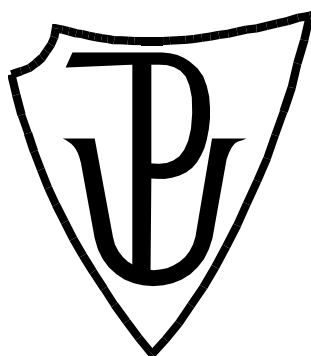


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizácia génu škrobovej syntázy II v odrodách
pšenice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Alžbeta Ivaničová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Miroslav Valárik Ph.D.
Rok:	2017

Čestné prehlásenie

Čestne prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu s názvom „Charakterizácia génu škrobovej syntázy II v odrodách pšenice“ spracovala samostatne pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. s použitím uvedenej literatúry. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 28.04 2017

.....
podpis autora

Pod'akovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi Mgr. Miroslavovi Valárikovi, Ph.D. za odborné vedenie, rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval pri zostavovaní tejto diplomovej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko študenta	Bc. Alžbeta Ivaničová
Názov práce	Charakterizácia génu škrobovej syntázy II v odrodách pšenice
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Centrum regionu Haná pre biotechnologický a zemědělský výzkum, Ústav experimentální botaniky AV ČR
Vedúci práce	Mgr. Miroslav Valárik Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Pšenica je jednou z najdôležitejších plodín, ktorá poskytuje základné potraviny pre viac ako 30% ľudskej populácie. Hlavnú zložku pšeničného zrna predstavuje škrob, ktorý je zložený z amylopektínu (70-80%) a amyulózy (20-30%). Pomer amyulózy a amylopektínu sa u škrobov rôzneho pôvodu líši a ovplyvňuje radu fyzikálnych ale i nutričných vlastností. Škroby so zvýšeným podielom amyulózy, nazývané tiež rezistentné škroby majú podobné vlastnosti ako vlákna a teda sú rezistentné voči procesom trávenia. Pšenice so zvýšeným množstvom amyulózy sa potom môžu využiť na tvorbu obilných potravinárskych výrobkov, ktoré obsahujú väčšie množstvo funkčnej vlákniny bez zmeny výživných vlastností. Funkčná vlákna má pozitívny vplyv na zdravotný stav populácie a je tiež prevenciou pred radou civilizačných ochorení ako je diabetes, obezita či rakovina hrubého čreva. V rámci tejto práce bola uskutočnená charakterizácia štruktúry pšeničného génu škrobovej syntázy II pre 7A chromozóm, ktorého mutáciou môže dôjsť k zvýšeniu podielu amyulózy v škrobe. V rámci tejto práce bol gén pre pšeničnú škrobovú syntázu II (SSII-A gén) anotovaný. Vďaka tejto anotácii bolo možné navrhnúť špecifické primery pre SSII-A gén a osekvenovať SSII-A gén za účelom zistenia miery polymorfizmu v šľachtiteľských materiáloch a identifikácie potenciálneho markeru pre tento gén. Pre identifikáciu polymorfných miest bola vybraná diverzná testovacia populácia. Na základe výsledných sekvencií SSII-A génu v diverznej populácii bola osekvenovaná oblasť druhého exónu v 384 šľachtiteľských línii. Na týchto líniiach bola zistená veľmi nízka

miera polymorfizmu, kde len v 6 líniách boli identifikované 2 jedno-nukleotidové polymorfizmy, ktoré nemali vplyv na aminokyselinovú sekvenciu. Pri porovnaní SSII-A génu *T. aestivum* s druhmi *T. durum* Langdon a *T. militinae* bolo zistených 5 jedno-nukleotidových substitúcií v kódujúcich oblastiach v sekvencii druhu *T. militinae*, z ktorých len 2 mali vplyv na sekvenciu polypeptidového reťazca. Z toho vyplýva, že gén škrobovej syntázy II je veľmi konzervovaný, a preto nie je vhodný pre tvorbu markerov vhodných pre šľachtiteľskú prax.

Kľúčové slová	Pšenica, škrob, škrobová syntáza II, amyλόza, rezistentný škrob, vláknina
Počet strán	66
Počet príloh	1
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Alžbeta Ivaničová
Title	Characterization of starch synthase II gene in wheat varieties
Type of thesis	Diploma
Department	Centre of the region Hana for biotechnological and agricultural research, Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	Mgr. Miroslav Valárik Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

Wheat is one of the most important cultivated plants, which provides basic food for more than 30% of the human population. The main component of wheat grain is a starch which consists of amylopectin (70-80%) and amylose (20-30%). The proportion of amylose and amylopectin in the starches of various origins varies and affects a lot of physical as well as nutritional properties. Starches with an increased ratio of amylose, also called resistant starches have similar properties as the fiber and therefore are resistant to digestion process. Wheat with an increased amount of amylose can then be used for production of cereal food products containing more functional fiber without altering the nutritional properties. Functional fiber has a positive effect on the health of the population and is also the prevention of lifestyle diseases such as diabetes, obesity and colon cancer. Within the scope of this work was performed characterization of the structure of the wheat starch synthase II gene on chromosome 7A, whose mutation may increase the proportion of amylose starch. For this study, the gene for the wheat starch synthase II (SSII-A gene) was annotated. With this annotation it is able to design specific primers for SSII-A gene and sequenced SSII-A gene in order to determine the degree of polymorphism in breeding materials and identifying a potential marker for this gene. To identify polymorphic sites was selected diversion test population. Based on resulting sequences SSII-A gene in the diversion population it was sequenced sabotage region 384 of the second exon of the breeding lines. On these lines has been detected very low levels of polymorphism where

only in 6 lines were identified two single-nucleotide polymorphisms that didn't affect the amino acid sequence. Comparing SSII-A gene of *T. aestivum* species with *T. durum* Langdon and *T. militinae* were found 5 single-nucleotide substitutions in the coding regions of the sequence of *T. militinae*, which only two had an effect on the sequence of the polypeptide chain. Consequently, the starch synthase II gene is highly conserved and therefore not suitable for the formation markers suitable for a breeders' practice.

Keywords	Wheat, starch, starch synthase II, amylose, resistant starch, dietary fiber
Number of pages	66
Number of appendices	1
Language	Slovak

OBSAH

1.	ÚVOD	11
2.	LITERÁRNY PREHĽAD	12
2.1	Pšenica (<i>Triticum</i> L.).....	12
2.1.1	Pšenica siata.....	13
2.1.2	Výnos pšenice.....	15
2.1.3	Kvalita pšenice.....	16
2.2	Škrob (<i>Amylum</i>).....	17
2.2.1	Využitie škrobu.....	18
2.2.2	Štruktúra škrobových zrn.....	18
2.2.3	Chemické zloženie škrobu.....	19
2.2.3.1	Amylopektín.....	20
2.2.3.2	Amylóza.....	20
2.2.4	Škroby so zvýšeným podielom amylózy.....	21
2.2.5	Biosyntéza škrobu.....	24
2.2.5.1	Škrobová syntáza.....	25
2.3	Variabilita genotypu rastlín.....	26
2.3.1	Génové mutácie.....	26
3.	MATERÁL A METÓDY	29
3.1	Materiál.....	29
3.1.1	Biologický materiál.....	29
3.1.2	Chemikálie.....	30
3.1.3	Pufry a roztoky.....	30
3.1.4	Komerčné kity.....	31
3.1.5	Prístrojové vybavenie.....	31
3.2	Metódy.....	32
3.2.1	Predikcia génu škrobovej syntázy II.....	32
3.2.2	Extrakcia a purifikácia DNA.....	32
3.2.3	Agarózová gélová extrakcia a vizualizácia DNA.....	32
3.2.4	Navrhovanie špecifických primerov.....	33
3.2.5	Polymerázová reťazová reakcia.....	33

3.2.6	Polyakrylamidová gélová elektroforéza.....	34
3.2.7	Prečistenie PCR produktu a sekvenovanie.....	35
3.2.8	Spracovanie získaných dát.....	35
4.	VÝSLEDKY.....	36
4.1	Anotácia génu škrobovej syntázy II pre 7A chromozóm.....	36
4.2	Navrhovanie špecifických primerov.....	36
4.3	Overenie špecificity navrhnutých primerov.....	37
4.4	Identifikácia polymorfizmu v SSII-A géne.....	39
4.5	Porovnanie SSII génu medzi jednotlivými subgenómami SSII génu.....	44
5.	DISKUSIA.....	45
6.	ZÁVER.....	51
7.	LITERATÚRA.....	52
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	60
9.	ZOZNAM PRÍLOH.....	62

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

- Spracovanie literárnej rešerše na danú tému diplomovej práce

Praktická časť

- Analyzovanie štruktúry génu škrobovej syntázy II v diverzných vzorkách druhu *T. aestivum*
- Porovnanie sekvencie génu škrobovej syntázy II na 7A chromozóme so sekvenciami génu škrobovej syntázy II na 7B a 7D chromozóme
- Osekvenovanie najpolymorfnejšej exónovej oblasti génu škrobovej syntázy II na kultúrnych pšeniciach
- Zistenie vplyvu zmien v nukleových sekvenciách v géne škrobovej syntázy II na expresiu génu v kultúrnych pšeniciach

1. ÚVOD

Pšenica ako jedna z troch najdôležitejších plodín (okrem ryže a kukurice) predstavuje základný zdroj ľudskej výživy pre viac ako 30% ľudskej populácie. Pšenica je základnou obilninou nášho klimatického pásma, ktorej zrno je svojimi technologickými vlastnosťami vhodné na výrobu rôznych pokrmov, chleba, pečiva, oblátok či cestovín. Pšeničné zrno je zložené prevažne zo škrobu (65-75%), vody (14%), bielkovín (10-13%) a minoritných látok ako sú neškrobové polysacharidy (2-3%), tuky (2%) a enzýmy (1-3%). Snaha o zvýšenie obsahových látok s biologickým alebo funkčným významom komerčných pekárenských a pečivárenských výrobkov je celosvetovým trendom. K najviac limitovaným zložkám pšeničnej múky patrí vlákna. V prípade pšenice, zmenou pomeru hlavných zložiek škrobu, a to amylózy a amylopektínu, môžeme dosiahnuť zníženie glykemického indexu a zvýšenie obsahu funkčnej vlákniny v potrave. Škroby s vyšším podielom amylózy sú vhodné najmä na výrobu potravín na báze rezistentného škrobu. Rezistentný škrob je odolný voči žalúdočnej kyseline, nerozpadáva sa pôsobením tráviacich enzýmov, najmä α -amylázy, a preto škrob nie je úplne metabolizovaný na energiu ale chová sa ako vlákna. Zvýšené množstvo vlákniny v potrave ovplyvňuje zloženie črevnej mikroflóry čo má priaznivé zdravotné účinky, upravuje krvný tlak, podporuje dobré trávenie, je prevenciou pred rôznymi civilizačnými ochoreniami ako je obezita, cukrovka a rakovina hrubého čreva. Enzým škrobová syntáza II má významný vplyv na množstvo a zloženie škrobu a je zapojený do syntézy amylopektínu. Mutáciou génu škrobovej syntázy II dochádza k zvýšeniu množstva amylózy v škrobe. Predkladaná práca sa zaoberá charakterizáciou štruktúry pšeničného génu škrobovej syntázy II pre 7A chromozóm a určením miery polymorfizmu tohto génu v rámci šľachtiteľských materiálov.

