

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Studium variability DNA pšenice
Bakalářská práce

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

Vypracoval:
Jana Pečinková

Brno 2015

Čestné prohlášení

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

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za obětavou pomoc, cenné rady a provázení během laboratorních pokusů při vypracování bakalářské práce. Děkuji Ing. Petru Martinkovi, CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. za poskytnutí pokusného materiálu a odborné rady. Dále chci poděkovat své konzultantce Márii Presinszké za praktické rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Studium variability DNA pšenice

Pšenice setá je jednou z nejvýznamnějších zemědělských plodin, své využití nachází nejen v krmivářství, ale především v potravinářství. V posledních letech se zaměřuje velký zájem na pšenice s netradičním zbarvením obilky, např. purpurové, žluté a modré. Toto zbarvení je způsobeno přírodními barvivy, která mají prokazatelně pozitivní vliv na živé organismy. Proto se usiluje o využití barevných pšenic také v lidské výživě. Tato práce je zaměřena na detekci alelického složení na lokusech *Glu-A3*, *Pina*, *Pinb* a nulových alel *Waxy* genů, pomocí molekulárních markerů, založených na PCR. Pekařská kvalita se odvíjí od složení zásobních bílkovin, gluteninů a gliadinů a jejich poměru. Dále je významný obsah škrobu v obilkách a poměr amylózy a amylopektinu. V neposlední řadě ovlivňuje mlynářskou, resp. krmnou kvalitu tvrdost obilek pšenice. Pomocí molekulárních analýz u 13 testovaných genotypů s bílým (1 genotyp), purpurovým perikarpem (8), žlutým endospermem (4) byla popsána alelická variabilita v lokusech *Glu-A3*, *Pina-D1*, *Pinb-D1* a byly detekovány nulové alely na lokusu *Wx-B1*. Získané výsledky jsou využitelné ve šlechtění pšenice s netradičním zbarvením obilky.

Klíčová slova: pšenice setá, molekulární markery, nízkomolekulární gluteniny, *Waxy* geny, tvrdost obilek.

ABSTRACT

The study DNA variability of wheat

Common wheat is one of the most important agricultural plants, their use is not only feeding, but especially in the food industry. In recent years, great interest is focused on the wheat caryopsis unusual coloration, e.g. purple yellow and blue. This coloring is caused by natural dyes, which have evidently positive impact on living organisms. Therefore, the aim is to use colored wheat also in human nutrition. This work is focused on the detection of allelic composition at loci *Glu-A3*, *Pina*, *Pinb* and null allele's *Waxy* genes, using molecular markers based on PCR. Bread-making quality depends on the composition of storage proteins, glutenins and gliadins and their rate. It is important to the starch content in caryopses and the ratio of amylose and amylopectin. Milling, resp. feeding quality is affected by the hardness of wheat caryopses. Using molecular analysis in 13 genotypes with white (1 genotype), purple pericarp (8), yellow endosperm (4) has been described allelic variation at the locus *Glu-A3*, *Pina-D1* and *Pinb-D1*, and null alleles at locus *Wx-B1* were detected. The obtained results can be used in wheat breeding with an unusual coloration of kernels.

Keywords: common wheat, molecular markers, low molecular weight glutenins, *Waxy* genes, hardness caryopses.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	10
3.1.1	Systematické zařazení a původ	10
3.1.2	Anatomická a morfologická stavba.....	11
3.1.3	Chemické složení obilky	14
3.1.4	Pekařská kvalita	15
3.2	Barevné pšenice	16
3.2.1	Červená a bílá pšenice.....	17
3.2.2	Žlutá pšenice	17
3.2.3	Purpurové pšenice	18
3.2.4	Anthokyany	19
3.3	Markery.....	20
3.3.1	Typy genetických markerů.....	21
3.3.2	Praktické využití.....	24
4	MATERIÁL A METODIKA	25
4.1	Použitý materiál	25
4.2	Metodika	26
4.2.1	Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA	26
4.2.2	Příprava reakčních směsí pro PCR.....	26
4.2.3	Příprava agarózového gelu	29
4.2.4	Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR	30
4.2.5	Vyhodnocení výsledků.....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
5.1	Nízkomolekulární gluteniny	31
5.2	Markery tvrdosti obilky	33
5.3	Detekce nulových alel <i>Waxy</i> genů	35
6	ZÁVĚR.....	38
7	LITERATURA	39
8	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	44

1 ÚVOD

Jednou z nejvýznamnějších plodin je pšenice setá (*Triticum aestivum* L.). Své využití nachází v potravinářství, především ve výrobě pečiva, těstovin, sušenek atd., ale také jako krmiva pro hospodářsky významná zvířata a v neposlední řadě ve zpracovatelském průmyslu při výrobě lihu a škrobu. Pšenice si ceníme pro její hlavní produkt, obilky, které jsou zdrojem řady důležitých látek jako bílkoviny, minerální látky a vitamíny. V případě pšenice s barevnými obilkami hovoříme také o obsahu přírodních barviv, jako jsou karotenoidy a anthokyany. Anthokyany jsou žádané pro své antioxidační účinky v živých organismech, kde se vážou na volné radikály a zamezují tak jejich škodlivým vlivům. Většina dnes pěstovaných pšenic je hexaploidní, jejich genom se skládá ze tří různých genomů AA, BB a DD. Tato podoba pšenice vznikala postupným křížením planých druhů.

U pšenice seté se klade důraz na pekařskou kvalitu, která je udávána několika důležitými kritérii. Zastoupení nízkomolekulárních gluteninů na lokusu A (*Glu-A3*) ovlivňuje kvalitu lepku. Proteiny ovlivňující tvrdost obilky (*Pin*) a nulové alely *Waxy* genů, hrají důležitou roli ve složení a obsahu škrobu v obilkách. Všechny tyto složky vykazují určitou variabilitu. Variabilita neboli polymorfismus v sekvencích DNA je studován pomocí DNA markerů, založených na polymerázové řetězové reakci (PCR). Díky nim je možné popsat nebo odlišit jednotlivé odrůdy, ale také charakterizovat alelické složení v lokusech sledovaných genů. Analýzy polymorfismu nám mohou pomoci při výběru odrůd pro pekařské účely, pro zvýšení účinnosti šlechtění atd.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na problematiku studia polymorfizmu DNA u pšenice se zaměřením na markery asistovanou selekci.
- Izolace genomické DNA vybraných genotypů pšenice s purpurovým perikarpem.
- Praktická aplikace metod studia polymorfizmu DNA založených na principu PCR.
- Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

3.1.1 Systematické zařazení a původ

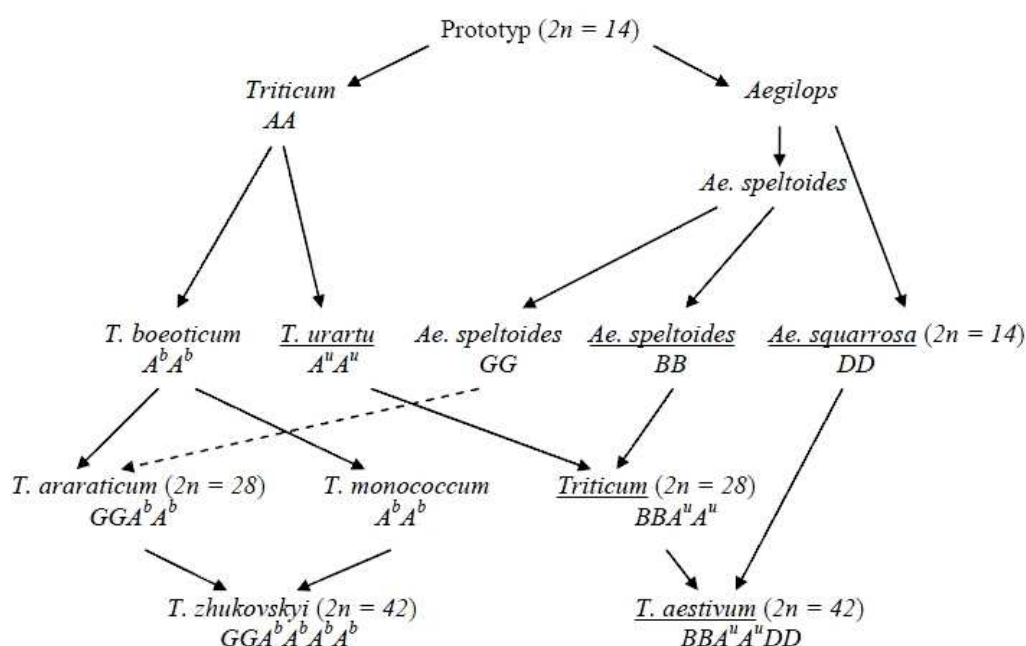
Rod pšenice řadíme do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Rozlišujeme 3 podskupiny lišící se v počtu sad chromozomů. Skupina diploidní pšenice ($2n = 2x = 14$) zahrnuje planou formu pšenice jednozrnky (*T. boeoticum* L.) a kulturní formu pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.), která má na rozdíl od plané méně rozpadavý klas. Pšenice jednozrnky mají obvykle květenství tvořené úzkým, plochým složeným klasem (lichoklas) s dvěma kvítky. Diploidní pšenice nemají v současné době velký pěstitelský význam.

Mezi tetraploidní pšenice ($2n = 4x = 28$) můžeme zařadit především pšenici tvrdou (*T. durum* Desf.) s nelámapým květenstvím, dlouhými osinami a sklovitou, neochmýřenou obilkou, která je vhodná pro výrobu těstovin. Tato pšenice je pěstována v jižních státech Evropy jako jarní forma.

Nejvíce pěstovanou skupinou v Evropě i ve světě je skupina hexaploidní pšenice ($2n = 6x = 42$), a to pšenice setá (*T. aestivum* L.) a pšenice špalda (*T. spelta* L.). Nejvýznamnější pšenice setá má nelámapý, různě hustý lichoklas, osinatý nebo bez osin. Tato pšenice má 4 variety – *erythrospermum*, *ferrugineum*, *milturum* a *lutescens*, které pravděpodobně vznikly ze špaldy. Pšenice špalda se začala rozšiřovat až v posledních letech jako ozimá i jarní forma. Je využívána k výrobě těstovin, její klas je řidší, lámapější a obilky jsou pevně uzavřené v pluchách (ZIMOLKA et al., 2005).

