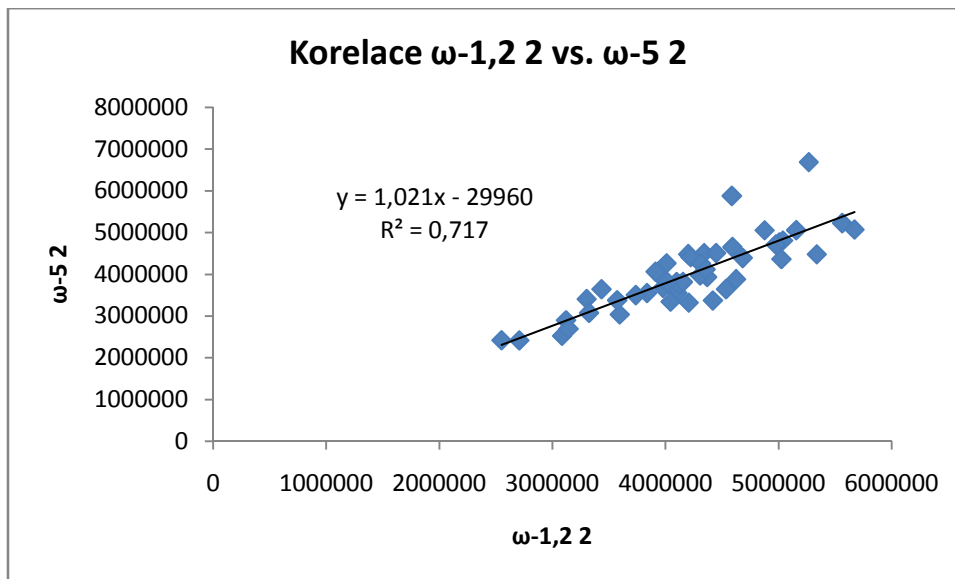
9.1 Grafy korelační analýzy



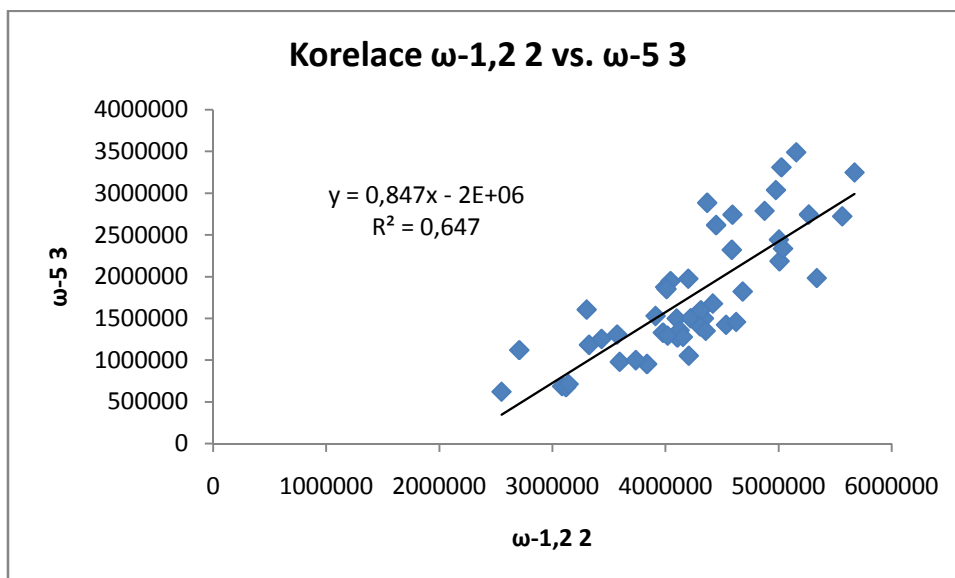
Obr. 31 Korelace celkového obsahu proteinů vs. $\beta 2$ s korelačním koeficientem 0,8132 ($p = 0,01$).