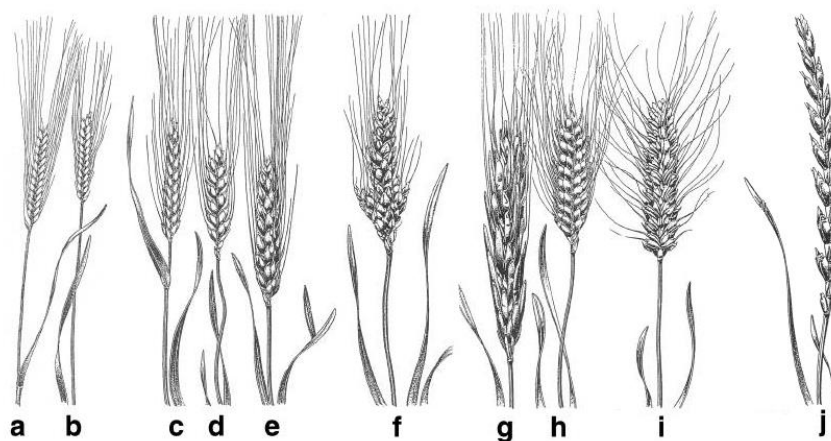
2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Pšenica (*Triticum L.*)

Pšenica je jedna z najstarších plodín užívaných človekom. Vďaka svojej vysokej výživnej hodnote táto plodina predstavuje základnú potravinársku surovinu pre výrobu rôznych pokrmov, cestovín, oblátok či pečiva. V súčasnosti sa väčšina potravín vyrába z nových odrôd pšenice, ktoré boli vyšľachtené v posledných rokoch. V priemysle sa pšenica využíva hlavne ako surovina na výrobu liehu a piva. Takisto je využívaná na výrobu krmív pre hospodárske zvieratá, či na výrobu domácich dekorácií. Pšenica predstavuje jednu z najpestovanejších plodín na svete, medzi krajiny s najväčšou produkciou patrí EÚ, Čína, India, USA, Rusko (Martin *et al.*, 2006). Vďaka svojej vysokej produkcii sa radí do "veľkej trojky" obilnín, spolu s ryžou a kukuricou. Jej svetová ročná produkcia je viac ako 600 miliónov ton (<http://www.fao.org/>).

Rod pšenica (*Triticum L.*) patrí do čeľade lipnicovitých (*Poaceae*). Zahŕňa niekoľko druhov a veľký počet foriem a kultivarov. Delí sa podľa ploidity na tri skupiny. Medzi diploidné ($2n = 14$) pšenice zaraďujeme pšenicu planú nazývanú jednozrnka (*Triticum boeoticum*) a kultúrnu jednozrnku (*Triticum monoccocum*), ktorá sa pestuje výhradne na kŕmne účely (Zimolka, 2005). Z pestovateľského hľadiska má väčší význam skupina tetraploidných ($2n = 28$) pšeníc, ktoré sa podľa vzniku delia na takzvané Emmer pšenice („Emmer“ pšenica (*Triticum turgidum*, tiež niekedy Farro), ktorá vznikla v úrodnom polmesiaci a je základom pšenice tvrdej a chlebovej) a tetraploidnú *Triticum timopheevii* a z nej odvodené hexaploidné *Triticum zhukovskyi*, ktoré vznikli pravdepodobne nezávisle na „Emmer“ pšenicách (Rodríguez *et al.*, 2000; Badaeva *et al.*, 2016). Timopheevii pšenice majú kultivované (*Triticum militinae*) i plané formy (*Triticum ararticum*). Medzi najvýznamnejšie „Emmer“ pšenice patria pšenica planá dvojzrnka (*Triticum dicocoides*), pšenica dvojzrnka (*Triticum dicocum*), pšenica nadurelá (*Triticum turgidum*), (*Triticum polonicum*) a pšenica tvrdá (*Triticum durum*) (Obr.1). Z danej skupiny najvýznamnejšia pšenica tvrdá sa používa najmä na výrobu cestovín. Pšenica tvrdá kultivaru Langdon je významná vďaka svojej odolnosti voči hrdzi trávovej a fusariózy klasu, spôsobené *Fusarium graminearum*, je však menej odolná voči mrznutiu v porovnaní s ostatnými druhmi pšenice (Soresi, 2015). Zo skupiny Timopheevii pšeníc, významná *Triticum militinae* je zaujímavá vďaka svojej vysokej odolnosti voči múčnatke, hrdzi pšeničnej a sneti (Jakobson, 2012). Najvýznamnejšia skupina z hľadiska pestovania je hexaploidná ($2n = 42$) pšenica, ako napríklad pšenica

špalda (*Triticum spelta* L.) a hlavne pšenica siata (*Triticum aestivum* L.). Pšenica špalda sa využíva sa na výrobu cestovín alebo jej nedozreté obilky ako prísady do polievok (Zimolka, 2005). Z rodu *Triticum* je z ekonomického a poľnohospodárskeho hľadiska najdôležitejším zástupcom pšenica siata.



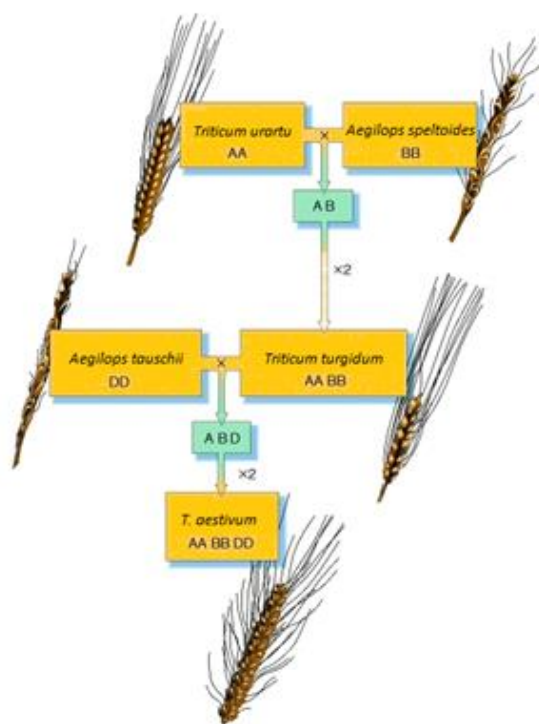
Obr.1 Rôzne druhy rodu *Triticum*

a) *Triticum boeoticum*; **b)** *T. monococcum*; **c)** *T. dicoccoides*; **d)** *T. dicoccum*; **e)** *T. durum*; **f)** *T. turgidum*; **g)** *T. polonicum*; **h)** *T. timopheevii*; **i)** *T. aestivum*; **j)** *T. spelta* (upravené podľa Mangelsdorf, 1953)

2.1.1 Pšenica siata (*Triticum aestivum* L.)

Pšenica siata patrí k najdôležitejším svetovým plodinám, predstavuje základ potravy pre viac než tretinu ľudskej populácie (<http://www.cimmyt.org/>). Pšenica siata je tradične pestovaným druhom vo všetkých systémoch hospodárstva v našej oblasti, zahŕňa cez 90% všetkých kultivarov pšenice (Matsuoka, 2012). Svetové zásoby pšenice siatej sa hlavne vplyvom zvýšeného dopytu znižujú a podľa odhadov klesli až o polovicu. Úrodu ďalej nepriaznivo ovplyvňujú extrémne výkyvy počasia, škodcovia a rôzne choroby. Cieľom šľachtiteľov pri tvorbe nových odrôd je nielen vysoká úroda a vhodné agronomické vlastnosti pšenice ako odolnosť voči biotickým (choroby a škodcovia) a abiotickým (sucho, mráz a vysoké teploty) faktorom prostredia, ale v poslednom období je to najmä pridaná hodnota primárnej rastlinnej produkcie, ktorá zvyšuje jej konkurencieschopnosť. Pšenica s pridanou hodnotou umožňuje výrobu funkčných potravín, ktoré sú obohatené o biologicky aktívne látky so zdravím prospešným efektom u konzumenta. Môže tým dochádzať k zlepšeniu zdravotného stavu ľudskej populácie, či prevencii rôznych civilizačných ochorení (Rückschloss *et al.*, 2015).

Pšenica siata je alohexaploidná, jej genóm tvoria tri blízko príbuzné subgenómy A, B a D, každý so siedmimi chromozómami (Devos a Gale, 1997). Genóm pšenice siatej obsahuje skoro 17 Gb (Bennett a Smith, 1991). Kódujúce sekvencie predstavujú približne 1,2% genómu (Brenchley *et al.*, 2012), zvyšok tvoria medzigénové a repetitívne sekvencie DNA (Paux *et al.*, 2008). Alopolyloidizácia pšenice prebiehala v dvoch po sebe nasledujúcich medzidruhových hybridizáciách. Prvá hybridizácia sa uskutočnila pred približne 0,5 miliónmi rokov, kedy prebehlo prvé kríženie medzi divokou diploidnou pšenicou *Triticum urartu*, ktorej genóm bol $2n = 14$, AA s druhom príbuzným s *Aegilops speltoides* s genómom $2n = 14$, BB. Výsledkom tejto hybridizácie bol nový tetraploidný druh *Triticum turgidum* s genómom $2n = 48$, AABB (Huang *et al.*, 2002). K druhej hybridizácii došlo približne pred 10 tisícami rokov, kedy sa skrížila tetraploidná pšenica *Triticum turgidum* s diploidnou pšenicou *Aegilops tauschii* s genómom $2n = 14$, DD. Touto hybridizáciou vznikla súčasná hexaploidná pšenica siata *Triticum aestivum* s genómom $2n = 42$, AABBDD (Obr.2) (Charmet, 2011).



Obr.2 Schéma vývoja pšenice siatej

Schéma dvoch po sebe nasledujúcich medzidruhových hybridizácií v priebehu vývoja genómu pšenice siatej (upravené podľa http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/documents/Doc_Evolution.php)

2.1.2 Výnos pšenice

Hospodársky výnos u pšenice je tvorený predovšetkým výnosom zrna. Výnos zrna je výsledkom pôsobenia viacerých faktorov, podmienok prostredia pre rastlinu a reakcií genotypu rastliny na dané podmienky.