Archeologické údaje poskytly důkazy, že pšenice společně s ječmenem byly prvními domestikovanými druhy rostlin, pěstovanými už v pozdní době kamenné (GONCHAROV et al., 2008). Původ polyploidních druhů pšenice má dlouhou historii, díky používání různých botanických klasifikací a názvů pro jeden druh vznikají různé nesrovnalosti (GONCHAROV, 2011). Byly provedeny molekulární analýzy, na jejichž základě se zjistila shoda u dřívějších evolučních druhů. Na základě sekvencí jaderných DNA a chloroplastových DNA byl stanoven fylogenetický strom, zahrnující rody *Triticum* a *Aegilops* (Obrázek 1). Bylo prokázáno, že rod *Triticum* (*T. urartu*, *T. boeoticum*, *T. monococcum* L.) byl dárce A genomu, *Aegilops speltoides* L. byl dárce B genomu

pro všechny polyploidní druhy pšenice, zatímco chloroplastové genomy diploidních druhů *Triticum* se podobají spíše ostatním druhům *Aegilops*. Jaderné *Acc-1* a *PGK-1* geny byly použity jako molekulární markery pro genomy A a B rodu *Triticum*. U těchto genů ale nebyla zjištěna žádná variabilita v rámci polyploidní pšenice. V diploidním A genomu rodu *Triticum* ale byly detekovány tři varianty těchto genů. Až podrobná analýza ukázala, že jedna z těchto variant byla předkem pro všechny A genomy všech polyploidních druhů *Triticum*. Druhá varianta je velmi blízká genomu B z *Aegilops speltoides* L. a třetí je unikátní pro plané diploidní pšenice. Plané hexaploidní pšenice nebyly objeveny, je proto zřejmé, že vznikly křížením tetraploidních pšenic *T. dicoccum* nebo *T. durum* a mnohoštetu Tauschova, *Ae. tauschii* (KIHARA, 1944). Donorem genomu D byl *Aegilops squarrosa* L. (nebo také *Aegilops tauschii* Coss). Jako první hexaploidní druh byl popsán *Triticum antiquorum*, nalezený v archeologických vykopávkách ve Švýcarsku (GONCHAROV et al., 2008).



Obrázek 1 Schéma evoluce pšenice (GONCHAROV, 2002)

3.1.2 Anatomická a morfologická stavba

Zárodek rostliny je uložen na hřbetní straně obilky, je krytý oplodím a osemením. V apikální části nalezneme vegetační vrchol s listy a na protilehlé straně se nachází hypokotyl se základy 3-5 kořínků. Základem primárního kořínku je radikula, krytá čepič-

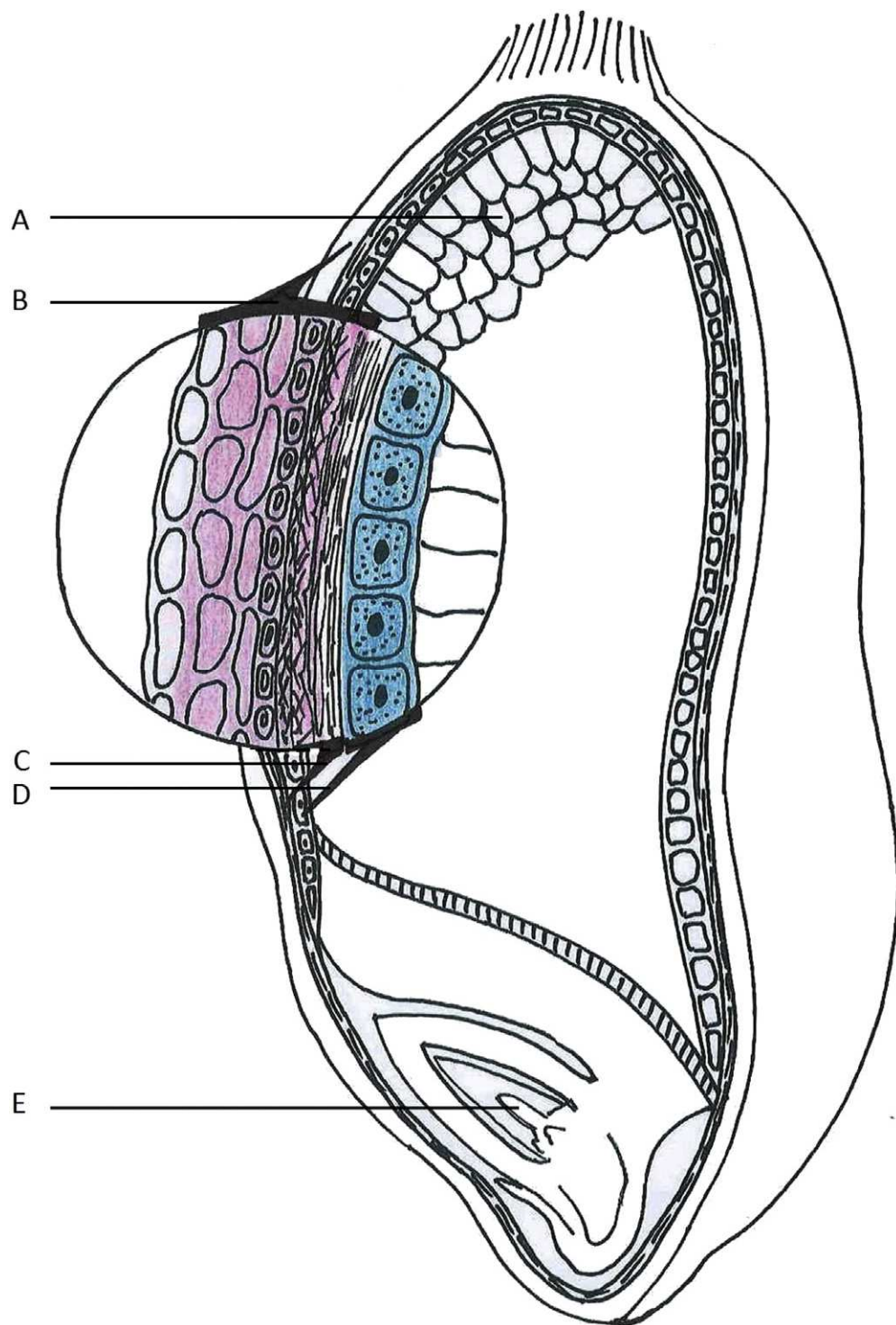
kou (koleorhizou), která při klíčení proniká oplodím. Zároveň vznikají adventivní kořeny, také uložené v embryu.

Stonek tvoří stéblo, které je duté, obvykle z 5 internodií, mezi kterými jsou kolénka. Stéblo se od báze zužuje směrem ke klasu. Z kolének vyrůstají listy, jejichž pochva objímá stéblo a částečně jej zpevňuje.

Listy pšenice jsou přisedlé, tvořené čepelí a pochvou, na jejichž přechodu se nachází krátký, vroubkovaný jazýček. Po stranách listové pochvy nalezneme pár malých oušek, obvykle pokrytých trichomy. U prvních listů tvoří ouška pouze rudimenty, nejsou plně vyvinutá a u posledních listů jsou naopak zaschlá.

Rostliny pšenice tvoří květenství ze složeného klasu, jehož základem je větveno, které má podobně jako stéblo jednotlivé články a kolénka. Na větveno přisedají jednotlivé klásky s dvěma až pěti kvítky a dvěma plevami. Kvítky jsou chráněny z vnější strany pluchami, ze kterých může vyrůst osina a z vnitřní strany pluškami. Otvírání kvítku pro opylení je zajištěno dvěma plenkami (lodikuly), umístěnými na spodní straně semeníku. Nezbytnou součástí květu jsou tyčinky a pestíky. Tyčinky, tvořené nitkami a prašníky, vyrůstají ze semeníku (ZIMOLKA et al., 2005).

Plodem je obilka, skládající se ze tří základních částí – obaly, endosperm a embryo (Obrázek 2). Obaly jsou tvořené oplodím a osemením, pod kterým je vrstva aleuronových buněk, přiléhající k endospermu. Oplodí je nejvrchnější část obilky, tvořená nerozpustnou vrstvou celulosových buněk, která chrání zrna před mechanickým poškozením. Pod oplodím nalezneme osemení, kde jsou jednak uložena některá barviva, zodpovědná za vzhled obilky, ale také polysacharidy, schopné vázat vodu. Obalové vrstvy jsou obvykle součástí otrub. Aleuronová vrstva obsahuje vysoký podíl bílkovin (30%) a minerálních látek. Někdy je označována jako vnější endosperm a podle typu mletí se dostává také do otrub nebo se může stát součástí mouky. Endospermové buňky mají nepravidelné trojúhelníkové tvary a jejich největší část tvoří škrobová zrna o různé velikosti a tvaru. Embryo obsahuje velké množství enzymů (např. α -amyláza), které nejsou příliš žádoucí v mouce vzhledem ke svým schopnostem štěpit škrob, a tím snižovat kvalitu výrobku. Proto bývá embryo před mletím mechanicky odstraňováno, případně se přidávají inhibitory enzymů (PŘÍHODA et al., 2004).



Obrázek 2 Obilka pšenice na podélném řezu. A – endosperm, B – oplodí, C – testa, D – aleuronová vrstva, E – klíček. Upraveno dle TROJAN et al. (2014).

3.1.3 Chemické složení obilky

Z hlediska obsažených živin rozdělujeme složení obilky na několik kategorií. Nej důležitějšími látkami jsou sacharidy, lipidy, bílkoviny, vitamíny a minerální látky.

Sacharidy

Polysacharidy tvoří největší podíl obilky (50 – 70 %), především ve formě škrobu, který je tvořen složkou amylopektinů a amylosy, dále hemicelulósou, pentosany, celulóso, glykolipidy a glykoproteiny (PRUGAR et al, 2008). Jedná se o organické sloučeniny ze skupiny polyhydroxyderivátů karboxylových kyselin (CORNELL et al., 1994).

Bílkoviny

Bílkoviny jsou vysokomolekulární sloučeniny, jejichž základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Jejich množství v sušině kolísá od 8 do 20 %, ale obvykle se pohybuje mezi 12 – 13 %. Velký význam mají bílkoviny z hlediska technologické kvality mouky a v oblasti nutriční a krmné hodnoty. Největší část bílkovin je uložena v endospermu a aleuronové vrstvě. Jejich vlastnosti jsou závislé na strukturním uspořádání. Podle rozpustnosti můžeme pšeničné bílkoviny rozdělit na 4 skupiny: albuminy (rozpustné ve vodě), globuliny (rozpustné v solných roztocích), gliadiny (prolaminy), které jsou rozpustné v 70 % ethanolu, a gluteniny, částečně rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad. Gluteniny a prolaminy zároveň tvoří zásobní bílkoviny a bývají často označovány jako lepkové bílkoviny (CORNELL et al., 1994, PRUGAR et al., 2008). Z této skupiny bílkovin jsou ale nejdůležitější z hlediska pekařské kvality polymerní gluteniny a monomerní gliadiny, o kterých pojednává kapitola 3.1.4.

Lipidy

Z chemického hlediska jsou lipidy estery vyšších karboxylových kyselin. Z těchto jsou nejčastěji zastoupeny kyselina linolová, olejová a fosfatidy, které mají podstatný význam při skladování obilí a mouky – štěpením fosfatidů dochází k uvolňování kyseliny fosforečné a mastných kyselin, a tím se zvyšuje kyselost. Dalšími oxidačními procesy pak dochází ke žluknutí a zhoršení sensorické kvality.