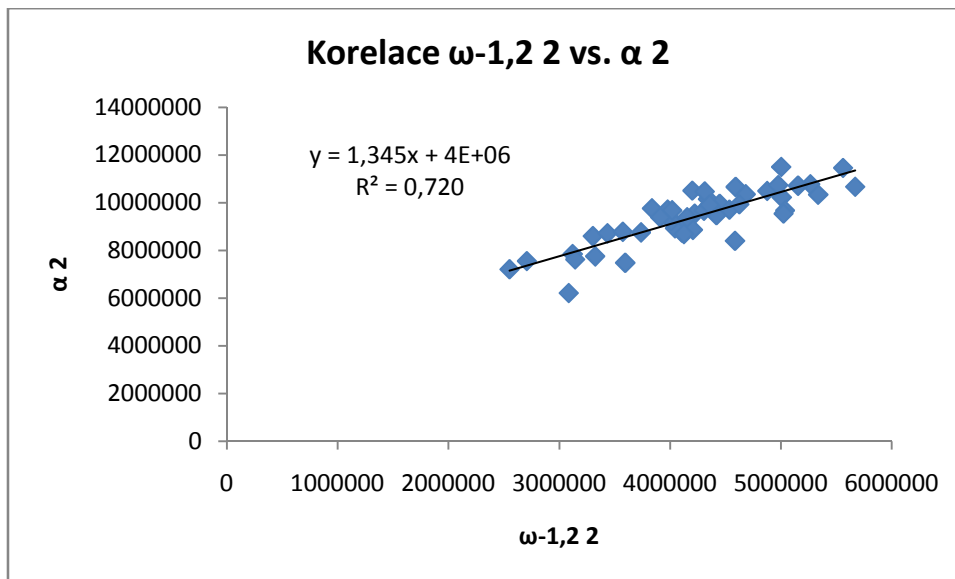
Obr. 32 Korelace celkového obsahu proteinů vs. $\beta 3$ s korelačním koeficientem 0,8048 ($p = 0,01$).



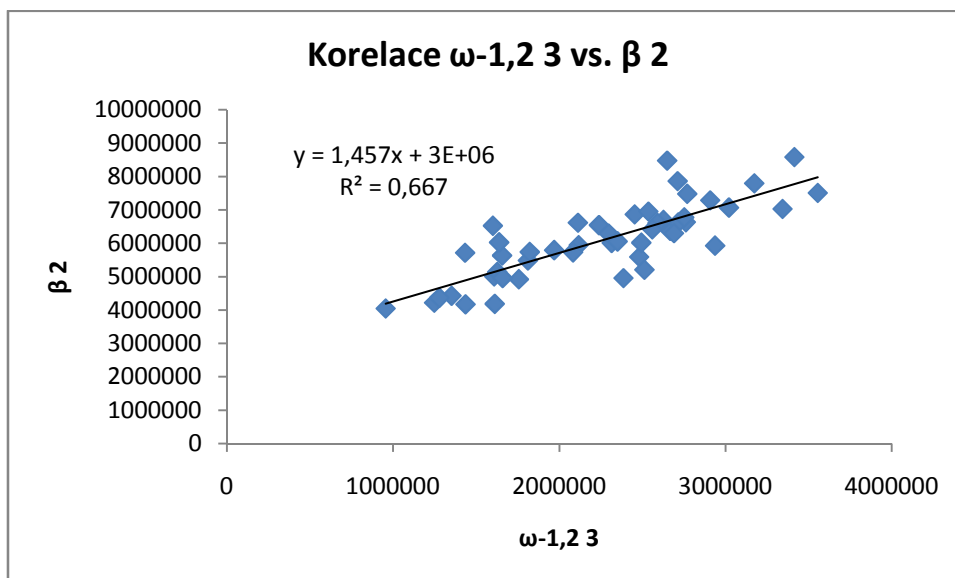
Obr. 33 Korelace $\omega-1,2$ 2 vs. $\omega-5$ 2 s korelačním koeficientem 0,8471 ($p = 0,01$).



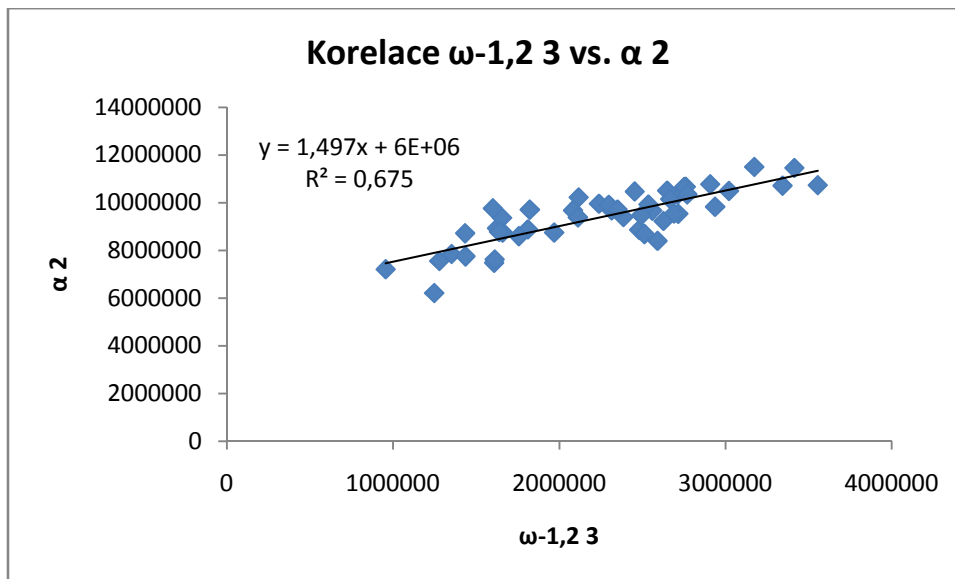
Obr. 34 Korelace $\omega-1,2$ 2 vs. $\omega-5$ 3 s korelačním koeficientem 0,8048 ($p = 0,01$).