Zložky výnosu zrna predstavujú tri základné výnosové prvky:

1. Počet klasov na plošnú mieru
2. Počet zrn v klase
3. Hmotnosť zrn

Počet klasov na plošnú mieru predstavuje počet rastlín na 1m² a počet plodných stebiel na jednej rastline. Počet rastlín je limitovaný prípravou pôdy, biologickou hodnotou osiva, siatím, stupňom poškodenia, nepriaznivými činiteľmi (choroby, škodcovia, poveternostné podmienky), medzidruhovými a vnútrodruhovými vzťahmi. Pre tvorbu vysokých výnosov je potrebná vysoká biologická hodnota osiva, na ktorú má vplyv aj predchádzajúca úroveň výživy pri jeho redukcii. K redukcii počtu rastlín dochádza v období od jari až po zber úrody, najkritickejšie obdobie kedy dochádza k najväčšej redukcii počtu rastlín pre pšenicu predstavuje zima a obdobie pred jarou. Optimálna hustota porastu daná počtom vysiatych klíčivých obiliek na jednotku plochy je 400-500 na m² (Lipavský, 2000).

Počet zrn v klase je daný počtom kláskov a počtom plodných kvietkov v klase. Počet klasov na plošnú mieru a počet zrn v klase sú do značnej miery ovplyvňované rovnakými podmienkami. Počet zrn v klase je ovplyvnený dĺžkou obdobia odnožovania, genetickým potenciálom produktivity klasu rastliny, aktivite fotosyntetického aparátu v období tvorby klasov a kláskov. Podmienky počasia v dobe kvitnutia, formovania klasov a kláskov tiež vplývajú na počet kláskov v klase ako aj prítomnosť nepriaznivých činiteľov ako sú škodcovia a rôzne choroby (Petr *et al.*, 1988).

Hmotnosť zrn je ovplyvnená geneticky ale aj prostredím. Rast obiliek predstavuje záverečný časový úsek tvorby výnosu zrna, obilka rastie po dobu vytvárania nových asimilátov alebo do vyčerpania zásobných asimilátov. Zrná z nižšej strednej časti klasu sú ťažšie a sú zastúpené v najväčšom počte (Lipavský, 2000). Čím dlhšia je perióda kvitnutia, tým je väčšia možnosť, že budú oplodnené všetky kvietky, a tým sa zvýši počet zrn v klase, najmä pri nízkych teplotách. Rast zrna a jeho hmotnosť závisí od viacerých faktorov, ktoré ovplyvňujú celkovú sušinu rastliny, a teda stav asimilačného aparátu klasu, listov a stebľa, dostatok vlhky, svetla a minerálnych živín. Nepriaznivý vplyv na

hmotnosť zŕn majú vysoké teploty, ktoré spôsobujú rýchlu senescenciu listovej plochy a skracujú dĺžku fungovania listu. Hmotnosť obiliek sa udáva ako hmotnosť tisíc zŕn (HTZ) v gramoch, u pšenice je to okolo 30-50g (Diviš *et al.*, 2000).

2.1.3 Kvalita pšenice

Výživná a technologická kvalita pšenice je daná predovšetkým obsahom bielkovín a sacharidov. Potravinárska pšenica tvorí v našej spotrebe potravín 35% energetickej potreby a 30% z potreby bielkovín. Obsah zásobných látok determinuje hmotnosť sušiny zrna a tým určuje hodnotu HTZ a výšku úrody. Podiel škrobu na hmotnosti zrna pšenice je v rozmedzí 65-75%, naproti tomu obsah bielkovín iba 10-12% (Zálešáková *et al.*, 2004). Procesy zodpovedné za syntézu škrobu v najväčšej miere rozhodujú o úrode zrna. Medzi obsahom škrobu a bielkovín platí negatívna korelácia, keďže syntéza škrobu aj bielkovín sa uskutočňuje zo spoločných fotosyntézou vytvorených primárnych produktov. Fyziologicko-biochemické zákonitosti tvorby škrobu a bielkovín a ich využitie vo forme zásobných látok v endosperme zrna sú regulované predovšetkým endogénnymi geneticky programovanými procesmi ontogenézy, ktoré sú tiež modulované aj klimatickými podmienkami a pestovateľskými praktikami. Šľachtiteľ môže cielene ovplyvňovať tvorbu zásobných látok a tým i hospodársku úrodu a jej kvalitu. Odrody pšenice s nízkym obsahom bielkovín a mäkkou textúrou endospermu (tzv. mäkké pšenice) majú obecné vysoký obsah škrobu, naopak tvrdé pšenice s vysokým obsahom bielkovín majú obsah škrobu do 65% (Rückschloss *et al.*, 2015).

Bielkovinový komplex

Dominantnú úlohu v technologickej kvalite zrna pšenice z pohľadu chemického zloženia v prípade potravinárskych výrobkov zohráva bielkovinový komplex. Tento komplex je zložený z cytoplazmatických bielkovín (frakcia albumínov a globulínov) a typicky zásobných bielkovín (frakcia prolaminov a glutelínov). Cytoplazmatické bielkoviny sú prednostne umiestnené v zárodku, sú katalyticky aktívne, ľahko rozpustné vo fyziologických roztokoch a dobre stráviteľné (Michalík a Bauerová, 2016). Zásobné bielkoviny predstavujú prevažnú časť bielkovinového komplexu, dosahujú približne 70-75% celkového obsahu bielkovín v zrne pšenice (Bietz a Wall, 1972). Sú lokalizované v endosperme a sú schopné pri zmiešaní s vodou vytvárať charakteristickú molekulovú štruktúru pšeničného lepku, čím výrazným spôsobom ovplyvňujú výslednú kvalitu pekárenských výrobkov, napríklad objem chleba či spracovateľnosť cesta (Michalík

a Bauerová, 2016). Obsah bielkovín nie je genotypovou vlastnosťou, je ovplyvnený najmä zmenou klímy, použitou agrotechnikou, zásobami minerálnych živín v pôde a to najmä dusíkom a draslíkom. Pšenica so zvýšeným obsahom bielkovín v dôsledku doplňujúceho dusíkatého hnojenia v zrnách sa využíva na výrobu cestovín, pretože má pevný, krátky a tuhý lepok a zrno tvrdé a sklovité (Rückschloss *et al.*, 2015).

Sacharidy

Pšeničné zrno obsahuje približne 80% sacharidov z celkovej hmotnosti suchého zrna (Zálešáková *et al.*, 2004). Dominantnú časť pšeničného zrna predstavujú polysacharidy, z nich najväčšie zastúpenie má škrob. Medzi neškrobové polysacharidy nachádzajúce sa vo väčšom množstve v zrne radíme celulózu, v menšom množstve sú to hemicelulóza, β -glukány a pentozány. Celulóza a polysacharidy s lineárnymi glukózovými reťazcami sú lokalizované najmä v obalových vrstvách zrna (30%), naopak škrob sa nachádza v endosperme zrn (Girhammar a Nair, 1992).

2.2 Škrob (*amylum*)

Škrob patrí z ekonomického, fyziologického a technologického hľadiska k najvýznamnejším polysacharidom. Je najdôležitejším produktom metabolizmu rastlín a funguje ako zdroj sacharidov pri klíčení semien alebo vývoji listových pletív. V rastlinnom materiáli sa škrob hromadí ako rezervná látka v podobe zrn. V najväčšom množstve ho obsahujú predovšetkým semená (kukurica, pšenica, ryža), hľuzy a korene (zemiaky, maniok) rastlín. Na priemyselné získavanie škrobu sa ako surovina používajú práve tieto časti. Ročne sa vo svete vyprodukuje cca 70 miliónov ton škrobu (<http://www.starch.dk/ISI/market/index.asp>). V posledných rokoch vzrástla európska produkcia pšeničného škrobu až o 25% (<http://www.starch.eu/european-starch-industry/>). Celosvetovo je najvýznamnejším zdrojom škrobu kukurica (50%), pšenica (25%) a zemiaky (25%) (<http://www.starch.dk/ISI/market/index.asp>). Podľa toho z akých surovín je škrob vyrobený sa rozdeľuje na škrob kukuričný, pšeničný, ryžový, zemiakový a iné. Medzi hlavné dôvody využitia pšenice k produkcii škrobu patria priaznivé klimatické podmienky pre pestovanie pšenice, vysoké výnosové úrovne odrôd pšenice a intenzita jej pestovania (Burrell, 2002). Ďalšou výhodou je spracovanie pšenice na škrob kde sa jedná o tzv. „quasi“ bezodpadovú technológiu (Slattery *et al.*, 2000).

2.2.1 Využitie škrobu

Škrob ako zdroj chemickej energie využívajú živočíchy, vyššie rastliny aj mikroorganizmy. Predstavuje hlavnú energetickú zložku ľudskej potravy, poskytuje okolo 35% denného príjmu kalórií a významne ovplyvňuje funkčné vlastnosti potravín ako napríklad zahusťovanie potravín a úprava ich textúry (Eliasson, 2004). Škrob je využívaný v mnohých priemyslových odvetviach, kde jeho spotreba ročne narastá o 6,5%. Využíva sa v papiernickom, textilnom, farmaceutickom priemysle alebo pri chemických a biochemických aplikáciách (Tab.1) (Burrell, 2002).