Obsah lipidů v obilce je poměrně malý (1,5 – 3 %), ale i přesto má důležitou roli. Nejvíce lipidů se ukládá v klíčkové oblasti obilky (CORNELL et al., 1994).

Vitamíny

Díky své funkci biokatalyzátorů jsou nepostradatelné pro řadu živých organismů. Vitamíny jsou nízkomolekulární sloučeniny, v obilce ukládané v klíčku a vrstvě aleurových buněk. Tyto části se ale zpracováním dostávají do otrub a krmné mouky a jen malá část vitaminů je obsažena i v bílé mouce, kterou konzumujeme (ZIMOLKA et al., 2005).

Minerální látky

Minerální látky jsou v obilce zastoupeny 1,4 – 3 %. Mezi nejdůležitější řadíme fosfor, draslík, síru, vápník, hořčík, sodík, mangan, zinek, měď a bór. Podobně jako u vitaminů se minerální látky nacházejí v obalových vrstvách obilky a klíčku, a proto jsou tyto látky mletím ztráceny a v bílé mouce je jejich obsah velmi malý (ZIMOLKA et al., 2005).

Barviva

Důležitou složkou jsou také rostlinná barviva, vyskytující se téměř ve všech orgánech nejen u pšenice, ale u všech vyšších rostlin. Řadíme sem např. xanthofyly, karoteny, ale především anthokyany, o kterých pojednává kapitola 3.2.4.

3.1.4 Pekařská kvalita

Jakost pšenice se hodnotí hned z několika hledisek na základě určitých standardů a požadavků spotřebitelů. Patří sem technologická jakost, hygienická jakost, nutriční jakost, senzorická jakost a užitná jakost. Pekařská kvalita se testuje jako součást technologické jakosti (ZIMOLKA et al., 2005). Její součástí je obsah bílkovin, množství a vlastnosti lepku, sedimentační hodnota, číslo poklesu a fyzikální vlastnosti těsta. Na základě těchto vlastností pak můžeme rozdělit pšenici do následujících jakostních skupin (NOVOTNÝ a HUBÍK, 2006):

E – elitní – vynikající jakost,

A – kvalitní jakost – dobrá pekařská jakost,

B – chlebová jakost – vhodná do směsí,

C – krmná jakost – nevhodná pro pekařské účely.

Pšenice a její druhy jsou už po mnoho staletí významné jako základ pro výrobu pečiva a na základě toho je posuzována její kvalita. Největší podíl pšeničné mouky tvoří škrob (70 – 75 %), voda (14 %), bílkoviny (10 – 13 %), tuky (2 %), enzymy (1 – 3 %) a další minoritní složky. Nejvýznamnější složkou jsou bílkoviny, zodpovědné za schopnost udržení plynů pro objem pečiva (SUKOVÁ, 2012). Kvalita bílkovin se hodnotí pomocí Zelenyho testu a podjednotky gluteninů se zjišťují SDS (dodecylsulfát sodný) elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Co se týče nejvýznamnějších bílkovin, jedná se o bílkoviny ze skupiny gluteninů a gliadinů, které tvoří lepek. Důležitý je také jejich poměr. Kvalitu lepku se hodnotí pomocí tzv. gluten indexu, který udává pevnost lepku. Velmi pevný lepek je těžko zpracovatelný, naproti tomu nízké hodnoty gluten indexu ukazují na slabý lepek, taktéž nevhodný. Kromě lepku jsou důležité i jiné faktory jako je škrob, jehož obsah uložený v bílkovinné matici udává tvrdost zrna, které je přímo úměrné kvalitě. Na viskozitu těsta mají zase zásadní vliv polysacharidy pentosany. Významně mohou kvalitu také ovlivňovat enzymy, např. α -amyláza, štěpící škrob na jednodušší sacharidy při klíčení zrna, čímž se snižuje kvalita pečiva (BOTH a CHLOUPEK, 2005).

Potravinářská jakost pšenice je závislá na mnoha faktorech. Nejdůležitější z nich jsou obvykle odrůdy pšenice, rok sklizně, lokalita, posklizňové zacházení, délka a podmínky skladování. Tyto faktory se každoročně mění, a proto je nezbytná neustálá kontrola kvality (ŠVEC a HRUŠKOVÁ, 2009).

3.2 Barevné pšenice

První studie o dědičnosti zbarvení orgánů pšenice byly prováděny klasickými experimenty, založenými na segregaci a aneuploidii. Později byly prováděny podrobnější molekulární analýzy a prozkoumány geny zodpovědné za pigmentaci různých orgánů (ZEVEN, 1991). Různé alely v lokusech určují charakteristické zbarvení, poskytující rozlišitelné fenotypy. Proto jsou barevné znaky široce používány v taxonomické klasifikaci (stanovení poddruhů pšenice) a certifikaci odrůd (ouško, koleoptile). Zbarvení některých orgánů pšenice je způsobeno rostlinnými barvivy, anthokyany (kapitola 3.2.4) a má adaptivní význam, jako např. vyšší odolnost červené pšenice proti biotickým vlivům. Díky zbarvení jsou pšenice zároveň vhodné pro genetické a molekulárně genetické studie (KHLESTKINA, 2013). Odrůdy pšenice s vysokým obsahem anthokyanů mají

velký potenciál pro využití v potravinářství jako prevence proti onemocnění (ŽOFAJOVÁ et al., 2012).

V současné době je známo několik různých typů barevných pšenic, kromě typické bílé a červené také žlutá, purpurová a modrá. Modré pigmenty nacházíme v triploidní aleuronové vrstvě obilky. Tyto modré odrůdy byly objeveny v první polovině 20. století, na základě mezidruhového křížení mezi pšenicí a jejími příbuznými druhy. Vzhledem k tomu, že oplodí se skládá z mateřského pletiva, jeho barva bude udávána mateřskou rostlinou. Toto křížení bylo prováděno primárně za účelem zlepšení vlastností pšenice (např. rezistence vůči chorobám a škůdcům, vyšší odolnost vůči klimatickým podmínkám, vyšší výnos atd.). Jedním z předků modré pšenice je pravděpodobně pšenice jednozrnka (*Triticum boeoticum* nebo *Triticum monococcum*), *Thinopyrum* a jiné příbuzné druhy (ZEVEN, 1991). Modrá barva je určována kodominantními geny *Ba* (MARTINEK et al., 2011).

3.2.1 Červená a bílá pšenice

U pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) je běžné bílé a červené zbarvení zrna (ZEVEN, 1991). Bílé zbarvení udává sestava recesivních alel, zatímco červené zbarvení je podmíněno 1 – 3 dominantními alelami *RA1a* na chromozomu 3AL, dále *RB1b* a *RD1b*. První studie o genetických základech červené barvy obilky pšenice se objevily na počátku 20. století. R. Biffen pozoroval monogenní dominantní typ v dědičnosti zbarvení zrna (BIFFEN, 1905). V roce 1914 poprvé H. Nilsson-Ehle poukázal na přítomnost tří nezávislých dominantních genů, které určují červené zbarvení zrna. Zároveň prokázal, že perioda dormance narůstá v závislosti na dávce genu, který tuto vlastnost řídí (NILSSON-EHLE, 1914). Do poloviny 20. století byly prováděny klasické genetické analýzy. Vývoj molekulárních metod umožnil detekci těchto genů přímo na chromozomech (KHLESTKINA, 2013).

3.2.2 Žlutá pšenice

Žlutě zbarvené pšenice se vyznačují žlutým endospermem, obsahujícím karotenoidy a zeaxantin. Tyto látky jsou ceněné pro své antioxidační účinky a jako prevence pro degenerativní onemocnění oční sítnice. Endosperm se při mletí dostává přímo

do mouky, a tím jí dává výsledné zbarvení (MARTINEK et al., 2011). Velmi žádané je žluté zbarvení endospermu při výrobě těstovin z tvrdé pšenice. Ukázalo se ale, že vysoký obsah karotenů a xantofylů v semolině nedává vzniklým těstovinám sytější zbarvení. Je to díky enzymům obsaženým v tvrdé pšenici, které tato barviva rozkládají, a proto se do konečného produktu nedostanou (PODHORNÁ, 2010). Žluté zbarvení je udáváno geny *Psy1* a *Psy2* lokalizovanými na 7. skupině chromozomů 7A a 7B (MARTINEK et al., 2011).

3.2.3 Purpurové pšenice

Pigmentace anthokyany se u pšenice seté může objevit téměř ve všech částech rostliny, např. koleoptile, ouška, listy, plevy, pluchy, osiny, prašníky atd. Nejvýznamnější z hlediska potravinářství je ale jejich obsah v obilkách (KHLESTKINA, 2013).

Purpurový pigment se nachází v oplodí obilky (perikarp). Existence pšenice s purpurovým perikarpem přitahovala pozornost vědeckého světa už v 19. století. Do Evropy byla pšenice s purpurovým zrnem hojně distribuována počátkem 20. století. Purpurově zbarvené pšeničné obilky byly poprvé zaznamenány Ludwigem Wittmarckem v roce 1879. Vzorky této pšenice shromáždil Johann Maria Hildebrandt během své cesty do východní Afriky v letech 1872-73 a následně byly uchovány v zemědělském muzeu v Berlíně. Do Německa byly z Etiopie poslány dva vzorky tetraploidní pšenice panem W. Schimperem. První z nich, tzv. Arraseita, měl lysé plevy, purpurové zrno a rostliny byly osinaté. Tyto vzorky byly označeny jako *T. durum* var. *arraseita*. Druhý vzorek byl identický s var. *arraseita*, ovšem plevy těchto rostlin byly zbarvené černě. Tento typ byl označen jako *T. durum* var. *schimperi*. Tato původně tetraploidní pšenice byla později převedena na hexaploidní pšenici setou (ZEVEN, 1991).

Práce na genetické podstatě purpurové pšenice byly zpomalovány tím, že tento znak je exprimován v mateřském pletivu. Exprese také může být výrazně ovlivněna prostředím, a tím pak dochází k různým segregačním poměrům. V roce 1965 našel Cropp jeden dominantní gen pro purpurové zbarvení zrna, o dva roky později McIntosh a Baker objevili další dva dominantní geny s možnými doplňujícími účinky (ZEVEN, 1991).

Na hexaploidní úrovni byly nalezeny dva nezávislé geny pravděpodobně lokalizované na chromozomech 3A a 7B. Je zajímavé, že gen *R2* (pro červenou barvu) se také nachází na chromozomu 3A, zatímco geny pro purpurové stéblo (*Pc*) a koleoptile (*Rc2*)

jsou umístěny na 7B chromozomu (ZEVEN, 1991). Purpurová barva perikarpu je determinována geny *Pp*, které se nachází na sedmé homeologické skupině chromozomů. Využití purpurové pšenice v potravinářství je doporučováno pro výrobu celozrnného pečiva, vzhledem k faktu, že perikarp je spíše povrchová vrstva a často se při mletí dostává především do otrub (MARTINEK a VYHNÁNEK, 2014).