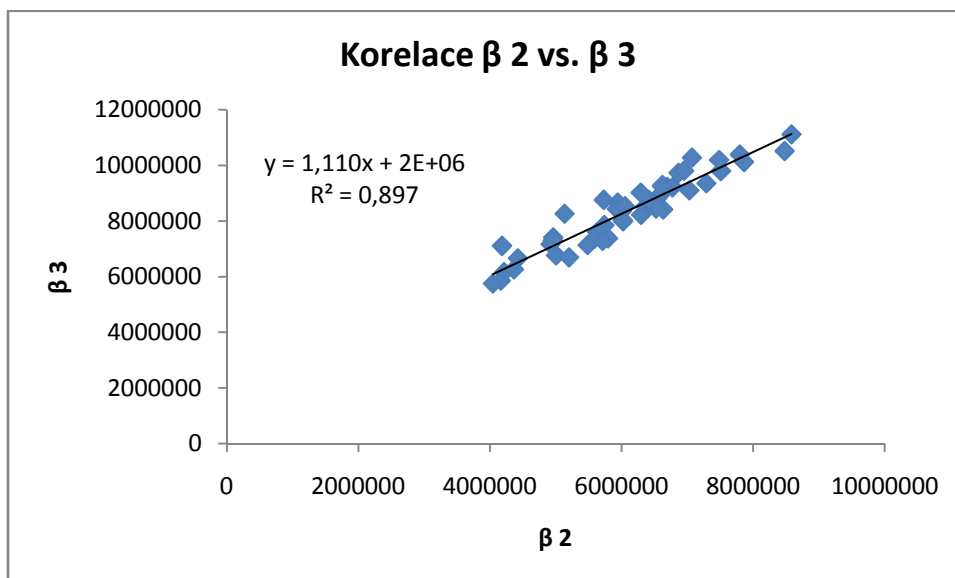
Obr. 35 Korelace $\omega-1,2\ 2$ vs. $\alpha\ 2$ s korelačním koeficientem 0,8491 ($p = 0,01$).



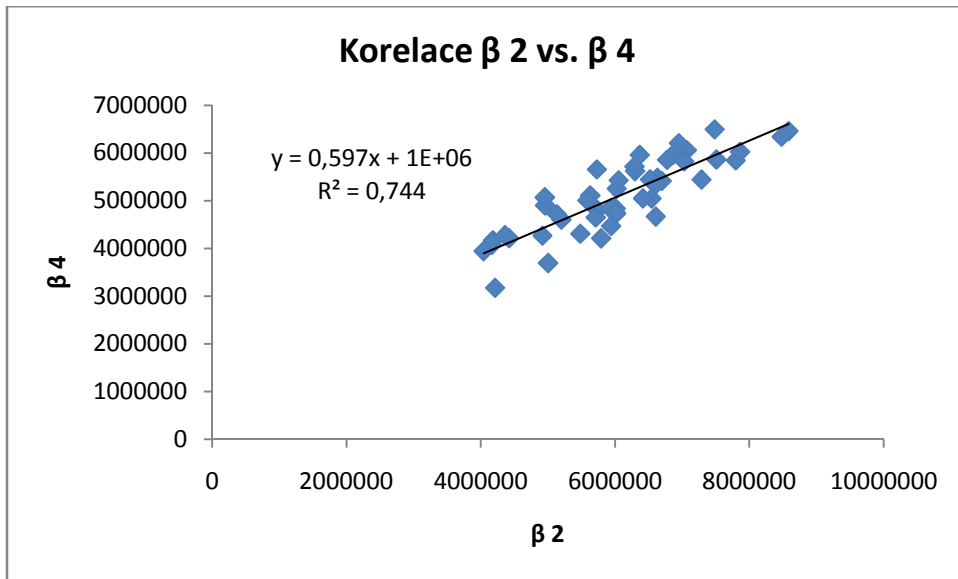
Obr. 36 Korelace $\omega-1,2\ 3$ vs. $\beta\ 2$ s korelačním koeficientem 0,8167 ($p = 0,01$).