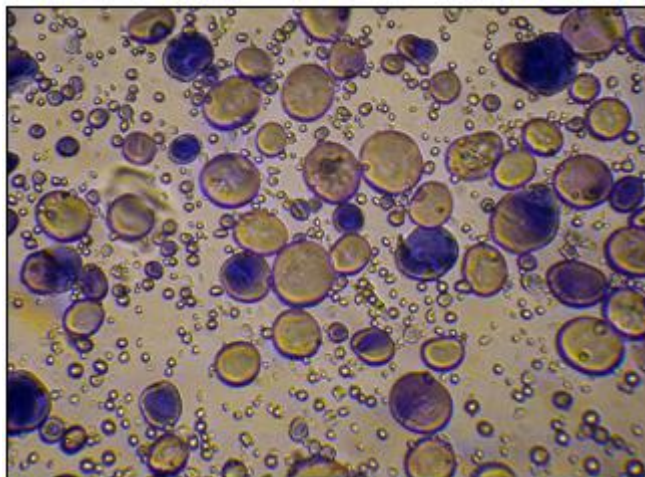
Tabuľka č.1.: Príklady využitia škrobu v rôznych odvetviach priemyslu

Jedlá	majonéza	cukrovinky	detské jedlo	chlieb	mäsové jedlá
Nápoje	sirupy	nealko nápoje			
Farmaceutický priemysel	lieky	púder			
Stavebníctvo	sadrová doska	minerálne vlákna	betón	cement	
Poľnohospodárstvo	hnojivo	osemenie			
Textilný priemysel	vlna	tkaniny	priadze		
Papiernický priemysel	kartón	lepenka	papier		
Ostatné	lepidlá	olej	úprava vody		

2.2.2 Štruktúra škrobových zŕn

Škrob sa vyskytuje v podobe diskretných častíc, nazývaných škrobové zrná, ktoré sa ukladajú v zásobných orgánoch rastlín (Obr.3). Škrobové zrná sú unikátne pre rastlinný druh z ktorého pochádzajú, líšia sa vonkajším vzhľadom, chemickou štruktúrou, vlastnosťami a distribúciou veľkostí častíc (Šárka *et al.*, 2013). Ich tvar môže byť pravidelný (gulovitý, vajcovitý a hranatý) alebo úplne nepravidelný. Škrobové zrná sa v pšenici vytvárajú počas zrenia obilky. Usporiadanie škrobového zrna je z 30% obraz kryštálovej mriežky, zvyšok je neusporiadaný. V pšenici existujú dva druhy škrobových zŕn, prvú skupinu tvoria zrná s priemerom menším ako 10 μm a druhú zrná s priemerom 10-20 μm (Dudáš, 1981). Škrobové zrná v priebehu rastu zaplňajú amyloplasty, bunkové organely, ktoré zaradujeme medzi plastidy, neobsahujúce žiadne pigmenty, nazývané tiež leukoplasty. Zrná sa vyskytujú vždy voľné, nie sú fyzikálne ani chemicky viazané na inú

zložku, čo umožňuje ich pomerne jednoduché získanie (Šícho, 1969). Počas hydrolýzy pomocou amyláz, najmä α - amylázy, zo škrobu vzniká glukóza, maltóza a dextríny, zložené z niekoľkých desiatok glukózových jednotiek (Yu *et al.*, 2015). Doba hydrolýzy závisí vo veľkej miere od veľkosti škrobových zŕn, pričom malé škrobové zrná majú dobu štiepenia najkratšiu (Dudáš, 1981).



Obr.3 Škrobové zrná pšenice

Zobrazenie štruktúry pšeničných škrobových zŕn vo svetelnom mikroskope, ktoré sú farbené Lugolovým roztokom (prevzaté z Kiselov, 2006)

2.2.3 Chemické zloženie škrobu

Hlavné zložky škrobu predstavujú dva α -D-glukány - amylóza a amylopektín (Obr.4). Tieto dve molekuly sú prepojené tak, že vytvárajú semi-kryštalické škrobové zrno (Kainuma, 1988). Škrobové zrná okrem amylózy a amylopektínu obsahujú v malom množstve lipidy (0,9%), proteíny (0,4%) a vodu (25-35%) (Acker a Brauner-Glaesner, 1982). Ďalej je významná prítomnosť kyseliny fosforečnej, ktorej obsah sa pohybuje v rozmedzí 0,08 - 0,25% v sušine (Davídek *et al.*, 1969). Škroby v koreňoch a hľuzách obsahujú menej lipidov a bielkovín v porovnaní s obilnými škrobmi. Množstvo lipidov a bielkovín v škrobových zrnách nemá významnejší účinok na vlastnosti škrobu, výrazne vplýva len na chuťový profil škrobu. U pšenice prítomnosť proteínov v škrobových zrnách určuje tvrdosť pšenice. Proteíny škrobových zŕn delíme do dvoch skupín na základe ich extrakcie zo zŕn. Prvou skupinou sú povrchové proteíny, ktoré môžu byť extrahované pomocou roztokov solí, zatiaľ čo druhá skupina proteínov sa nachádza vo vnútri zŕn a vyžaduje extrakciu použitím alkalického roztoku alebo silného detergentu (Rayas-Duarte *et al.*, 1995). Škrobové lipidy nachádzajúce sa v zrnách sa nazývajú

lysofosfolipidy, a ich štruktúra im umožňuje vytvárať veľmi stabilný komplex s amylózou (Acker a Brauner-Glaesner, 1982).

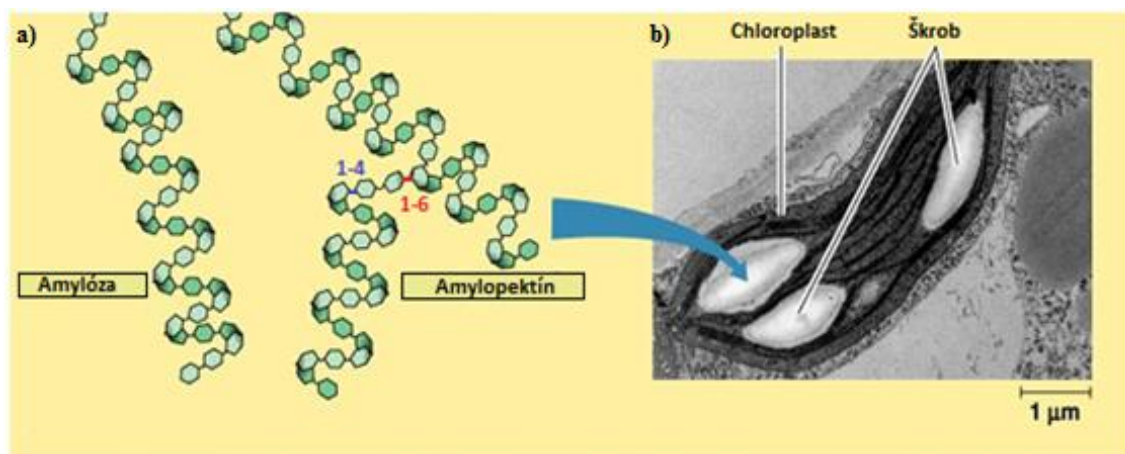
2.2.3.1 Amylopektín

Amylopektín je hlavný glukánový polymér škrobu, ktorý zodpovedá za pravidelnú štruktúru škrobového zrna. Nachádza sa najmä vo vonkajších častiach škrobových zŕn (Davídek, 1969). V štruktúre amylopektínu sa striedajú amorfné - nepriehľadné a semikryštalické - priehľadné zóny. V molekule vetveného amylopektínu sú D- glukopyranózové jednotky väčšinou viazané α -D(1 \rightarrow 4) glykozidovými väzbami ale v menšej miere okolo 4-5% tu pôsobia aj α -D(1 \rightarrow 6) glykozidové väzby, ktoré pripájajú bočné reťazce (Šárka *et al.*, 2013). α -D(1 \rightarrow 6) glykozidované väzby sú v amylopektíne kratšie ako v amylóze. Vetvenie amylopektínu nie je pravidelné a vetvy sa môžu ďalej rozvetvovať (Meyer *et al.*, 1947). Priemerne každý reťazec amylopektínu obsahuje 25-30 glukózových podjednotiek (Mikulíková *et al.*, 2008). Polymeračný stupeň (DP) amylopektínu je 100 000-1000 000 glukózových podjednotiek a molekulová hmotnosť 10^7 - 10^8 (Buleón *et al.*, 1998). Stupeň hydrolýzy amylopektínu závisí na druhu použitých amylolytických enzýmov. Pri hydrolýze z amylopektínu vznikajú nízkomolekulové dextríny, maltóza a isomaltóza (Šicho, 1969). Škroby s vyšším podiel amylopektínu majú vyšší stupeň hydrolýzy oproti škrobom s normálnym alebo vyšším podielom amylózy (Anker-Nilssen *et al.*, 2006). Amylopektín je nerozpustný vo vode a dáva viskózne, stále koloidné roztoky. Vysoký obsah amylopektínu v škrobe je spojený s vyššou viskozitou a stabilitou voči teplote a pH (Dudáš, 1981).

2.2.3.2 Amylóza

Amylóza je minoritná zložka škrobu, ktorá sa vo vode rozpúšťa na číry, málo viskózný roztok, ktorý zahrievaním nemazovie (Davídek, 1969). Štruktúra amylózy predstavuje neprerušovanú závitnicu, kde jeden závit zodpovedá šiestim molekulám glukózy (Mua a Jackson, 1997). Amylóza je prevažne lineárny, dlhý reťazec, v ktorom sú jednotlivé D-glukopyranósové jednotky navzájom viazané α (1 \rightarrow 4) glykozidovými väzbami (Morrison a Karkalas, 1990). U niektorých rastlinných druhov amylóza obsahuje v malom množstve aj α (1 \rightarrow 6) glykozidové väzby, približne 0,5%, čo vedie k veľmi nízkej miere vetvenia, s frekvenciou okolo 0,2-0,6% (O'Sullivan and Perez, 1999). Menšie nerozvetvené glukánové polyméry amylózy majú možnosť zapleť sa, tvoriť dvojvláknovú helikálnu štruktúru pomocou domén, v rámci ktorých sú segmenty vlákna

v blízkom kontakte (Leloup *et al.*, 1992). DP amyλόzy škrobu v pšenici je 1000-6000 glukózových podjednotiek a jej molekulová hmotnosť je okolo 10^5 - 10^6 (Mua a Jackson, 1997). Amyλόza sa pôsobením amylyolytických enzýmov amylyáz štiepi cez maltózu na glukózu, pričom jej molekulová hmotnosť stále klesá a vznikajú nízkomolekulové dextríny (Šícho, 1969).



Obr.4 Štruktúra amyλόzy a amylopektínu

a) Porovnanie štruktúry amyλόzy a amylopektínu, zobrazenie α -D(1 \rightarrow 4) a α -D(1 \rightarrow 6) glykozidových väzieb v amylopektíne b) Zobrazenie škrobových zrn v elektrónovom mikroskope, ktoré sa nachádzajú v chloroplaste (upravené podľa http://www.majordifferen ces.com/2013/02/difference-between-amylose-and_17.html#.WGorUdLhDIU)

2.2.4 Škroby so zvýšeným podielom amyλόzy

Väčšina natívnych škrobov obsahuje 20-30% amyλόzy a 70-80% amylopektínu (Preiss, 1991). Pomer amyλόzy a amylopektínu sa u škrobov rôzneho pôvodu líši a ovplyvňuje radu fyzikálnych vlastností. Prejavuje sa to najmä v rozdielnej rozpustnosti, napučíavaní, retrogradácii, stráviteľnosti a má určujúci význam z hľadiska využitia škrobu. Niektoré modifikované genotypy kukurice, jačmeňa a pšenice majú zvýšený obsah amyλόzy až na 80% (Richardson *et al.*, 2000), existujú však aj druhy s nízkym obsahom amyλόzy, napríklad „waxy“ pšenice, kde obsah amylopektínu dosahuje 99% (Nakamura *et al.*, 1995). Škroby s vysokým podielom amylopektínu sa využívajú v potravinárskom priemysle na výrobu piva, cestovín či mrazených potravinových výrobkov. Sú vhodné tiež na výrobu papiera a adhezív. Zmenou pomeru amyλόzy a amylopektínu v škrabe možno meniť aj textúru chuťoviek, v prípade zvýšeného objemu amylopektínu sa zväčšuje objem produktu a jeho krehkosť.