Zbarvení perikarpu a aleuronu bylo využito jako marker například pro pšenice se speciální výživovou hodnotou (JAAFFAR et al., 2013). Kultivary pšenice s vysokým obsahem anthokyanů mají velký potenciál pro využití v potravinářství jako prevence proti onemocnění (ŽOFAJOVÁ et al., 2012).

3.2.4 Anthokyany

Anthokyany jsou obecně popisovány jako bioaktivní látky, zodpovědné za antioxidační a fotoprotektivní funkce. Bylo prokázáno, že mají určité blahodárné účinky při oxidačním poškození (KONG et al., 2003). Některé studie poukazují na fakt, že onemocnění jako diabetes, rakovina, Alzheimerova choroba, koronární srdeční onemocnění a stárnutí jsou spojeny s oxidativním stresem. Anthokyany si získaly pozornost díky svým protizánětlivým, antimutagenním a protirakovinným vlastnostem (ŽOFAJOVÁ et al., 2012). Vzhledem ke svým pozitivním účinkům na živé organismy jsou již dlouhá léta využívány jako velmi žádaná náhražka syntetických barviv (MARKAKIS ed., 1982).

Anthokyany jsou jednou z nejvýznamnějších skupin rostlinných pigmentů. Vyskytují se téměř u všech vyšších rostlin a nalezneme je ve všech částech rostliny, nejvíce však v květech a plodech (MARKAKIS ed., 1982).

Modré, fialové, červené nebo oranžové zbarvení rostlinných pletiv a orgánů u pšenice ale i obecně u většiny vyšších rostlin je způsobeno právě anthokyany. Jsou to fenolické sloučeniny zvané flavonoidy, představují skupinu ve vodě rozpustných přírodních barviv (ŽOFAJOVÁ et al., 2012). Jsou to sekundární metabolity, široce distribuované v rostlinách. Mnohé flavonoidy mají u rostlin i různé biologické funkce včetně ochrany proti UV záření a fytopatogeny, transport auxinů, signalizace během nodulace, ale také zbarvení květů jako vizuální signál přitahující opylovače nebo zbarvení jiných rostlinných orgánů. Mimo to jsou zodpovědné za zbarvení listů na podzim (FERREYRA et al., 2012).

V současné době je zajímavou otázkou osud anthokyanů v lidském těle po jejich konzumaci, protože jejich obsah je těžko detekovatelný (WANG, STONER, 2008). Běžné konzumní anthokyany jsou obsaženy v ovoci a zelenině. Jejich obsah je různý, avšak největší množství jich obsahují borůvky, hrozny, bezinky a ze zeleniny například lilek (CLIFFORD, 2000). Kromě ovoce a zeleniny jsou anthokyany obsaženy také v obilovinách, např. fialová kukuřice, černá a červená rýže, modrá a purpurová pšenice (ABDEL-AAL et al., 2006). Nejčastější anthokyany obsažené v pšenici jsou kyanidin (červená barva), delphinidin a peonidin (modrá barva), pelargonidin (oranžová a červená barva), petunidin a malvidin (fialová barva). Množství anthokyanů obvykle narůstá při zrání, poté se ale snižuje (ŽOFAJOVÁ et al., 2012). Kyanidin-3-glukosid se mimo jiné vyskytuje i u modré a purpurové pšenice (ESCRIBANO-BAILON et al., 2004).

3.3 Markery

Markery se obecně používají k identifikaci žádoucích genů. Prvními používanými markery byly tzv. morfologické (také viditelné polymorfizmy). Bohužel ale odhalovaly jen malou variabilitu, protože měly jen několik fenotypových variant a jejich exprese může být ovlivněna vnějším prostředím (URBAN, KŘÍŽANOVÁ, 2008). Mimo jiné existují také biochemické markery.

Molekulární markery nám poskytují informace o alelických variacích v daném lokusu. V průběhu let pokroky v molekulární biologii vedly k zavedení mnoha nových typů molekulárních markerů. Prvními molekulárními markery byly allozymy. Jsou to proteiny, obvykle enzymy. Polymorfismus byl detekován pomocí nativní gelové elektroforézy, která rozděluje molekuly podle velikosti a náboje, dané aminokyselino-vým složením. Nevýhodou těchto markerů je, že odhalují jen poměrně malou variabilitu oproti DNA markerům, nejsou přímé a málo citlivé (SCHLÖTTERER, 2004).

Pro detekci polymorfismu v sekvenci DNA se nejčastěji používají DNA markery, které mají oproti bílkovinným markerům několik výhod. Analýzy bílkovin jsou závislé na expresi kódujících sekvencí, zatímco DNA analýzou můžeme odhalit polymorfismus v exonech i intronech. Další velkou výhodou může být fakt, že DNA markery neovlivňuje stupeň vývoje rostliny ani podmínky pěstování. Díky tomu je možné detekovat genotyp rostliny i ve velmi raných fázích vývoje, což bílkovinné markery také neumožňují (GÁLOVÁ et al., 2011).

3.3.1 Typy genetických markerů

V posledních letech byly molekulární markery dostupné jak v živočišných, tak v rostlinných systémech pro základní i aplikované studie. Jedním z hlavních použití molekulárních markerů je sestavování podrobných fyzických a genetických chromozomálních map různých organismů. Dalším významným využitím molekulárních markerů u rostlinných systémů je také zlepšování účinnosti konvenčního šlechtění rostlin pomocí nepřímého výběru skrz molekulární marker – lokus pro kvantitativní znak (QTL). Hlavní aplikace markerů jsou genetické diagnostiky a charakterizace transformovaných organismů, fylogenetické analýzy apod. Každý marker je spojen s určitými výhodami a nevýhodami, které závisí na daném využití. Markery můžeme obecně rozdělit do následujících tří skupin (GUPTA et al., 1999):

- DNA markery založené na hybridizaci se sondou - polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), DNA fingerprinting,
- DNA markery založené na PCR – náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), délkový polymorfismus restrikčně štěpené amplifikované DNA (CAPS), tandemová opakování krátkých sekvencí (SSR), místa se sekvenční adresou (STS), apod.,
- DNA markery založené na DNA čipech a sekvencování - jednonukleotidové polymorfizmy (SNP).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP byly jako první použity v mapování lidského genomu a později i mapování rostlinných genomů. RFLP je nejspolehlivější metodou, která může být použita k přesnému vyhodnocování genotypů (MOHAN et al., 1997). Restrikční endonukleázy jsou schopny rozpoznat krátké sekvence a štěpit DNA na přesném místě. Po naštěpení dostáváme různě dlouhé fragmenty, které jsou separovány pomocí agarózové elektroforézy a dále přeneseny Southernovým přenosem na membránu nebo hybridizovány se značenou sondou pro výslednou detekci (GÁLOVÁ et al., 2011).

Výhodou je, že RFLP využívá kodominantní dědičnost a může určit jedinečný lokus. Jestliže použijeme cDNA kódující známý gen jako marker, můžeme identifikovat pozici specifického genu na chromozomu. Analýza RFLP je náročná na pracovní sílu

i časově. Oproti tomu jsou metody založené na PCR relativně jednodušší (MOHAN et al., 1997).

DNA fingerprinting

Polymorfismus DNA fingerprintingu vzniká díky různé délce naštěpených fragmentů. Technika je podobně jako RFLP založená na DNA hybridizaci. DNA se naštěpí restrikčními enzymy a vzniklé fragmenty jsou hybridizovány se syntetickými sondami. Sondy jsou tvořené oligonukleotidy, komplementární k SSR (jednoduché opakující se sekvence). Vyhodnocení také probíhá pomocí gelové elektroforézy.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA, poprvé byla popsána v roce 1990. Jedná se o krátké primery (obvykle kolem 10 bp), které se náhodně navážou na komplementární místa v genomu studovaného organismu. Díky RAPD primeru je možné amplifikovat fragmenty určitého lokusu, který je většinou dominantní. Nevýhodou ovšem je to, že pomocí RAPD není možné rozlišit dominantního homozygota od heterozygota (GÁLOVÁ et al., 2011).

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

CAPS technika využívá restrikčních enzymů pro naštěpení fragmentu, který nemá délkový polymorfismus. Restrikcí se fragmentům dodá polymorfismus označovaný jako CAPS. Dále se využívají primery specifické pro daný lokus, syntetizované na základě RAPD fragmentů nebo sekvencí cDNA a následná vizualizace pomocí elektroforéz (GÁLOVÁ et al., 2011).

AFLP (Amplifies Fragment Length Polymorphism)

Tato technika je založena na PCR. Využívá dvouvláknových DNA adaptorů, navázaných na restrikční fragmenty. Následně jsou primery navrženy tak, aby byly komplementární k adaptorům i restrikčním místům. Na 3-konec primeru se navážou 1 - 3 selektivní báze, díky kterým se amplifikuje pouze část restrikčních fragmentů. Tyto fragmenty slouží k detekci polymorfismu DNA. Detekce se provádí na gelu a následná vizualizace pomocí radioaktivity nebo fluorescence (GÁLOVÁ et al., 2011).

Mikrosatelity SSR (Simple Sequences Repeats), STR (Short Tandem Repeats)

Mikrosatelity jsou tandemové repetice DNA sekvencí, obsahující mnohokrát opakující se motivy (např. (CA)_n), tvořené 1 – 6 bázemi. Ty jsou známé jako krátké tandemové repetice (STR), nebo jednoduché opakující se sekvence (SSR) a od nich odvozené minisatelity známé jako VNTR (variabilita v počtu tandemových opakování). VNTR jsou opakující se jednotky v rozmezí od 11 do 60 bp. Mikrosatelity jsou náhodně a rovnoměrněji rozmístěné v genomu než minisatelity, které obvykle nacházíme na telomerách. Určité DNA sekvence v genomu bývají obklopené těmito mikrosatelity (SSR) a podobně jako minisatelity chrání sekvenci mezi nimi. Takové opakující se sekvence byly použity pro stanovení vhodných primerů pro amplifikaci SSR lokusů. Touto metodou je možné odhalit polymorfismus v řadě genotypů, díky rozdílným délkám produktů. Rozdíly v délkách jsou připisovány změnám počtu opakování jednotek v daném lokusu SSR. Počáteční pokusy s mikrosatelity odhalily, že tyto markery jsou kodominantní jako většina RFLP, míra heterozygotnosti je extrémně vysoká, v populaci může existovat mnoho alel a markery se dědí Mendelovským způsobem. Proto mohou být používány v mapování genomů a kvantifikaci genetické rozmanitosti (GUPTA et al., 1996).

STS (Sequences Tagged Sites)

Jako STS markery se označují primery, odvozené z koncové nukleotidové sekvence RFLP sondy, které jsou vázané s určitým znakem. Jejich délka se obvykle pohybuje mezi 18 až 24 bp a amplifikují konkrétní sekvenci DNA ohraničenou dvěma specifickými primery (GÁLOVÁ et al., 2011).