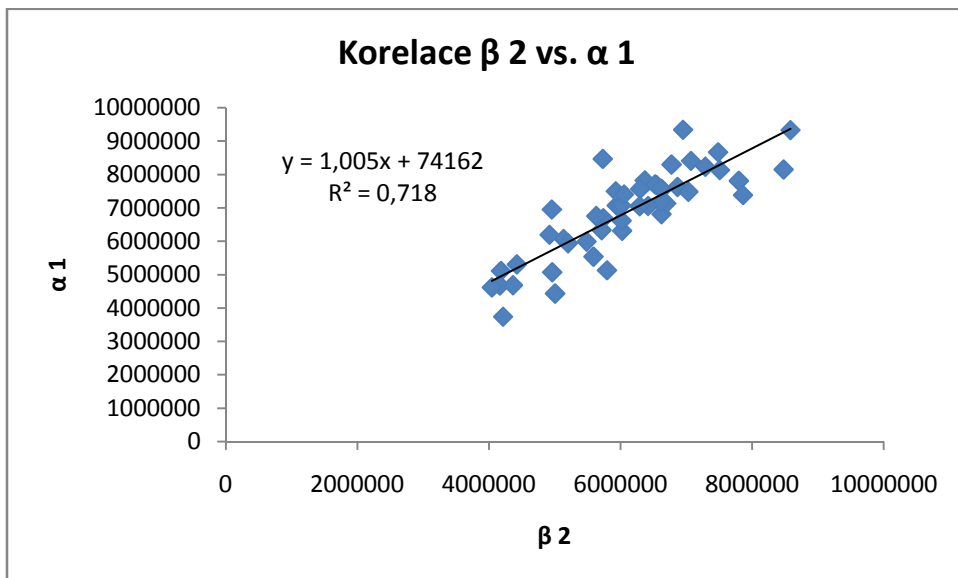
Obr. 37 Korelace ω -1,2 3 vs. α 2 s korelačním koeficientem 0,8221 ($p = 0,01$).



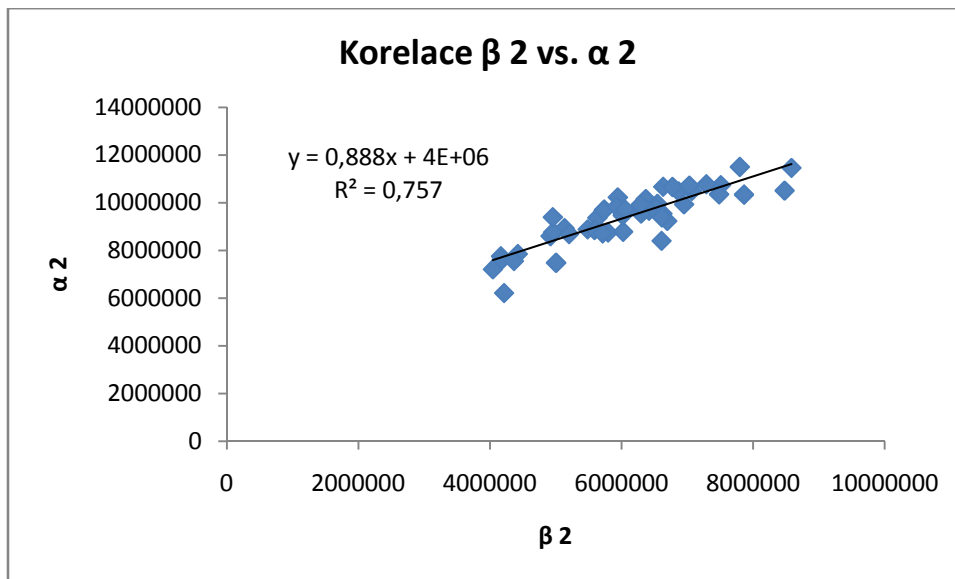
Obr. 38 Korelace β 2 vs. β 3 s korelačním koeficientem 0,9475 ($p = 0,01$).



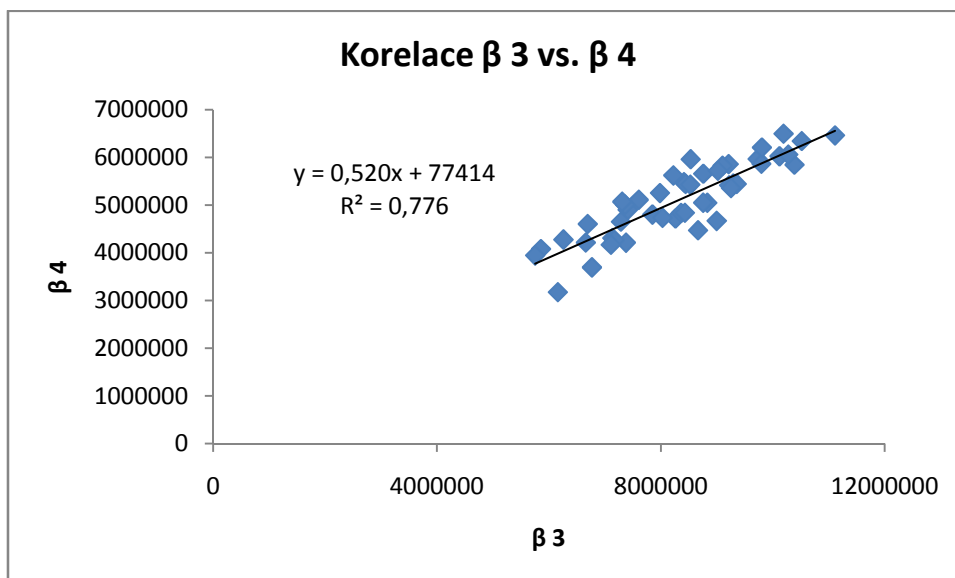
Obr. 39 Korelace $\beta 2$ vs. $\beta 4$ s korelačním koeficientem 0,8626 ($p = 0,01$).