Škroby, v ktorých je vyšší obsah amylózy sú široko používané v potravinárstve ale aj v iných priemyselných odvetviach. Využívajú sa na výrobu funkčných potravín na báze rezistentného škrobu, v cukrárstve, kde zaručujú pevnosť cukríkov, a tiež na výrobu vyprášaných chuťoviek alebo cestovín, kde sa vďaka nim predĺžila doba varenia (Richardson *et al.*, 2000). Zloženie škrobu v múke ovplyvňuje kvalitu potravinárskych výrobkov, najmä ich textúru. Múky z pšenice s vysokým obsahom amylózy majú oproti múke z bežnej pšenice vyššiu väznosť vody, horšiu pekárenskú kvalitu a vyznačujú sa vyšším obsahom bielkovín a lipidov. Zvýšené množstvo amylózy podporuje zachovanie tvaru, pevnosti cesta a chrumkavosť chuťoviek (Rückschloss *et al.*, 2015). Škroby s vyšším obsahom amylózy sa tiež využívajú na výrobu fotografických filmov (Mikulíková *et al.*, 2008). Vďaka zvýšeniu podielu amylózy v škrobe môžu obilné potravinárske výrobky obsahovať väčšie množstvo funkčnej vlákniny bez zmeny výživných vlastností. Sú to napríklad cereálie, koláče či sušienky, ktorým poskytuje lepší vzhľad, textúru a pocit v ústach než tradičné zdroje vlákniny (Richardson *et al.*, 2000).

Škroby so zvýšeným podielom amylózy predstavujú jeden z typov rezistentných škrobov. Tento typ rezistentného škrobu (RS) má podobné fyziologické vlastnosti ako vláknina, a teda je odolný voči procesom trávenia (Akerberg *et al.*, 1998). Enzymatická odolnosť je spôsobená vďaka tvorbe komplexu amylózy s lipidmi (väčšinou voľné mastné kyseliny a fosfolipidy) (Holm *et al.*, 1983). Lipidy sa nachádzajú najmä na povrchu škrobového zrna, kde obmedzujú kontakt enzýmu so substrátom (Tester, 2006). Enzymatická odolnosť sa zvyšuje s rastúcim stupňom polymerizácie amylózy, dĺžkou reťazca mastných kyselín a teplotou (Singh *et al.*, 2001). Komplex amylózy s lipidmi má veľa technologických vlastností, ako je napríklad zníženie rozpustnosti amylózy, zvýšenie teploty tvorby želatíny, zníženie lepivosti, zníženie zmrazovacej a rozmrazovacej stability (Eliasson *et al.*, 1981). Ďalšou príčinou odolnosti RS voči procesom trávenia je aj miesto koncentrácie amylózy, ktorá sa nachádza najmä po obvode škrobových zŕn a interakciou s amylopektínom tvorí pevnú škrupinu (Debet a Gidley, 2007). Okrem toho glukózové reťazce amylózy sú navzájom viac spojené vodíkovými väzbami oproti amylopektínu, čím je amylóza menej dostupnejšia pre hydrolýzu (Singh *et al.*, 2001). Povrchové vlastnosti škrobových zŕn tiež ovplyvňujú ich enzymatické trávenie, škroby so zvýšeným podielom amylózy majú hladší povrch, menej jám a pórov, čím sú viac odolné voči amyláze (Tester, 2006).

Rezistentný škrob má s vlákninou okrem odolnosti voči hydrolýze tráviacimi enzýmami a schopnosti prechádzať do hrubého čreva aj veľa ďalších rovnakých priaznivých účinkov na organizmus, ako napríklad:

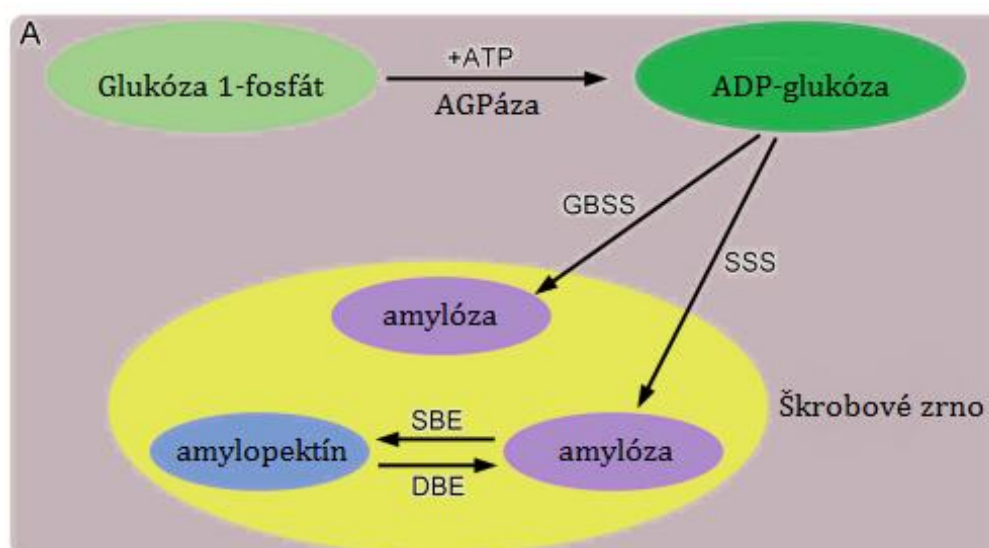
- urýchľuje prechod trávenej potravy, vďaka čomu je stena čreva kratšie vystavená pôsobeniu prípadných škodlivých zložiek potravy a splodín látkového metabolizmu, čím sa znižuje výskyt zhubných nádorov hrubého čreva, prsníka a prostaty
- produkuje mastné kyseliny s krátkym reťazcom, ktoré prispievajú k normálnej funkcii hrubého čreva, znižujú pH čriev, stimulujú prietok krvi v črevách (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010)
- znižuje hladinu cholesterolu v krvi
- pomáha bojovať proti obezite, má hlavné využitie pri redukčných diétach, síce dáva organizmu menej energie ale vďaka schopnosti viazať vodu zvyšuje pocit nasýtenia
- zabezpečuje zvýšené vstrebávanie minerálnych látok, najmä vápnika a železa (Nugent, 2005)
- znižuje hladinu glukózy v krvi, je vhodný pri cukrovke typu II. (Schulze *et al.*, 2004)
- je účinným prostriedkom pre ľudí trpiacich na zápchu, hemoroidy či žlčníkové ťažkosti
- znižuje riziko vzniku žlčových kameňov a nádorov v hrubom čreve
- znižuje riziko vstrebávania rôznych látok z čreva a tým znižuje riziko prívodu nežiadúcich látok, na druhej strane to však môže ovplyvniť aj vstrebávanie látok dôležitých pre organizmus
- pôsobí ako prebiotikum, pretože tvorí časť živnej pôdy pre probiotické mikroorganizmy- bifidogénne baktérie, ktoré priaznivo ovplyvňujú imunitu organizmu a potláčajú vznikajúce problémy po užívaní antibiotík (Anderson *et al.*, 2009; Higgins, 2004).

Zvýšené množstvo amylozy robí škrob odolným proti tráveniu amylázami, najmä α - amylázou a tým znižuje glykemický index (GI). Glykemický index je číselný index, ktorý zaraďuje sacharidy na základe rýchlosti glykemickej odozvy, teda ich premeny na glukózu v ľudskom tele. GI používa stupnicu od 0 do 100, vyššie hodnoty sú zobrazené u potravín, ktoré najviac spôsobujú rýchly vzostup hladiny cukru do krvi. Čistá glukóza

slúži ako referenčný bod a má hodnotu na glykemickom indexe 100. Potraviny s nízkym GI sa môžu podieľať na znížení rizika srdcových a cievnych chorôb ale aj niektorých nádorov, napríklad čriev a pľús. Pravidelné konzumovanie sacharidov s nízkym GI dáva dlhší pocit sýtosti, minimalizuje šance mať nadváhu alebo obezitu a znižuje riziko vzniku cukrovky (Jenkins *et al.*, 2002).

2.2.5 Biosyntéza škrobu

Škrob sa v obilninách syntetizuje v endosperme semien vo forme zásobného škrobu alebo v chloroplastoch počas fotosyntézy vo forme prechodného škrobu (Mikulíková *et al.*, 2008). Biosyntézu škrobu katalyzuje 14 rôznych enzýmov, medzi najdôležitejšie patria: ADP glukóza-pyrofosforyláza (AGPáza), škrobová syntáza, enzým vetviaci škrob a enzým devetviaci škrob (Obr.5) (Nelson a Pan, 1995). Enzým AGPáza je zodpovedný za syntézu polymérneho škrobu, škrobová syntáza predlžuje reťazce a enzým vetviaci škrob sa podieľa na vetvení reťazcov do klastrovej štruktúry (Mikulíková *et al.*, 2008).



Obr.5 Biosyntéza škrobu

Prvý krok je tvorba ADP-glukózy z ATP a Glc-1-fosfátu pomocou ADP-glukóza pyrofosforyláza (AGPáza). Škrobová syntáza viazaná na zrná (GBSS) a škrobové syntázy (SSs) sa podieľajú na adícii glukosylovej skupiny z ADP-Glc na jeden z koncov α -1,4 alebo α -1,6 väzbového glukánu. Enzým vetviaci škrob (SBE) je zodpovedný za vetvenie reťazcov do klastrovej štruktúry a enzým devetviaci škrob (DBE) sa spolu s amylázami podieľa na degradácii škrobu na jednoduchšie monosacharidy (upravené podľa Yu *et al.*, 2015)

2.2.5.1 Škrobová syntáza

Pšeničný endosperm má popísané 4 triedy škrobovej syntázy (SS): škrobová syntáza viazaná na zrná (GBSS), škrobová syntáza I (SSI), II (SSII) a III (SSIII), ktoré sú rozdielne rozdelené v pšeničnom endosperme. GBSS je v obilninách podmienená génmi *waxy*, je zodpovedná za syntézu $\alpha(1-4)$ glukánových väzieb amyulózy a podieľa sa na predlžovaní amylopektínového reťazca (Denyer *et al.*, 2001; Sestili *et al.*, 2009). SSI, SSII a SSIII syntázy sú zapojené v amylopektínovej syntéze. Katalyzujú elongáciu $\alpha(1-4)$ a $\alpha(1-6)$ glukánových väzieb prenosom glukózového zvyšku z ADP-Glukózy na koniec existujúceho $\alpha(1-4)$, alebo $\alpha(1-6)$ glukánu (Shimbata *et al.*, 2005).