SNP (Single-Nucleotide Polymorphism)

V poslední době se SNP využívají hlavně pro lidský genom. Tato metoda je schopná rozlišit dvě různé alely lišící se pouze v jednom nukleotidu, vyžaduje specifické primery, které jsou plně komplementární k požadované sekvenci. Tato technika je společně s STS v současné době hojně využívána pro studium gluteninů a genů pro tvrdost obiliek u pšenice seté (GÁLOVÁ et al., 2011).

3.3.2 Praktické využití

Molekulární markery mohou být v současné době využívány k mnoha účelům, jako jsou například taxonomické a fylogenetické studie, genetické mapování, charakterizace a identifikace jednotlivých odrůd u zemědělských plodin. Velký význam mají molekulární markery v detekci genů důležitých pro kvalitu obilovin a určování vhodnosti využití (SEKANINA, 2012). Mimo jiné se genetické markery využívají ke zjišťování polymorfizmu mezi druhy nebo i v rámci druhů, kdy je sledována variabilita mezi testovanými vzorky. Jako jedny z prvních markerů byly použity RFLP pro ječmen, kukuřici a pšenici (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001). Pomocí metody RAPD byla mapována genetická variabilita u tritikale (VYHNÁNEK, BEDNÁŘ, 2006) a SSR markery u tritikale využili např. TAMS et al. (2004). STS metoda založená na PCR může být použita k detekci polymorfizmu u pšenice, pomocí primerů odvozených z genů pro α -amylázu a γ -gliadiny. Tyto STS markery mohou být nápomocné při mapování různých genů, pro zlepšení účinnosti šlechtění pšenice (GUPTA et al., 1999). Mikrosatelity nachází velké uplatnění ve výběru a diagnostice segregujících populací. Dále také v mapování genomu, identifikaci kultivarů nebo i určování příbuznosti druhů. (GUPTA et al., 1996)

Základem dobré a kvalitní produkce je také materiál odolný vůči biotickému (houby, bakterie, škůdci atd.) a abiotickému (sucho, extrémní teploty, zasolení půdy atd.) stresu. Z tohoto důvodu se přistupuje k rezistentnímu šlechtění, to znamená snaha o získání rostlin s požadovanou rezistencí. Genetické markery se využívají pro detekci konkrétních alel, nesoucích určitou rezistenci (VEJL et al., 2002). Byly vyvinuty specifické STS markery a izoenzymy, které jsou pevně spojené s geny rezistence vůči rzi pšeničné (*Lr*) a rzi plevové (*Yr*) (ŠLIKOVÁ et al., 2004). V posledních letech se čím dál více o molekulární markery zajímají i šlechtitelské a semenářské firmy z hlediska kontroly čistoty osiva, identifikace odrůd a MAS (marker assisted selection) pro šlechtění nových odrůd kulturních rostlin (SEKANINA, 2012).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

K analýzám bylo použito 13 vzorků pšenice seté s netradičním zbarvením obilek. Tyto vzorky pocházejí z kolekce Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. od Ing. Petra Martinka CSc. (Tabulka 1). Při detekci alel na lokusu *Glu-A3* posloužily jako kontrolní vzorky odrůdy Chinese Spring (*Glu-A3a*), Gabo (*Glu-A3b*), Gawain (*Glu-A3c*), Abbodanza (*Glu-A3d*), Liocorno (*Glu-A3e*), Apostle (*Glu-A3f*) a Glenlea (*Glu-A3g*), které poskytla Genová banka Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni.

Tabulka 1 Přehled genotypů pšenice seté použitých pro analýzy

Číslo vzorku	Přehled genotypů pšenice seté	Barva obilky	Forma	Označení položky v evidenci genových zdrojů
1	<i>Novosibirskaya 67</i>	bílá	jařina	01C0202808
2	<i>ANK-28A</i>	purpurová	jařina	K-61509
3	<i>ANK-28B</i>	purpurová	jařina	K-61510
4	<i>Abissinskaja Arrasajta</i>	purpurová	jařina	01C0200501
5	<i>Konini</i>	purpurová	jařina	01C0203758
6	<i>Purple</i>	purpurová	jařina	01C0205099
7	<i>Purple Feed</i>	purpurová	jařina	K-49426
8	<i>Indigo</i>	purpurová	ozim	01C0107271
9	<i>Rosso</i>	purpurová	ozim	*
10	<i>Citrus</i>	žlutá	ozim	01C0107272
11	<i>Luteus</i>	žlutá	jařina	*
12	<i>Bona Dea</i>	žlutá	ozim	01C0107118
13	<i>TA 4024</i>	žlutá	jařina	*

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

4.2 Metodika

Vlastní molekulárně biologické analýzy sestávaly z následujících kroků:

- Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA,
- příprava reakčních směsí pro PCR,
- příprava agarózového gelu,
- elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR,
- vyhodnocení výsledků.

4.2.1 Izolace rostlinné DNA, kontrola koncentrace a čistoty vyizolované DNA

Jednotlivé vzorky genotypů byly vysety na Petriho misky, na filtrační papír. Po 5 - 7 dnech byly odebrány vzorky DNA po 100 mg z klíčnicích rostlin pšenice seté, vždy do 2 zkumavek. Část vzorků byla uložena do hlubokomrazáčního boxu (-70 °C). DNA byla extrahována pomocí manuálu ke kitu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2012), díky kterému je možné získat celou genomovou DNA – jadernou, mitochondriální i chloroplastovou.

Pomocí přístroje Picodrop Spectrometr PICO100 (Picodrop™) bylo provedeno měření koncentrace extrahované DNA (mg/μl) a zároveň zjišťována její čistota. Naměřené hodnoty byly dostatečné pro následné analýzy.

4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR

Pro identifikaci alel na lokusu *Glu-A3* byly použity alelově specifické STS markery, založené na jednonukleotidových polymorfizmech, navržené podle WANG et al. (2010). Jednotlivé primery použité pro analýzu jsou v tabulce 2. Pro detekci vybraných alel na lokusech *Pina* a *Pinb*, které kódují geny pro tvrdost obilky (*Ha*), byly použity specifické markery podle HUANG, BRÛLÉ-BABEL (2011) (Tabulka 3). Dále byly použity specifické primery pro identifikaci nulových alel pro *Waxy*-geny pšenice podle MCLAUCHLAN et al. (2001) (Tabulka 4).

Reakční směs pro PCR byla připravena postupným přidáváním jednotlivých složek do mikrozkušavky, přesně podle protokolu (Tabulka 5). Takto připravený MasterMix byl rozdělen do mikrozkušavek pro PCR po 24μl a následně byl přidán 1μl templátové DNA, která byla dříve izolována. Tyto PCR mikrozkušavky byly pečlivě uzavřeny

a vloženy do jamek termocykleru T3 (Biometra), kde byl nastaven příslušný program s nastavenými PCR podmínkami pro *Glu-A3*: 5 min 94°C, poté 38 cyklů po 35 s při 94°C, 35 s při 60°C a 90 s při 72°C, závěrečné prodloužení 8 min při 72°C. Pro *Pin a/b*: 5 min při 94°C, 35 cyklů po 30 s při 95°C, 30 s při 60°C, 90 s při 72°C a závěrečné prodloužení 10 min při 72°C. Pro analýzu nulových alel ve *Waxy* genech: 2 min 94°C, poté 33 cyklů po 1 min při 94°C, 2 min při 54°C a 2 min při 72°C.

Tabulka 2 Alelově specifické PCR markery pro identifikaci *Glu-A3*, upraveno dle WANG et al. (2010)

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

Tabulka 3 Primery použité pro analýzu lokusu *Pina* a *Pinb* (upraveno dle HUANG, BRÛLÉ-BABEL, 2011).

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

Tabulka 4 Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu *Waxy*, upraveno dle MCLAUHLAN et al. (2001).

Název	Sekvence	Amplifikovaný lokus
#4F	AAGAGCAACTACCAGT	<i>Wx-A1, Wx-B1a Wx-D1</i>
#4R	TCGTACCCGTCGATGAAGTCGA	

Tabulka 5 Složení mastermixu (pro 1 vzorek)

Složky reakce	Množství (μ l)
deionizovaná H ₂ O	16,8
pufř	5
dNTP	0,1
primer (začínající - F)	1
primer (končící – R)	1

4.2.3 Příprava agarózového gelu

Principem separace na gelu je rozdělování molekul podle jejich molekulové hmotnosti, tedy na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Pro analýzy alelových variant *Glu-A3*, *Pin* a nulových alel *Waxy* genů byl použit 1 % agarózový gel, připravený podle následujícího postupu: 1891 ml destilované vody bylo smícháno s 38 ml 50x TAE pufř (trisacetátový pufř). Z roztoku bylo odlito cca 270 ml do lahve a přidáno 2,8 g agarózy, odvážené na analytických vahách. Vzniklá směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě až k varu. Mezitím byla sestavena vanička pro nalévání gelu, společně s hřebenem, sloužícím ke tvorbě jamek pro vzorky DNA. Po rozvaření agarózy s roztokem pufř a následném zchlazení byly přidány 2 μ l ethidium bromidu, což je fluorescenční barvivo, které se váže na dvoušroubovici DNA a pod UV světlem svítí. Díky tomu je možné z gelu detekovat pozitivní výskyt alel. Takto připravený horký gel byl přelit do sestavené vaničky a případné vzduchové bubliny byly odstraněny. Poté gel tuhnul cca 20 minut v digestoři. Po vyjmutí hřebenu ze ztuhlého gelu byla vanička přenesena do elektroforetické vany a zalita zbytkem naředěného TAE pufř. Gel byl připraven pro nanášení vzorků. Jednotlivé složky pro přípravu gelu jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6 Komponenty pro přípravu 1 % agarózového gelu, pro systém Agagel Maxi (Biometra).

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

4.2.4 Elektroforetická separace a vizualizace výsledných produktů PCR

Horizontální elektroforéza byla provedena v systému Agagel Maxi (Biometra). Vzorky DNA byly napipetovány po 20 μ l do gelu, zalitého pufrům. Elektroforetická vana byla zakryta bezpečnostním krytem a aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Zdroj jednosměrného napětí byl dodáván pomocí Minicell Power Pack P20 (Biometra). Analýzy probíhaly při napětí cca 70 – 80 V, po dobu 1 - 2 hodin.

Po ukončení elektroforézy byla soustava odpojena od proudu a gel vyjmut i s vaničkou z pufru. Výsledné produkty na gelu byly vizualizovány pomocí kamery pod UV lampou v transiluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc.). K zaznamenání obrazu byla použita softwarově ovládaná černobílá kamera CCTV (Panasonic).