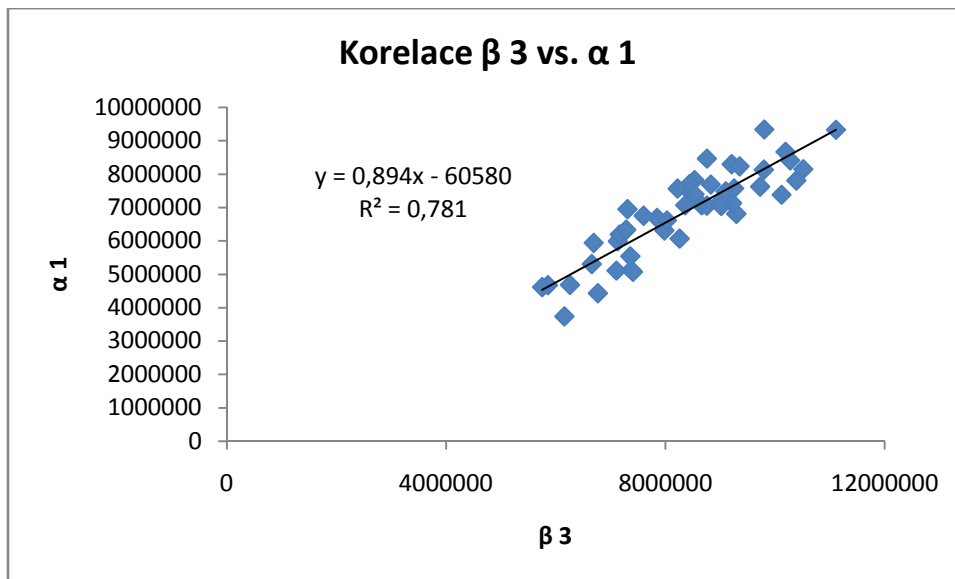
Obr. 40 Korelace $\beta 2$ vs. $\alpha 1$ s korelačním koeficientem 0,8478 ($p = 0,01$).



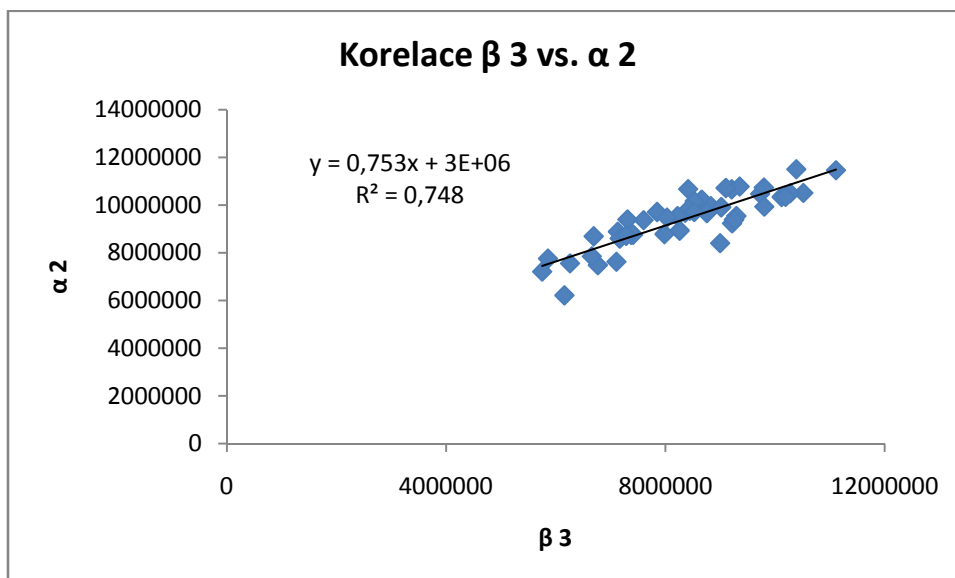
Obr. 41 Korelace $\beta 2$ vs. $\alpha 2$ s korelačným koeficientem 0,8705 ($p = 0,01$).