Škrobová syntáza II

V jednoklíčnolistových rastlinách sa nachádzajú dve izoformy SSII, nazývané SSIIa a SSIIb, ktoré vznikli pravdepodobne génovou duplikáciou. V obilninách SSIIb enzým nebol popísaný na rozdiel od SSIIa, ktorej aktivita bola definovaná u mnohých druhoch, vrátane pšenice (Yamamori *et al.*, 2000). Syntáza škrobu II, tiež známa ako proteín škrobových zŕn 1 (SGP-1), zohráva významnú úlohu pri syntéze škrobu v endosperme. Vplýva na množstvo a zloženie škrobu a je zapojená do syntézy stredných reťazcov amylopektínu (Nakamura *et al.*, 1995). Enzým SSII je takisto kľúčový enzým vo vývoji škrobových zŕn v pšenici, má vysoký vplyv na ich hmotnosť (Konik-Rose *et al.*, 2007). Tri SGP-1 proteíny, SGP-A1, B1 a D1 o molekulovej hmotnosti 115, 100 a 108 kDa, sú produkované tromi homoeológnymi SSII génmi, SSII-A, B, a D (Li *et al.*, 1999). SGP-A1, B1, D1 sú kódované lokusmi, ktoré sa nachádzajú na 7AS, 7BS a 7DS chromozóme (Yamamori a Endo, 1996; Shimbata *et al.*, 2005). Štruktúra génu a primárna sekvencia SSII sú vysoko konzervované v jednoklíčnolistových aj v dvojklíčnolistových rastlinách, čo dokazuje, že gén sa vyvinul pred oddelením týchto rastlín (Li *et al.*, 2003). Neprítomnosť SSII v rastlinných druhoch vedie k zvýšenej frekvencii krátkych reťazcov glukánu v amylopektínu, a v konečnom dôsledku vo väčšine prípadoch k zvýšeniu množstva amyulózy (Zhang *et al.*, 2005). Mutanty pšenice, ktoré neobsahujú enzým SSIIa, môžu obsahovať približne až 1,3-krát viac amyulózy oproti divokému typu pšenice. Medzi znaky týchto mutantov takisto patrí zníženie celkového obsahu škrobu, modifikácia distribúcie dĺžky amylopektínového reťazca, zmena morfológie škrobových zŕn či znížený stupeň kryštalizácie (Ball a Morell, 2003). Napriek tomu, že SSII má menší vplyv na celkovú aktivitu škrobovej syntázy, strata tejto izoformy má dramatický dopad ako na zloženie tak aj na množstvo škrobu v rastlinách (Li *et al.*, 1999).

2.3 Variabilita genotypu rastlín

Mutácie predstavujú hlavný zdroj variability genotypu rastlín a tým nových génov. Mutácie môžu ovplyvniť genetický materiál v rozdielnom rozsahu. Fenotypový efekt mutácie nemusí byť nutne úmerný jej rozsahu. Zmena jediného nukleotidu môže v závislosti na kontexte genómu ovplyvniť fenotypový prejav drastickejšie než zmnoženie celej chromozómovej sady. Podľa okolností vzniku mutácie delíme na spontánne, ktoré vznikli bez vplyvu z vonkajšieho prostredia a indukované, vyvolané vonkajšími mutagénnymi faktory (Gömöry, 2014). Podľa úrovne, na ktorej genetickú informáciu ovplyvňujú delíme mutácie na genomické (sú najrozsiahlejší typ mutácií, týkajúci sa celého genómu, postihujú celé chromozómy resp. celé chromozómové sady, menia ich počet a tým zásadne menia veľkosť genómu), chromozómové (sú štrukturálne zmeny na úrovni jednotlivých chromozómov, postihujú väčší úsek chromozómu, spravidla obsahujúci niekoľko génov) a génové (Čizmárová *et al.*, 2013).

2.3.1 Génové mutácie

Génové mutácie prebiehajú na úrovni vlákna DNA. Zasahujú jeden alebo niekoľko nukleotidov v rámci jedného génu a môžu meniť prejav génu. Génové mutácie môžu vzniknúť v kódujúcich aj nekódujúcich oblastiach. Podľa mechanizmu vzniku delíme génové mutácie na inzercie, delécie a substitúcie.

Inzercia znamená včlenenie jedného alebo viacerých nukleotidových párov do sekvencie DNA. Pokiaľ je zaradený taký počet nukleotidov, ktorý nie je násobkom čísla 3 ($3n$) dochádza k posunu čítacieho rámca (frame shift) a následne k syntetizovaniu nového odlišného polypeptidu alebo dokonca k predčasnému ukončeniu proteosyntézy vznikom terminačného kodónu. Zaradenie $3n$ nukleotidov, nenaruší pôvodný čítací rámec ale dochádza k predlžovaniu polypeptidového reťazca o n aminokyselín podľa inzertovanej sekvencii.

Delécia sekvencie DNA znamená stratu jedného alebo viacerých nukleotidov, resp. rozsiahlejšieho úseku génu. Účinok je podobný ako u adícii, tiež môže dôjsť k posunu čítacieho rámca ale namiesto predĺženia polypeptidového reťazca dochádza k jeho skracovaniu.

Substitúcia znamená zámenu len jedného nukleotidu za iný. Takéto mutácie sa rozlišujú na tranzície - zámena purínovej bázy za purínovú, teda $A \leftrightarrow G$, alebo pyrimidínovej za pyrimidínovú, teda $C \leftrightarrow T$ a transverzie - zámena purínovej bázy za

pyrimidínovú alebo naopak. Následky substitúcie môžu byť rôzne podľa toho na akej pozícii kodónu k substitúcii došlo.

Podľa toho ako mutácie ovplyvňujú proteosyntézu rozdeľujeme génové mutácie na niekoľko typov.

„Silent“ mutácie sú mutácie, ktoré využívajú degeneráciu genetického kódu a teda, že niektoré aminokyseliny sú kódované rôznymi tripletmi, a preto aj napriek mutácii dochádza k zaradeniu rovnakej aminokyseliny. Tieto mutácie sú väčšinou spôsobené substitúciou na tretej pozícii kodónu. V tomto prípade nevzniká mutácia, ale hovoríme o tichom (silent) variante zmeny sekvencie DNA (nemeniaci polypeptidový reťazec).

„Missense“ mutácie predstavujú mutácie, ktoré menia zmysel polypeptidového reťazca. Sú spôsobené takými substitúciami, ktoré spôsobujú zaradenie odlišnej aminokyseliny pri proteosyntéze. V tomto prípade hovoríme o variante meniacom zmysel (missense) informácie v kódujúcej sekvencii DNA. Niektoré aminokyseliny majú podobné vlastnosti, preto zámena môže byť konzervatívna. Ak sa pôvodná aminokyselina zásadne chemicky odlišuje od aminokyseliny u mutovanej alely, môže sa zmeniť terciárna štruktúra proteínu, jeho afinita k lipidovým membránam, v prípade enzýmu optimum jeho fungovania (teplota, pH), atď. Mutovaný polypeptid môže nadobudnúť úplne novú biologickú funkciu alebo dokonca stratí schopnosť plniť akúkoľvek funkciu (Gömöry, 2014).

„Nonsense“ mutácie sú mutácie, ktoré zapríčiňujú vznik predčasného terminačného kodónu v sekvencii DNA. V takomto prípade hovoríme o variante bez zmyslu (nonsense), ktorého výsledkom je skrátenie polypeptidového reťazca. Syntéza takéhoto polypeptidu potom nie je dokončená a výsledkom je nefunkčný proteín (Čizmárová *et al.*, 2013).

Mutácie sú plne využívané v šľachtení, s cieľom tvorby nových odrôd rastlín so zlepšenými kvalitatívnymi a kvantitatívnymi vlastnosťami, s odolnosťou voči nepriaznivým abiotickým i biotickým faktorom, s veľkou mierou adaptability k meniacim sa podmienkam prostredia. V poslednom období sa šľachtitelia zameriavajú hlavne na kvalitatívne vlastnosti, ktoré reprezentujú predovšetkým obsahové látky s biologickým alebo funkčným významom. Medzi takéto látky patrí aj vláknina, ktorá je základom pre tvorbu tzv. funkčných potravín. Mutáciou SSII génu, ktorý je zodpovedný za syntézu amylopektínu, dochádza ku zvýšeniu množstva amylozy v pšenici, čo má za následok

zníženie glykemického indexu a zvýšenie funkčnej vlákniny v primárnej potrave. Na základe požiadavky od šľachtiteľov preto boli osekvenované diverzné vzorky pre určenie vhodnej oblasti s diverzitou v sekvencii SSII génu a následne prebehlo zistenie miery diverzity SSII génu v šľachtiteľských zdrojoch.

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Na sekvenovanie génu škrobovej syntázy II boli použité dve populácie pšenice siatej (*Triticum aestivum ssp. aestivum*). Prvá testovacia populácia predstavovala vzorku 16 diverzných línií pre určenie vhodnej oblasti s diverzitou v sekvencii SSII-A génu (Tab.2).

Tabuľka č.2.: Zoznam diverzných línií prvej testovacej populácie

ECN	Druh	Názov	Štát pôvodu
01C0107242	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	124999	SYR
01C0100841	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Ungaro	ARG
01C0106554	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Akinci-84	AZE
01C0204685	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Marmara 86	TUR
01C0101007	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Malakof	USA
01C0101096	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Ilola	FIN
01C0101212	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Cantore	ITA
01C0101276	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Suwon	PRK
01C0101204	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Aniversario	ARG
01C0100837	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Klien Cometta	ARG
01C0100887	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Egyptska	EGY
01C0101010	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Sg 603 (Beijing)	CHN
01C0101479	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Akakomugi	JPN
01C0101160	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Puuk	EST
01C0105013	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Kangon 20	ARM
01C0101031	<i>Triticum aestivum ssp. aestivum</i>	Bankuti 1201	HUN

Prvá testovacia populácia bola doplnená líniami *Triticum militinae* (semená poskytla Dr. Kadri Järve, TUT Tallin, Estónsko) a *Triticum durum* Langdon (semená poskytol Prof. Jorge Dubcovsky, UC Davis, USA). Druhá populácia predstavovala 384 jedincov kultúrnych pšeníc pre zistenie miery diverzity SSII-A génu v šľachtiteľských zdrojoch. DNA a semená oboch populácií druhu pšenice siatej boli poskytnuté Ing. Tiborom Sedláčkom (Selgen a.s., ČR). Ako kontrola pre overenie špecificity navrhnutých

primerov bola použitá DNA pšenice siatej kultivaru Chinese Spring (semená poskytol Prof. Pierre Sourdille, INRA, Francúzsko).