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

Produkty amplifikace pomocí PCR vizualizované na agarózovém gelu byly následně porovnány s velikostními markery, na základě velikosti produktu. Byly využity 100 bp DNA Ladder (Promega) a pBR322 DNA *HaeII* (ABgene).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Nízkomolekulární gluteniny

Z hlediska pekařské kvality jsou velmi důležité polymerní gluteniny a monomerní gliadiny. Gluteniny rozdělujeme podle pohyblivosti v SDS-PAGE elektroforéze v polyakrylamidovém gelu na vysokomolekulární (HMW-GS) a nízkomolekulární (LMW-GS). Tyto gluteniny jsou navzájem poutány mezimolekulárními disulfidickými vazbami, a tak tvoří polymerní strukturu. V přítomnosti vody gluteniny společně s gliadiny vytváří lepek. Poměr bílkovin lepku uděluje jedinečné viskoelastické vlastnosti pšeničné mouky. HMW-GS představují přibližně 10 % z celkového množství zásobních proteinů. Typické LMW-GS zastupují přibližně 1/3 zásobních proteinů a jsou kódovány geny na lokusech *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*), umístěné na krátkém rameni 1 chromozomu (WANG et al., 2010). V současné době bylo identifikováno asi 21 různých proteinových alel. Sedm pro lokus *Glu-A3* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* a *g*), devět pro *Glu-B3* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* a *i*) a pět pro *Glu-D3* (*a*, *b*, *c*, *d* a *e*). Studium nízkomolekulárních gluteninů, jejich funkčnosti a vlivu alelické varianty na kvalitu je ve srovnání s vysokomolekulárními mnohem složitější. Pro jejich studium byly vyvinuty STS markery (WANG et al., 2010). Pro lokus *Glu-A3* ZHANG et al. (2004) identifikoval jeden gen včetně sedmi alelických forem, naklonovaných z různých odrůd, a vytvořil pro každou PCR marker pro jejich rozlišování.

U pšeníc s purpurovým a žlutým zbarvením jsme se nejdříve zaměřili na lokus *Glu-A3*. Identifikace alel tohoto genu byla provedena za pomoci 7 specifických primerových kombinací uvedených v práci WANG et al. (2010). Každá alela byla detekována na gelu společně s kontrolním vzorkem. Pro *Glu-A3a* poskytovala kontrolní odrůda Chinese Spring produkt o velikosti 529 bp. Dále kontrolní odrůda Gabo (pro *Glu-A3b*) s velikostí produktu 892 bp, Abbodanza (*Glu-A3d*) 967 bp, Liocorno (*Glu-A3e*) 158 bp a Apostle (*Glu-A3f*) o velikosti 552 bp. Pozitivní kontrola Glenlea (*Glu-A3g*) amplifikovala produkt 1345 bp dlouhý. Alela *Glu-A3c* byla detekována pomocí společného markeru pro *Glu-A3a* a *Glu-A3c*, odlišitelného pomocí kontroly Gawain s velikostí produktu 573 bp.

Detekované alely u těchto genotypů jsou shrnuty v tabulce 7. Nejčastěji se vyskytovala varianta *Glu-A3f* (Obrázek 3), a to u 54 % testovaných. Alely *Glu-A3c*

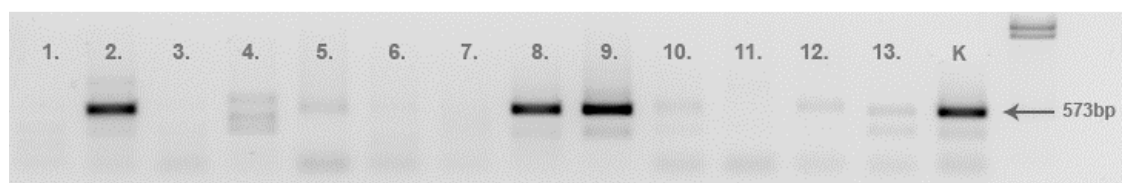
(Obrázek 4) a *Glu-A3d* se vyskytovaly méně často, ostatní varianty alel (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3e*, *Glu-A3g*) nebyly detekovány. Mezi testovanými genotypy se vyskytovaly převážně homozygotní linie (výskyt jedné alely ve vzorku). U dvou odrůd, Konini a Rosso byly detekovány dvě alely zároveň, což může ukazovat na příměsi ve vzorcích nebo heterozygoty. Jelikož máme směsný vzorek z více rostlin dané odrůdy, byly by nutné další doplňující analýzy, které by naši teorii potvrdily, nebo vyvrátily.

ZHANG et al. (2004) uvádějí, že alely *Glu-A3a*, *c*, *d* a *f* mají pozitivní vliv na vlastnosti těsta (odpor a tažnost), tzn. alely, které byly detekovány u námi analyzovaných genotypů.

Tabulka 7 Alelická skladba pro lokus *Glu-A3*

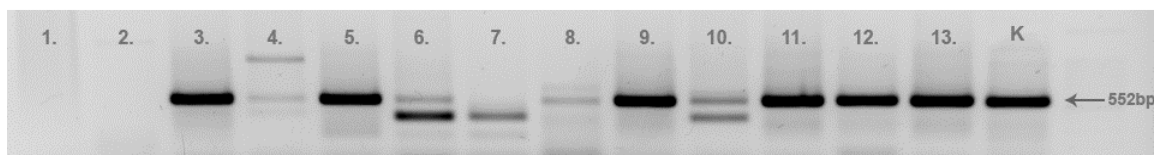
Genotyp	Barva	Výsledná alela
Novosibirskaja 67	bílá	<i>Glu-A3f</i>
ANK-28A	purpurová	<i>Glu-A3c</i>
ANK-28B	purpurová	<i>Glu-A3f</i>
Abissinskaja Arrasajta	purpurová	<i>Glu-A3d</i>
Konini	purpurová	<i>Glu-A3d/f</i>
Purple	purpurová	<i>Glu-A3c</i>
Purple Feed	purpurová	<i>Glu-A3d</i>
Indigo	purpurová	<i>Glu-A3c</i>
Rosso	purpurová	<i>Glu-A3c/f</i>
Citrus	žlutá	<i>Glu-A3c</i>
Luteus	žlutá	<i>Glu-A3f</i>
Bona Dea	žlutá	<i>Glu-A3f</i>
TA 4024	žlutá	<i>Glu-A3f</i>

Vysvětlivky: d/f, c/f - detekovány dvě alely



Obrázek 3 PCR produkty získané pomocí markeru pro *Glu-A3c*

Vysvětlivky: 1 – Novosibirskaja 67, 2 – ANK-28A, 3 – ANK-28B, 4 – Abissinskaja Arrasajta, 5 – Konini, 6 – Purple, 7 – Purple Feed, 8 – Indigo, 9 – Rosso, 10 – Citrus, 11 – Luteus, 12 – Bona Dea, 13 – TA 4024; K – kontrolní vzorek pro alelu *Glu-A3c* (Gawain).



Obrázek 4 PCR produkty získané pomocí markeru pro *Glu-A3f*

Vysvělivky: 1 – Novosibirsckaja 67, 2 – ANK-28A, 3 – ANK-28B, 4 – Abissinskaja Arrasajta, 5 – Konini, 6 – Purple, 7 – Purple Feed, 8 – Indigo, 9 – Rosso, 10 – Citrus, 11 – Luteus, 12 – Bona Dea, 13 – TA 4024; K – kontrolní vzorek pro alelu *Glu-A3f* (Apostle).

5.2 Markery tvrdosti obilky

Tvrdomost obilky je další důležitou charakteristikou nejen pro pekařskou kvalitu, ale také pro výrobu těstovin. Mouka z měkké pšenice se využívá primárně na výrobu koláčů, pečiva a sušenek, zatímco mouka z tvrdé pšenice je považována za nejlepší pro výrobu chleba. Tvrdomost zrna je primárně řízena komplexem tří pevně spojených genů *GSP-1*, *Pina* (purinoindolin a) a *Pinb* (purinoindolin b), kódující protein měkčnosti zrna. Geny *Pina* a *Pinb* jsou hlavními genetickými faktory, které přispívají k tvrdosti zrna. Geny *Pina* a *Pinb* byly mapovány v distální oblasti chromozomu 5D. Všechny kultivary tvrdé pšenice mají sekvenční mutaci na jednom z těchto genů, což má za následek změnu v tvrdosti jádra. Do současné doby bylo identifikováno devět alel pro *Pina* a pro pšenici setou sedmnáct alel *Pinb*. Většinu nově identifikovaných alel můžeme nalézt pouze u čínských krajových odrůd pšenice. V Evropě a Severní Americe byly popsány *Pina* a *Pinb* alely u pšenic s tvrdým zrnem (*Pina-D1b*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c*, *Pinb-D1d*). Velká delece v alele *Pina-D1b* vedla k absenci *Pina*. Bylo vyvinuto mnoho metod pro stanovení jednonukleotidového polymorfizmu (SNP). Většina metod je založena na ligaci oligonukleotidu a vytvoření primeru specifického pro danou alelu (HUANG, BRÛLÉ-BABEL, 2011).

Pomocí kombinací 9 STS markerů pro *Pina* a 4 kombinací markerů pro *Pinb* jsme analyzovali 13 vybraných genotypů (Tabulka 3). V případě *Pina* jsme analyzovali dvě alely pro každý genotyp - *Pina-D1a* a *b* (Tabulka 8). U vybraných vzorků ovšem byla detekována pouze alela *Pina-D1a* (Obrázek 5). U *Pinb* byly analyzovány 4 alely (*Pinb-D1a*, *b*, *c* a *d*), detekovány byly ale jen *Pinb-D1a* o velikosti 423 bp, u 46 % a *Pinb-D1b*

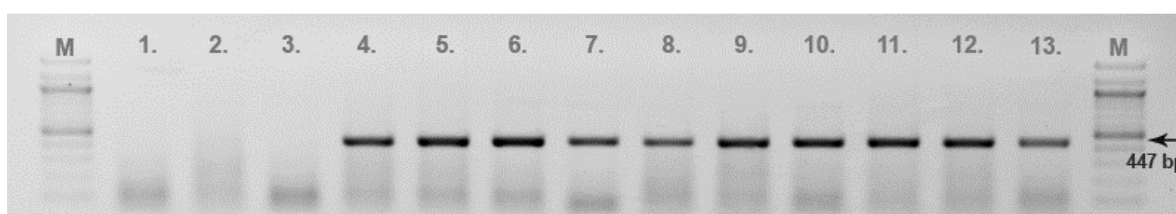
o velikosti 226 bp, u 31 % vzorků (Obrázek 6). V analyzovaném souboru, tak byly zastoupeny pouze pšenice vyznačujícím se tvrdým zrnem.

U genotypů Novosibirskaja 67, ANK-28A a ANK-28B nebyly detekovány PCR produkty ve všech analýzách ani při opakování (každá analýza min. tři opakování). V tomto případě jsme detekovali pravděpodobně mutace v lokusu pro nasedání primerů obecných pro *Pinb-D1* (Tabulka 8). Mutace v genech *Pina-D1* a *Pinb-D1* jsou jednotlivě spojeny s tvrdostí obilky, ale není známo, jestli může mutace u obou lokusů tvrdost obilky zvýšit, případně snížit (TRANQUILLI et al., 2002).