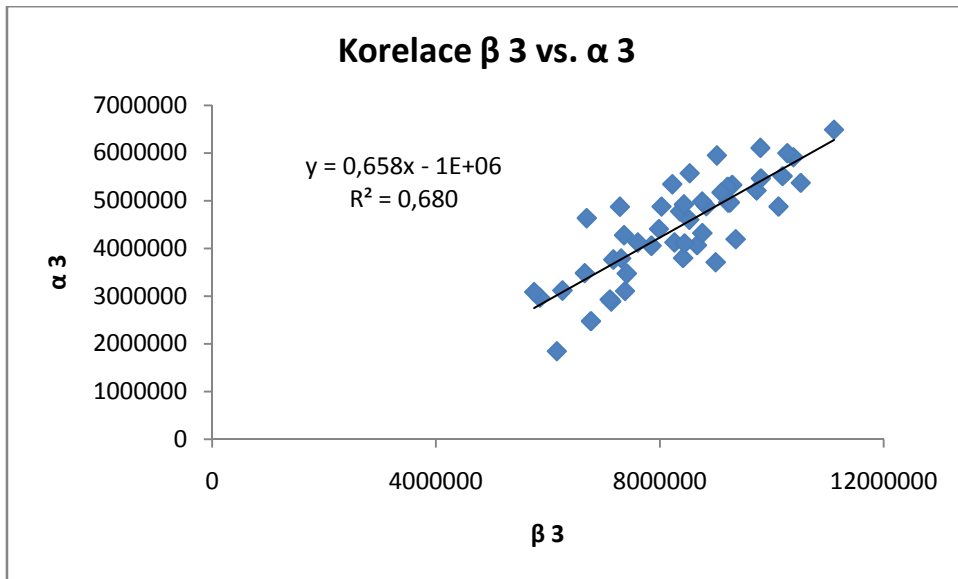
Obr. 42 Korelace $\beta 3$ vs. $\beta 4$ s korelačným koeficientem 0,8814 ($p = 0,01$).



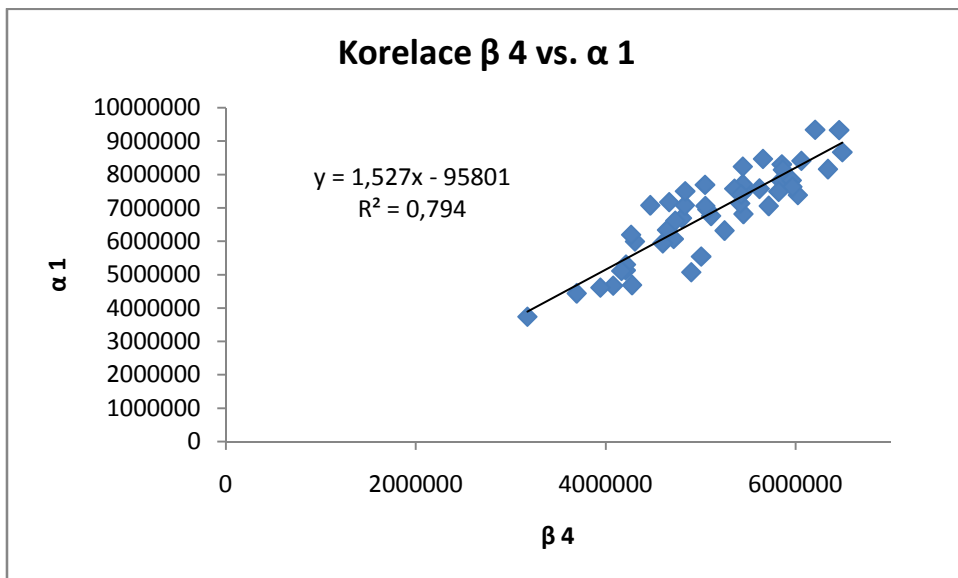
Obr. 43 Korelace $\beta 3$ vs. $\alpha 1$ s korelačním koeficientem 0,8839 ($p = 0,01$).