3.1.2 Chemikálie

- 10% Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA)
- 3- methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva, Nemecko)
- 40% Akrylamid – N, N'- methylenbisakrylamid 19:1, (Fluka Analytical, USA)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol – nedenaturovaný (Lach-ner, ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Exonukleáza I (Fermentas, Kanada)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-ner, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-ner, ČR)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)
- Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxodisulfát amónny (APS) (Sigma-Aldrich, USA)
- Primery (Eurofins Genomics, Nemecko)
- *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, USA)
- Termosenzitivna alkalická fosfatáza (FastAP) (Fermentas, Kanada)
- Tris bázy (Sigma - Aldrich, USA)
- Veľkostný marker, Gene Ruler™100 bp, Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada)

3.1.3 Pufry a roztoky

- 5x Cresol red (vodný roztok)
 - 0,05% Cresol red
 - 7,5% sacharózy
- 5x TBE (vodný roztok)
 - 10 mM EDTA
 - 450 mM kyseliny boritej
 - 450 mM Tris bázy
 - pH 8,0

- 10x PCR pufo
 - 1% Triton X- 100
 - 100 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 - 15 mM MgCl₂
 - 500 mM KCl
 - pH 8,8

3.1.4 Komerčné kity

- Bigdye[®] Terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, Nemecko)
- Paramagnetické guľičky Agencourt CleanSeq[®] (Beckman Coulter, USA)

3.1.5 Prístrojové vybavenie

- 3730xl DNA Analyzér (Applied Biosystems, USA)
- Centrifúga IEC Micromax RF, (Thermo Scientific, USA)
- Chladená centrifúga Juan CR4i (Thermo Scientific, USA)
- Fluorometer Modulus (Turner BioSystems, USA)
- Homogenizačný oscilačný mlyn MM301 (Retsch, Nemecko)
- Horizontálna elektroforetická aparátúra Owl A6 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- lyofilizátor Heto Drywinner (Trigon-plus s.r.o.,ČR) a vákuová pumpa (Vacuubrand GMBH + CO KG, Nemecko)
- Semimikro váha, SBC 21 (Scaltec, Nemecko)
- Termocyklér C-1000 Touch[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- Termostat TCH 100 (Laboratorne prístroje Praha, ČR)
- Trepačka Vortex (Heidolph Instruments, Nemecko)
- UV Transluminátor InGenius BioImaging (Syngene, UK)
- Vodný kúpeľ Grant SUB 6 (Grant Instruments, UK)
- Vertikálna elektroforetická aparátúra Dual Adjustable Mega-Gel Kit C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific, USA)
- Zdroj napätia pre elektroforézu MP- 300V (Major Science, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Anotácia génu škrobovej syntázy II

Anotácia génu škrobovej syntázy II bola vykonaná pomocou dvoch programov určených na predikciu génu. Používané programy Geneid (Parra *et al.*, 2000) a Fgenesh (Salamov *et al.*, 2000) sú dostupné na stránkach <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind> a <http://genome.crg.es/software/geneid/geneid.html>. Na analýzu bola použitá referenčná genomická sekvencia pšeničného SSII génu pre 7A chromozóm (nepublikované výsledky), ktorá bola vložená v oboch programoch vo FASTA formáte. Po nahratí danej sekvencie bol zvolený organizmus, ktorý sa chcel analyzovať a následne prebehla samotná predikcia génu. Získané výsledky boli porovnané s publikovanou mRNA sekvenciou génu škrobovej syntázy II (AJ269503) (Gao a Chibbar, 2000).

3.2.2 Extrakcia a purifikácia DNA

Semená pre extrakciu DNA boli umiestnené na Petriho misky s buničitou vatou, filtračným papierom a navlhčené vodou. Klíčenie semien prebehlo 10 dní pri izbovej teplote. Z každého naklíčeného semena boli odobraté 3 cm listové segmenty a použité na extrakciu DNA. Odobraté listové segmenty boli 12 h lyofilizované. Po vysušení listových segmentov sa ku každej vzorke pridali dve 5 mm sklenené guľičky a boli homogenizované v oscilačnom mlyne MM301 (Retch, Nemecko) po dobu 4 min s frekvenciou 27 Hz. Zhomogenizované vzorky boli centrifugované 1 min pri 11 000 otáčkach, aby sa prášok usadil. Následná lýza a extrakcia DNA sa uskutočnila pomocou komerčného kitu NucleoSpin[®] PlantII (Macherey-Nagel, Nemecko) presne podľa pracovného manuálu. Pre vizualizáciu a určenie kvality vyizolovanej DNA bola použitá agarózová gélová elektroforéza. Koncentrácia vyizolovanej DNA bola meraná na fluorometri Modulus (Turner BioSystems, USA) podľa návodu výrobcu a následne nariadená na koncentráciu 10ng/μl.

3.2.3 Agarózová gélová extrakcia a vizualizácia DNA

1,5% agarózový gél bol pripravený zo zmesi 300 ml 0,5x TBE a 4,5 g agarózy, ktorá bola privedená do varu v mikrovlnnej rúre. Následne bola zmes ochladená na telesnú teplotu pod prúdom studenej vody a vyliala do komôrky s vloženými hrebienkami. Gél tuhol po dobu 30 min pri izbovej teplote. Po stuhnutí boli vybraté hrebienky a komôrka s agarózovým gélom bola umiestnená do elektroforetickej aparatúry

a zaliata 0,5x TBE pufrom. 1 μ l extrahovanej DNA (10ng/ μ l) bol nanosený do jednotlivých jamiek na agarózový gél spolu s farbičkou 6xStop C v pomere 1:4. Elektroforetická separácia DNA prebehla pri 120 V po dobu 45 min. Gél so separovanou DNA bol umiestnený do nádoby s roztokom 0,05% ethidium bromidu (Sigma-Aldrich, USA) 30 min. Separovaná DNA bola vizualizovaná pomocou dokumentačného zariadenia InGenius Bio Imaging (Syngene, USA).

3.2.4 Navrhovanie špecifických primerov

Pri navrhovaní špecifických primerov sa ako templát použila získaná predigovaná sekvencia génu škrobovej syntázy II v *Triticum aestivum*, určená programom Geneid. Primery boli navrhnuté pre gén škrobovej syntázy II špecifickej pre pšeničný chromozóm 7A. Každý z navrhovaných špecifických primerov pre SSII-A gén sa navrhoval tak, aby obsahoval aspoň jeden jedno-nukleotidový polymorfizmus na 3' konci, ktorý by odlišoval sekvenciu 7A chromozómu od sekvencií homológnych subgenómov 7B a 7D. Sekvencie homológnych subgenómov boli získané z databázy NCBI (AB201446, AB201447) (Shimbata *et al.*, 2005). Sekvencie jednotlivých homológnych chromozómov boli porovnávané v programe BLAST (Altschul *et al.*, 1990) pre identifikáciu polymorfných miest vhodných pre dizajn primerov. Pre navrhovanie špecifických primerov bol použitý program Primer3 v. 0.4.0 (Rozen *et al.*, 2012). Dĺžka navrhovaných primerov bola povolená v rozmedzí 14 až 24 nukleotidov a teplota topenia (T_m) bola stanovená na 60°C \pm 5°C. Dĺžka amplikónov bola povolená v rozpätí od 400 do 900 bázových párov. Zoznam všetkých špecifických párov primerov pre SSII-A gén je uvedený v Tab.4, zvyšné testované primery sú uvedené v prílohe 1.

3.2.5 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Overenie špecificity primerových párov sa uskutočnilo pomocou polymerázovej reťazovej reakcie, kde bola k amplifikácii špecifických produktov PCR použitá teplota anelácie daná výrobcom primerov. V prípade ak došlo k amplifikácii nešpecifických produktov PCR, optimálna teplota nasadenia primerov bola zistená pomocou gradientovej PCR alebo Touchdown PCR (Tab.4). PCR reakcie boli uskutočnené v termocykléroch C-1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) za nasledujúcich podmienok: 1x počiatočná denaturácia (95°C-5min) /34x denaturácia (95°C-30s), anelácia (teplota podľa jednotlivých primerov uvedená v Tab.3-30s), elongácia (72°C-30s až 45s podľa dĺžky amplikónov)/ a 1x záverečná elongácia (72°C-7min). Pri

gradientovej PCR teplota nasadenia primerov bola v rozpätí od 53 do 62°C. V prípade Touchdown PCR boli použité nasledovné podmienky: 1x (95°C-5min)/5x (95°C-30s, 69°C-30s, 72°C-40s), 5x (95°C-30s, 68°C-30s, 72°C-40s), 5x (95°C-30s, 67°C-30s, 72°C-40s), 5x (95°C-30s, 66°C-30s, 72°C-40s), 25x (95°C-30s, 65°C-30s, 72°C-40s), 1x (72°C-7min). Celkový objem PCR reakčnej zmesi bol 20 µl. Jednotlivé zložky reakčnej zmesi sú uvedené v Tab.3.

Tabuľka č.3.: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Zložky PCR reakcie	Koncentrácia v reakcii
10x PCR pufoer	1x
10µM Forward primer	1µM
10µM Reverse primer	1µM
10mM dNTPs	200µM
<i>Taq</i> polymeráza	1,2U
5x Cresol Red	1x
DNA	2 ng/µl
Deionizovaná voda	

3.2.6 Polyakrylamidová gélová elektroforéza

Úspešnosť amplifikácie PCR bola overená pomocou elektroforézy na 4% polyakrylamidovom géli. Polyakrylamidová gélová elektroforéza sa uskutočnila vo vertikálnej aparátúre Dual Adjustable Mega-Gel Kit C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific, CA). Akrylamidový gél bol polymerizovaný medzi dvomi sklenenými tabuľami s rozmermi 22x50 cm, z ktorých jedno je UV transparentné. UV transparentné sklo bolo silanizované pre stabilizáciu gélu použitím 0,03% 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu v 1 ml 0,5% kyseliny octovej v 96% ethanole. 4% nedenaturujúci polyakrylamidový gél obsahoval - 0,066% (w/v) APS, 0,073% (v/v) TEMED, 0,5x TBE pufoer, 4% zmes akrylamid:bisakrylamid v pomere 19:1 doplnených H₂O na 150ml. Zmes bola vyliata medzi elektroforetické sklá, medzi ktoré bol vložený hrebienok. Gél polymerizoval 1 hod pri izbovej teplote. Po stuhnutí bol vybraný hrebienok a gél bol vložený do elektroforetickej aparátúry kde do katódovej a anódovej vaničky bol naliaty 0,5x TBE pufoer. Do pufru v anódovom priestore bolo pridaných 0,01% roztoku ethidium bromidu. Saturácia gélu ethidium bromidom prebehla 90 min pri 300 V. Po saturácii boli do jednotlivých jamiek na gél nanesené produkty PCR (5µl) a 60

ng veľkostného markeru, Gene Ruler™100 bp, Plus DNA Ladder (Fermentas, Litva). Elektroforetická separácia PCR produktov prebiehala 45-60 min pri 350 V, v závislosti od dĺžky delených fragmentov. Po skončení elektroforézy boli separované PCR produkty vizualizované pomocou dokumentačného zariadenia InGenius Bio Imaging (Syngene, UK) a gél bol odfotografovaný.