Tabulka 8 Alelická skladba pro lokusy *Pina* a *Pinb*

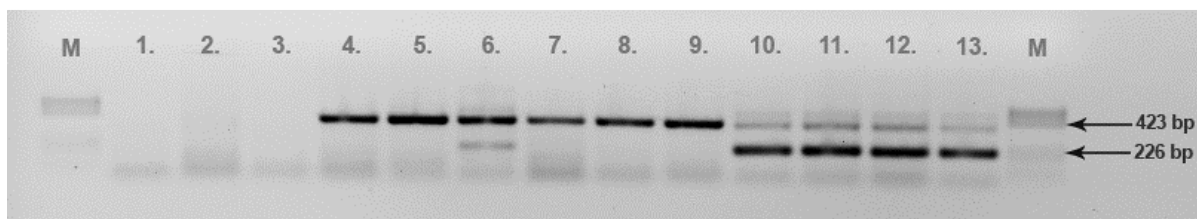
Genotyp	Barva	Výsledná alela	
		<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>
Novosibirskaja 67	bílá	nd	nd
ANK-28A	purpurová	nd	nd
ANK-28B	purpurová	nd	nd
Abissinskaja Arrasajta	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Konini	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Purple	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Purple Feed	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Indigo	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Rosso	purpurová	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>
Citrus	žlutá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Luteus	žlutá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
Bona Dea	žlutá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>
TA 4024	žlutá	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>

Vysvětlivky: nd - nedetekováno



Obrázek 5 Detekované alely *Pina-D1a*.

Vysvětlivky: 1 – Novosibirskaja 67, 2 – ANK-28A, 3 – ANK-28B, 4 – Abissinskaja Arrasajta, 5 – Konini, 6 – Purple, 7 – Purple Feed, 8 – Indigo, 9 – Rosso, 10 – Citrus, 11 – Luteus, 12 – Bona Dea, 13 – TA 4024; M – velikostní markery.



Obrázek 6 Detekované alely *Pinb-D1a* (423 bp) a *Pinb-D1b* (226 bp)

Vysvětlivky: 1 – Novosibirskaja 67, 2 – ANK-28A, 3 – ANK-28B, 4 – Abissinskaja Arrasajta, 5 – Konini, 6 – Purple, 7 – Purple Feed, 8 – Indigo, 9 – Rosso, 10 – Citrus, 11 – Luteus, 12 – Bona Dea, 13 – TA 4024; M – velikostní markery.

Přítomnost alel u genotypů Novosibirskaja 67, ANK-28A a ANK-28B byla testována pomocí primerových kombinací podle GAUTIER et al. (1994), které jsou navrženy v konstitutivních oblastech a určeny pro sekvenační analýzu. Ani při použití těchto primerů nebylo docíleno PCR produktu. Tyto genotypy a lokusy budou předmětem dalšího studia.

5.3 Detekce nulových alel *Waxy* genů

Jednou z hlavních složek pšeničné mouky je škrob, jehož relativní obsah a chemické složení má vliv na kvalitu výrobků získaných z pšenice. Enzym zodpovědný za biosyntézu amylozy je granulově vázaná syntáza škrobu (GBSS) nebo tzv. voskový protein. U pšenice byly detekovány tři geny kódující GBSS, a to *Wx-A1*, *Wx-D1* a *Wx-B1*, lokalizované na chromozomech 7AS, 7DS a 4AL (YAMAMORI, QUYNH, 2000). Je známo, že *Waxy* geny mají velký význam z hlediska technologické kvality, díky zvyšování poměru mezi amylozou a amylopektinem, čímž ovlivňují množství a kvalitu škrobu v endospermu. Tyto parametry následně ovlivňují stravitelnost krmných směsí a mají význam ve výrobě těstovin (NAKAMURA et al., 1993).

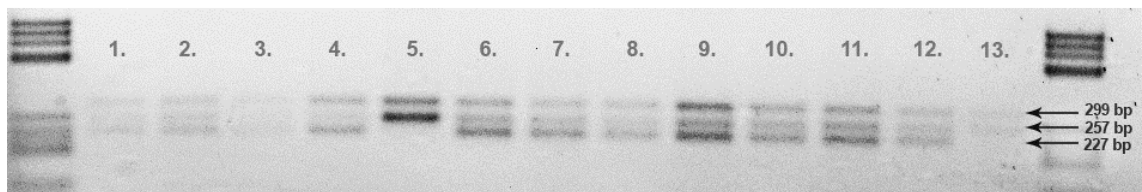
Nedávno byly identifikovány přirozeně se vyskytující mutace (nulové alely), což vedlo ke ztrátě jedné nebo více GBSS izoform. Přítomnost jednoho nebo dvou GBSS má za následek nižší obsah amylozy u pšenice, tyto pšenice jsou označovány jako „částečně voskové“. Pšenice se třemi nulovými alelami obsahují škrob skládající se pouze z amylopektinu. Voskovité pšenice jsou zdrojem mouky žádané u některých asijských produktů, např. nudle. Využití alel nachází i při výrobě modifikovaných potravinářských škrobů nebo pro prodloužení trvanlivosti pečiva (GRAYBOSCH, 1998). Nej-

větší vliv na obsah amylozy a kvalitu byl pozorován u mutantů *Wx-B1*, potom *Wx-D1* a nakonec *Wx-A1* (YAMAMORI, QUYNH, 2000).

K analýzám bylo opět použito 13 genotypů uvedených v tabulce 1 a primery navržené podle McLAUHLAN et al. (2001) uvedené v tabulce 4. Tyto primery jsou navrženy tak, aby amplifikovaly všechny tři kopie GBSS genu v genomu A, B i D. Největší fragment byl u D genomu 299 bp, u genomu A byl fragment o velikosti 257 bp, nejmenší 227 bp u genomu B. U testovaných genotypů byla detekována variabilita pouze u *Wx-B1*, a to pouze u dvou genotypů (15 %) Konini a TA4024 (Tabulka 9), kde tato alela nebyla detekována. Alely *Wx-A1* a *Wx-D1* byly detekovány u všech zbylých genotypů (Obrázek 7). Genotypy Konini a TA4024. tak můžeme označit jako částečné Waxy pšenice a využít je ve šlechtitelských programech pšenice na výrobu speciálních těstovin.

Tabulka 9 Alelická skladba pro *Waxy* lokusy.

Genotyp	Barva	<i>Wx-D1</i> 299 bp	<i>Wx-A1</i> 257 bp	<i>Wx-B1</i> 227 bp
Novosibirskaya 67	bílá	ano	ano	ano
ANK-28A	purpurová	ano	ano	ano
ANK-28B	purpurová	ano	ano	ano
Abissinskaja Arrasajta	purpurová	ano	ano	ano
Konini	purpurová	ano	ano	ne
Purple	purpurová	ano	ano	ano
Purple Feed	purpurová	ano	ano	ano
Indigo	purpurová	ano	ano	ano
Rosso	purpurová	ano	ano	ano
Citrus	žlutá	ano	ano	ano
Luteus	žlutá	ano	ano	ano
Bona Dea	žlutá	ano	ano	ano
TA 4024	žlutá	ano	ano	ne



Obrázek 7 PCR produkty *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1*.

Vysvětlivky: 1 – Novosibirskaja 67, 2 – ANK-28A, 3 – ANK-28B, 4 – Abissinskaja Arrasajta, 5 – Konini, 6 – Purple, 7 – Purple Feed, 8 – Indigo, 9 – Rosso, 10 – Citrus, 11 – Luteus, 12 – Bona Dea, 13 – TA 4024.

6 ZÁVĚR

Pšenice setá je velmi významnou plodinou v oboru potravinářství, ale i krmivářství. Z tohoto důvodu se usiluje o získání co nejlepších a z hlediska pěstování a ekonomiky, nejvýhodnějších odrůd. V posledních letech je také snaha o prosazení odrůd s netradičním zbarvením obilky, právě kvůli obsahu přírodních barviv s pozitivním účinkem na živé organismy.

Tato práce je zaměřena na detekci alel kódujících nízkomolekulární gluteniny (*Glu-A3*), proteiny ovlivňující tvrdost obilky (*Pin*) a také nulové alely *Waxy* genů. K analýzám bylo použito 13 genotypů s purpurovým a žlutým zbarvením obilky, a to Novosibirskaja 67, ANK-28A, ANK-28B, Abissinskaja Arrasajta, Konini, Purple, Purple Feed, Indigo, Rosso, Citrus, Luteus, Bona Dea, TA 4024. Identifikace alelického složení u těchto genotypů by mohlo být nápomocné k výběru odrůd vhodných pro pekařské účely ve šlechtitelském programu.

V případě identifikace v lokusu *Glu-A3* byly detekovány 3 alely, u 54 % to byla *Glu-A3f* a méně časté byly *Glu-A3c* a *Glu-A3d*. Tyto alely mají podle ZHANG et al. (2004) dobrý vliv na vlastnosti těsta. Dále byla detekována jedna alela *Pina-D1a* u všech 13 testovaných genotypů. V neposlední řadě jsme detekovali dvě alely pro *Pinb*, a to u 46 % *Pinb-D1a* a u 31 % *Pinb-D1b*. V případě tří genotypů Novosibirskaja 67, ANK-28A a ANK-28B nebyly detekovány žádné alely. Mohlo by se jednat o mutace v lokusu pro nasedání primerů pro *Pinb-D1*. Znalost alelického složení *Pina* a *Pinb* lokusů u pšenice s nestandardním zbarvením obilky by mohlo být využito pro MAS (Marker Assisted Selection) ve šlechtitelských programech, zaměřených na výrobu chleba. Nulové alely *Waxy* genů byly identifikovány také u výše zmíněných genotypů. Pouze v 15 %, tedy u dvou genotypů Konini a TA4024 byla detekována variabilita u *Wx-B1*, kde tato alela nebyla detekována. Tyto odrůdy mohou být považovány za částečně voskové a mohly by být potenciálně významné v budoucích šlechtitelských programech. Podle YAMAMORY, QUYNH (2000) má právě mutantní alela *Wx-B1* největší vliv na obsah amylozy a kvalitu škrobu v obilce.

Veškeré laboratorní analýzy probíhaly na Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Byly využity metody molekulární biologie, jako například izolace genomové DNA, PCR a elektroforetická separace. Získané zkušenosti během řešení bakalářské práce budu moci uplatnit ve své diplomové práci.