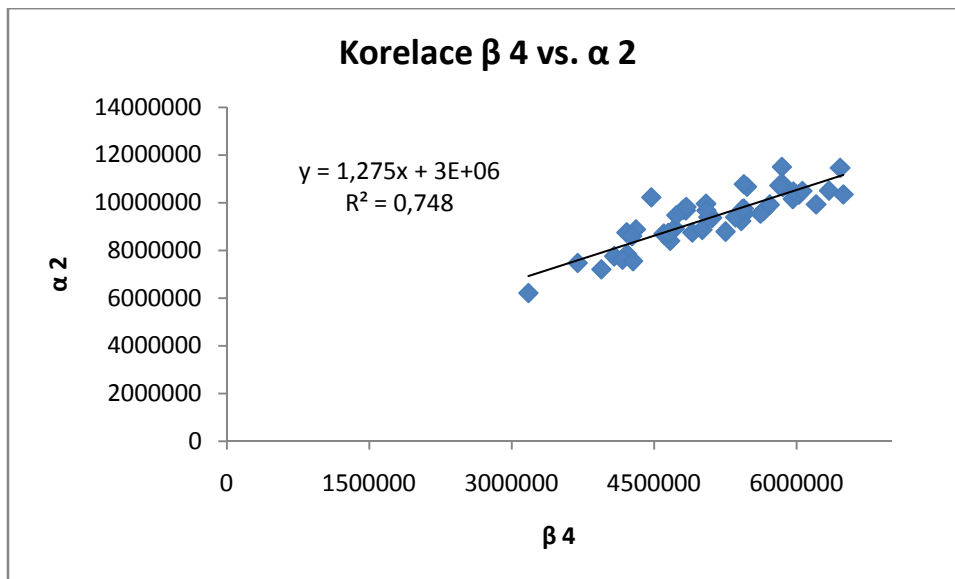
Obr. 44 Korelace $\beta 3$ vs. $\alpha 2$ s korelačním koeficientem 0,8652 ($p = 0,01$).



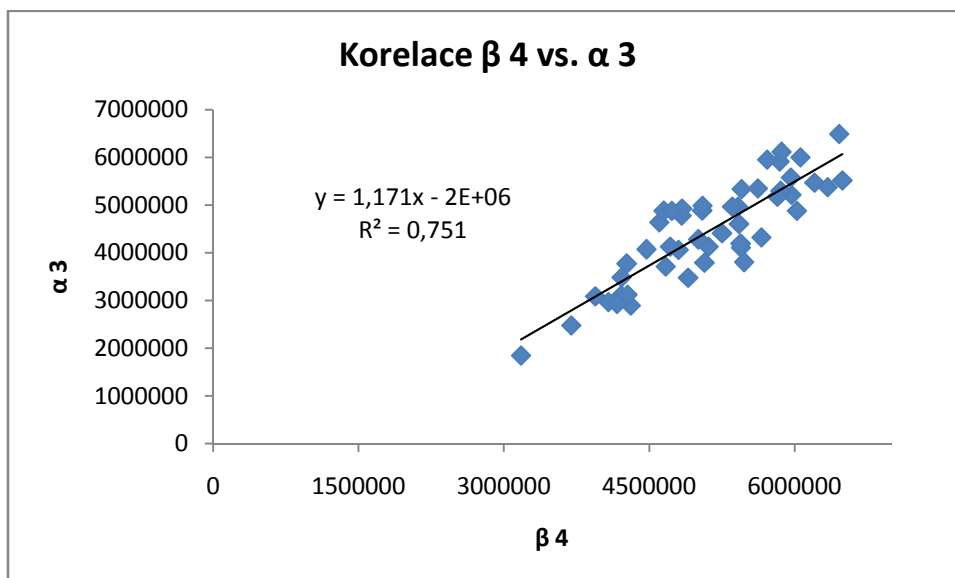
Obr. 45 Korelace $\beta 3$ vs. $\alpha 3$ s korelačným koeficientem 0,8250 ($p = 0,01$).



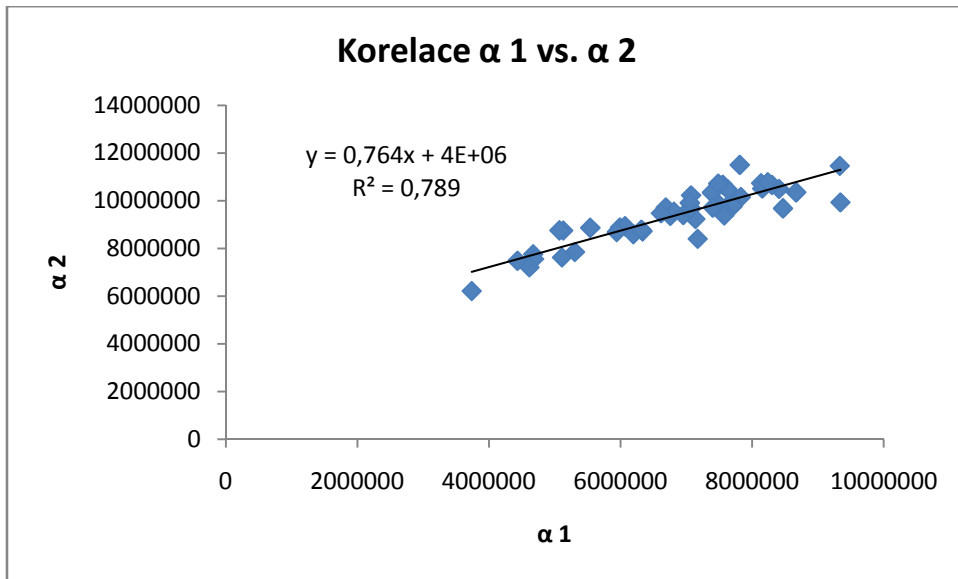
Obr. 46 Korelace $\beta 4$ vs. $\alpha 1$ s korelačným koeficientem 0,8915 ($p = 0,01$).