7 LITERATURA

1. ABDEL-AAL E.-S. M., YOUNG J. C., RABALSKI I., 2006: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13): 4696-4704, ISSN 0021-8561.
2. BIFFEN R. H., 1905: Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *The Journal of Agricultural Science*, 1 (01): 4-48, ISSN 1469-5146.
3. BOTH Z., CHLOUPEK O., 2005: Seed vitality of wheat and bread making quality, s. 22. In: RYANT P., CERKAL R., STŘEDA T., VEJRAŽKA K. (eds): *MendelNet Agro 2005. Sborník abstraktů z konference postgraduálního doktorského studia*, MZLU Brno, 22 s, ISBN 80-7157-905-X.
4. CLIFFORD M. N., 2000: Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7): 1063-1072, ISSN 0022-5142.
5. CORNELL H. J., HOVERING A. W., CHRYS A., ROGERS M., 1994: Particle size distribution in wheat starch and its importance in processing. *Starch-Stärke*, 46 (6): 203-207, ISSN 0038-9056.
6. ESCRIBANO-BAILON M. T., SANTOS-BUELGA C., RIVAS-GONZALO J. C., 2004: Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054 (1): 129-141, ISSN 0021-9673.
7. FERREYRA M. L. F., RIUS S. P., CASATI P., 2012: Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3 (222): 1-15, ISSN 0016-2167.
8. GÁLOVÁ Z., BALÁŽOVÁ Ž., CHŇAPEK M., VIVODÍK M., OSLOVIČKOVÁ V., 2011: *Bielkovinové a DNA markery pšenice*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Nitra, 175 s, ISBN 978-80-552-0673-8.
9. GAUTIER M. F., ALEMAN M. E., GUIRAO A., MARION D., JOUDRIER P., 1994: Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology*, 25 (1): 43-57, ISSN 0167-4412.
10. GONCHAROV N. P., 2002: *Comparative genetics of wheats and their related species*. Siberian University Press, Novosibirsk, 268 s, ISBN 978-5-94087-046-3.
11. GONCHAROV N. P., 2011: Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Systematics and Evolution*, 295 (1-4): 1-11, ISSN 0378-2697.

12. GONCHAROV N. P., GOLOVNINA K. A., KILIAN B., GLUSHKOV S., BLINOV A., SHUMNY V. K., 2008: Evolutionary history of wheats - the main cereal of mankind. *Biosphere Origin and Evolution*, Springer US, 407-419, ISBN 978-0-387-68655-4.
13. GRAYBOSCH R. A., 1998: Waxy wheats: Origin, properties, and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (4): 135-142, ISSN 0924-2244.
14. GUPTA P. K., BALYAN H. S., SHARMA P. C., RAMESH B., 1996: Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*, 45 (1): 45-54, ISSN 0011-3805.
15. GUPTA P. K., VARSHNEY R. K., SHARMA P. C., RAMESH B., 1999: Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118 (5): 369-390, ISSN 0179-9541.
16. HUANG X. Q., BRÛLÉ-BABEL A., 2011: Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 53 (3): 277-284, ISSN 0733-5210.
17. JAAFAR S., SHARIFAH N., BARON J., SIEBENHANDL-EHN S., ROSENAU T., BÖHMDORFER S., GRAUSGRUBER H., 2013: Increased anthocyanin content in purple pericarp × blue aleurone wheat crosses. *Plant Breeding*, 132 (6): 546-552, ISSN 0179-9541.
18. KHLESTKINA E. K., 2013: Genes Determining the Coloration of Different Organs in Wheat. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3 (1): 54-65, ISSN 2079-0597.
19. KIHARA H., 1944: Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agriculture and Horticulture (Tokyo)*, 19 (1): 13-14, ISSN 0021-504X.
20. KONG J. M., CHIA L. S., GOH N. K., CHIA T. F., BROUILLARD R., 2003: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64 (5): 923-933, ISSN 0031-9422.
21. MARKAKIS P. (ed.), 1982: *Anthocyanins as Food Colors*, Academic press, Inc., New York, 280 s.
22. MARTINEK P., VYHNÁNEK T., 2014: Barevné zrna pšenice jako zdroj antioxidantů. *Úroda*, 14 (7): 68-70, ISSN 0139-6013.
23. MARTINEK P., VYHNÁNEK T., PODHORNÁ J., NOVOTNÁ P., VACULOVÁ K., KADLÍKOVÁ M., JIRSA O., KUREČKA R., 2011: Pšenice s odlišným zbarvením zrna a možnost jejich využití v potravinářství. *Úroda*, 11 (12): 117-123, ISSN 0139-6013.
24. MCCLAUCHLAN A., OGBONNAYA F. C., HOLLINGSWORTH B., CARTER M., GALE K. R., HENRY R. J., APPELS R., 2001: Development of robust PCR-based DNA markers for

- each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Crop and Pasture Science*, 52 (12): 1409-1416, ISSN 1836-0947.
25. MOHAN M., NAIR S., BHAGWAT A., KRISHNA T. G., YANO M., BHATIA C. R., SASAKI T., 1997: Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3 (2): 87-103, ISSN 1380-3743.
26. NAKAMURA T., YAMAMORI M., HIRANO H., HIDAKA S., 1993: Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochemical Genetics*, 31 (1-2): 75-86, ISSN 0006-2928.
27. NILSSON-EHLE H., 1914: Zur Kenntnis der Mit der Keimungs physiologie des Weizens in Zusammenhang Stehenden Inneren Faktoren, *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung – Journal of Plant Breeding*, 2: 153-187.
28. NOVOTNÝ F., HUBÍK K., 2006: *Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice*, Databáze online [cit. 2015-02-04] dostupné z: <http://www.leadingfarmers.cz/library/?ix=21&link=>
29. PODHORNÁ J., 2010: *Analýza barviv pšeníc s netradičním zabarvením obilky*. Brno. Bakalářská práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin. Vedoucí práce Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.
30. PRUGAR J., BARANYK P., BÁRTA J., BJELKOVÁ M., BRADOVÁ J., 2008: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, 327 s, ISBN 978-80-86576-28-2.
31. PŘÍHODA J., SKŘIVAN P., HRUŠKOVÁ M., 2004: *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. VŠCHT, Praha, 203 s, ISBN 80-7080-530-7.
32. QIAGEN, 2012: *DNeasy Plant Handbook*. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>
33. ŘEPKOVÁ J., RELICHOVÁ J., 2001: *Genetika rostlin*. Masarykova univerzita, 1. vyd. Brno 269 s, ISBN 978-80-210-6408-9.
34. SEKANINA P., 2012: *Aplikace DNA markerů u pšenice*. Brno. Bakalářská práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin. Vedoucí práce Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

35. SCHLÖTTERER C., 2004: The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5 (1): 63-69, ISSN 1471-0056.
36. SUKOVÁ I., 2012: *Metody stanovení pekařské kvality pšenice*, Agronavigator, ÚZEI Databáze online [cit. 2015-02-16] dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=167&ch=13&typ=1 &val=123468>
37. ŠLIKOVÁ S., GREGOVÁ E., BARTOŠ P., HANZALOVÁ A., HUDCOVICOVÁ M., KRAIC J., 2004: Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24*. *Plant, Soil and Environment*, 50 (10): 43-438, ISSN 1214-1178.
38. ŠVEC I., HRUŠKOVÁ M., 2009: Modelling of wheat, flour and bread quality parameters. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 40 (2): 58-66, ISSN 1211-3174.
39. TAMS S. H., BAUER E., OETTLER G., MELCHINGER A. E., 2004: Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (7): 1385-1391, ISSN 0040-5752.
40. TRANQUILLI G., HEATON J., CHICAIZA O., DUBCOVSKY J., 2002: Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Science*, 42 (6): 1812-1817, ISSN 0011-183X.
41. TROJAN V., MUSILOVÁ M., VYHNÁNEK T., KLEJDUS B., HANÁČEK P., HAVEL L., 2014: Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis. *Journal of Cereal Science*, 59 (1): 48-55, ISSN 0733-5210.
42. URBAN T., KRÍŽANOVÁ I., 2008: *Virtuální svět genetiky 3, vers. 1.1*. Databáze online [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul3.html>
43. VEJL P., SKUPINOVÁ S., SEDLÁK P., BARDOVÁ M., 2002: *Analýzy rostlinného genomu*. Česká zemědělská univerzita v Praze, PowerPrint, 238 s, ISBN 80-231-0903-2.
44. VYHNÁNEK T., BEDNÁŘ J., 2006: Molecular markers of genetic variability in triticale varieties registered in the Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Brunensis*, 54 (5): 149-154, ISSN 1211-8516.
45. WANG L. S., STONER G. D., 2008: Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269 (2): 281-290, ISSN 0304-3835.
46. WANG L., LI G., PEÑA R. J., XIA X., HE Z., 2010: Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 51 (3): 305-312, ISSN 0733-5210.

47. YAMAMORI M., QUYNH N. T., 2000: Differential effects of Wx-A1,-B1 and-D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100 (1): 32-38, ISSN 0040-5752.
48. ZEVEN A. C., 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56 (3): 243-258, ISSN 0014-2336.
49. ZHANG W., GIANIBELLI M. C., RAMPLING L. R., GALE, K. R., 2004: Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum*. L). *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (7): 1409-1419, ISSN 0040-5752.
50. ZIMOLKA J., EDLER S., HŘIVNA L., JÁNSKÝ J. KRAUS P., MAREČEK J., NOVOTNÝ F., RICHTER R., ŘÍHA K., TICHÝ F., 2005: *Pšenice, pěstování, hodnocení a užití zrna*. Profi Press, Praha, 180 s, ISBN 80-86726-09-6.
51. ŽOFAJOVÁ A., PŠENÁKOVÁ I., HAVRELETOVÁ M., PILIAROVÁ, M., 2012: Accumulation of total anthocyanins in wheat grain. *Agriculture*, 58 (2): 50-56, ISSN 1338-4376.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 *Schéma evoluce pšenice.*

Obrázek 2 *Obilka pšenice na podélném řezu.*

Obrázek 3 *PCR produkty získané pomocí markeru pro Glu-A3c.*

Obrázek 4 *PCR produkty získané pomocí markeru pro Glu-A3f.*

Obrázek 5 *Detekované alely Pina-D1a.*

Obrázek 6 *Detekované alely Pinb-D1a (423 bp) a Pinb-D1b (226 bp).*

Obrázek 7 *PCR produkty Wx-A1, Wx-B1 a Wx-D1.*

Tabulka 1 *Přehled genotypů pšenice seté použitých pro analýzy.*

Tabulka 2 *Alelově specifické PCR markery pro identifikaci Glu-A3.*

Tabulka 3 *Primery použité pro analýzu lokusu Pina a Pinb.*

Tabulka 4 *Primery a jejich sekvence použité pro analýzu lokusu Waxy.*

Tabulka 5 *Složení mastermixu (pro 1 vzorek).*

Tabulka 6 *Komponenty pro přípravu 1 % agaróзовého gelu, pro systém Agagel Maxi (Biometra).*

Tabulka 7 *Alelická skladba pro lokus Glu-A3.*

Tabulka 8 *Alelická skladba pro lokusy Pina a Pinb.*

Tabulka 9 *Alelická skladba pro Waxy lokusy.*