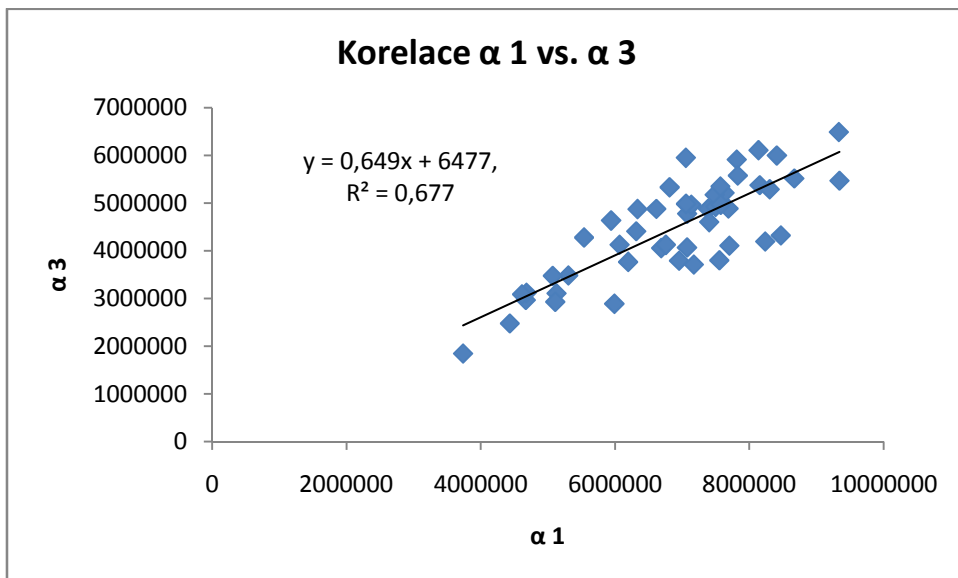
Obr. 47 Korelace $\beta 4$ vs. $\alpha 2$ s korelačním koeficientem 0,8651 ($p = 0,01$).



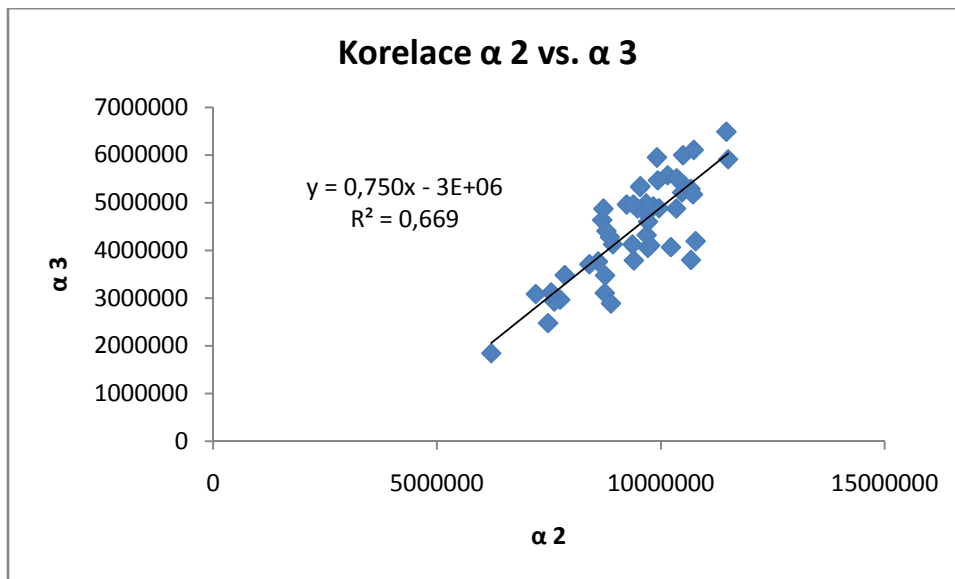
Obr. 48 Korelace $\beta 4$ vs. $\alpha 3$ s korelačním koeficientem 0,8666 ($p = 0,01$).



Obr. 49 Korelace α 1 vs. α 2 s korelačním koeficientem 0,8886 ($p = 0,01$).



Obr. 50 Korelace α 1 vs. α 3 s korelačním koeficientem 0,8229 ($p = 0,01$).



Obr. 51 Korelace α 2 vs. α 3 s korelačným koeficientem 0,8184 (p = 0,01).