3.2.7 Prečistenie PCR produktu a sekvenovanie

Enzymatické prečistenie vzniknutého PCR produktu prebehlo pomocou exonukleázy I (Fermentas, Kanada) a termosenzitívnej alkalickéj fosfatázy (FastAP) (Fermentas, Kanada), vďaka čomu sa odstránili nespotrebované nukleotidy a primery. Reakčná zmes na prečistenie jedného PCR produktu mala celkový objem 7 µl a obsahovala 10-40 ng amplifikovanej DNA, 1 U exonukleázy I, 0,5 U FastAP a 1x PCR pufo. Reakčná zmes bola inkubovaná 37°C, 30 min a následne bola reakcia zastavená inkubáciou 95 °C, 5 min.

Sekvenovanie prečisteného PCR produktu sa uskutočnilo pomocou sekvenačného kitu BigDye® Terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Celkový objem sekvenačnej reakčnej zmesi bol 10 µl. Zloženie reakčnej zmesi pre sekvenovanie: 1x sekvenačný pufo, 0,125 µl BigDye®, 0,875 µl BDX64 pufru, 10 µM primeru (forward alebo reverse), 5-20 ng DNA a deionizovaná H₂O. Sekvenačná reakcia prebiehala v termocyklere C-1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA): 1x (98°C-5min), 60x (96°C-10s, 50°C-5s, 60°C-4min). Získané produkty sekvenačnej reakcie boli prečistené na robotickej stanici Biomek® NX^P (Beckman Coulter, USA). Vyhodnotenie produktov sekvenačnej reakcie bolo vykonané použitím 3730xl DNA analyzátoru (Applied Biosystems, USA).

3.2.8 Spracovanie získaných dát

Výstupy z dokumentačného zariadenia InGenius Bio Imaging (Syngene, UK) boli upravené v programe Adobe Photoshop CS5 v. 12.2 x 64 a vyhodnotené manuálne. Analýza sekvencií produktov PCR jednotlivých jedincov testovacej populácie bola vykonaná pomocou programu Chromas v. 2.5.1 (Chen, 2001). Na základe údajov z chromatogramu boli výsledné sekvencie spracované v Microsoft office word 2013 do FASTA formátu a prenesené do MEGA6 programu (Koichiro *et al.*, 2013), kde boli jednotlivé sekvencie porovnávané.

4. VÝSLEDKY

4.1 Anotácia génu škrobovej syntázy II pre 7A chromozóm (SSII-A gén)

Predikcia génu škrobovej syntázy II prebehla za použitia referenčnej genomickkej sekvencie *Triticum aestivum* kultivaru Chinese spring pre 7A chromozóm (nepublikované výsledky) v oblasti pšeničného SSII génu. Sekvencia bola analyzovaná v dvoch predikčných programov Fgenesh (Salamov *et al.*, 2000) a Geneid (Parra *et al.*, 2000). Výstupom u oboch programov bola webová stránka zobrazujúca pozíciu štart kodónu, stop kodónu a ostatných exónových oblastí. V porovnaní s Geneidom, Fgenesh program určil aj miesto počiatku transkripcie a polyA signál. Fgenesh program určil gén s dĺžkou 4163 a 9 exónovými oblasťami. Miesta štart a stop kodónu určené Fgenesh programom sa nezhodovali s porovnávanou sekvenciou mRNA SSII-A génu nachádzajúcou sa v databáze NCBI (AJ269503) (Gao a Chibbar, 2000), a preto bol použitý druhý predikčný program Geneid. Určené pozície štart, stop kodónu a miest zostrihov podľa Geneid programu sa zhodovali s mRNA sekvenciou SSII-A génu (Gao a Chibbar, 2000) a preto boli použité v tejto diplomovej práci. Anotovaný pšeničný gén škrobovej syntázy II má veľkosť 6652 bp a obsahuje 8 exónov.

4.2. Navrhovanie špecifických primerov

K navrhovaniu špecifických primerov bola využitá získaná sekvencia génu škrobovej syntázy II v *Triticum aestivum*. Primery boli navrhované tak, aby boli špecifické pre krátke rameno 7A chromozómu. Špecificita bola dosiahnutá tak, že aspoň jeden z párov navrhovaných primerov obsahoval polymorfizmus medzi sekvenciou SSII génu na 7AS chromozóme a sekvenciami na 7BS a 7DS chromozómoch v rozmedzí 1 až 6-nukleotidov (obr.6) Celkovo bolo navrhnutých 82 párov primerov.

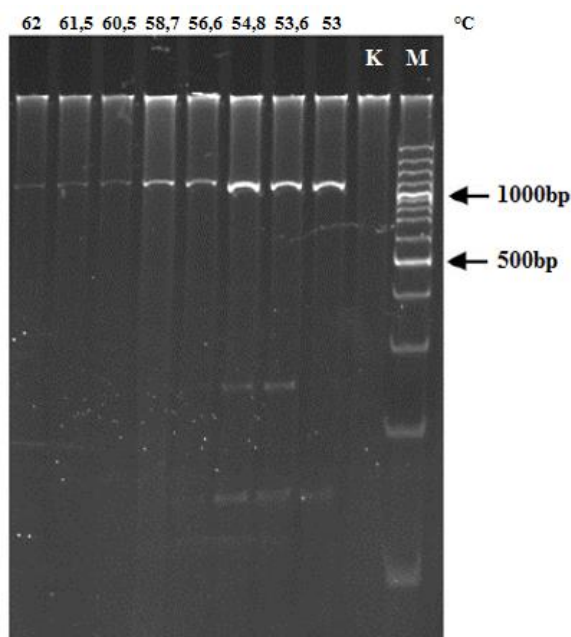


Obr.6 Príklad navrhovania genóm špecifických primerov

Sekvencia páru primerov AMY_F79 a AMY_R79 na 7AS chromozóme spolu s odpovedajúcimi sekvenciami na homológnych ramenách 7BS a 7DS. Farebne vyznačené nukleotidy označujú polymorfizmus medzi jednotlivými homológnymi subgenómami

4.3 Overenie špecificity navrhnutých primerov

Špecificita navrhnutých primerov bola overovaná pomocou PCR reakcie. V prípade, keď došlo k amplifikácii nešpecifických produktov PCR pochádzajúcich z homológnych subgenómov 7BS a 7DS alebo z iných oblastí DNA pšenice pri teoretickej anelačnej teplote, bola PCR s takýmito primermi optimalizovaná pomocou gradientovej alebo touchdown PCR (Obr.7). Špecifický PCR produkt pre SSII gén zo 7A chromozómu poskytlo 13 párov primerov (Tab.4) (Obr.8), z toho na sekvenovanie SSII-A génu bolo využitých 10 párov primerov (Tab.4), zameraných na kódujúce oblasti.



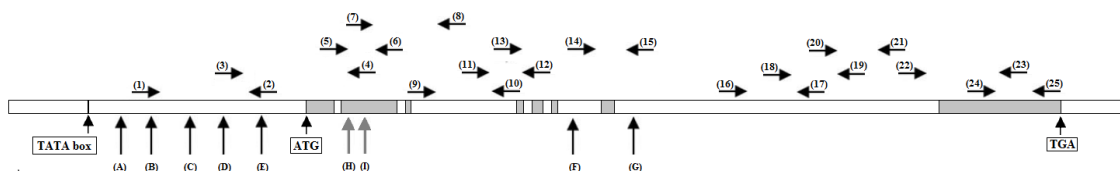
Obr.7 Optimalizácia špecificity primerov pomocou gradientovej PCR

Gradientová PCR pre optimalizovanie anelačnej teploty u páru primerov AMY_F74 a AMY_R72. Elektroforetogram 4% polyakrylamidového gélu zobrazuje produkty PCR, ktorá prebiehala pri rôznych teplotách nasadnutia primerov (T_m), použitá bola kontrolná vzorka *Triticum aestivum* cv. Chinese spring. Výsledná použitá optimálna teplota bola 55°C. K-kontrola, M-veľkostný marker 100

Tabuľka č.4.: Zoznam špecifických párov priemerov pre gén škrobovej syntázy II z chromozómu 7A

Označenie	Sekvencia 5'-3'	Optimálna T _m (°C)	Dĺžka PCR produktu (bp)
AMY_F81 AMY_R81	AACAAATGAAAACGGGAGAAAA TTGCAGAATCCACGTGAAGA	58,7	866
AMY_F74 AMY_R72	ACTCCCCTGCCACCA GCGCGCCACCTTCC	55	1089
AMY_F51 AMY_R51	CGAGATCAGCTCACGAATTG GCTCCTCGAAGCCAATGTAT	61	606
AMY_F52 AMY_R52	ATCGTCGAAGAAGCTCCAAA CGGATCTACAGGGCAGGTAA	61	708
AMY_F4 AMY_R4	TGCAGGCTTTCACTTAACTCTG CAATTGGGATGACTGCAGAA	61	666
AMY_F5 AMY_R5	CATTTCCGGTTAATGGTTGC GGAGCGTCAATGAACACAAA	55	660
AMY_F67 AMY_R7	CAATCAAAGGGGAGCTGAAA GCGATGTAGGCACGGTCTAA	61	1186
AMY_F7 AMY_R7	GCGCATTGATTTTGGAAATA GCGATGTAGGCACGGTCTAA	55	621
AMY_F11 AMY_R11	CTCTTGTCATTTCCCCCTCA GACCTAAAGTCAGGTCCATGC	60	658
AMY_F12 AMY_R12	ATCCGACCCGAATCATCATA CCAACACATAGCGCAATCAA	60	662
AMY_F13 AMY_R13	GTCACATCAACGTGCAGAGC GAAACCCACCGGCATCTAT	60	654
AMY_F14 AMY_R15	GGTCCAGCTAACGCCATTT ATGATCTCCACGCCCTTCT	53,5	1049
AMY_F16 AMY_R16	TCGACAACATGGAGTGGAAC GACGTCCTCGTAGAGCTTGG	61	683

* zvýraznené páry primerov boli použité pri sekvenovaní SSII-A génu v diverzných vzorkách

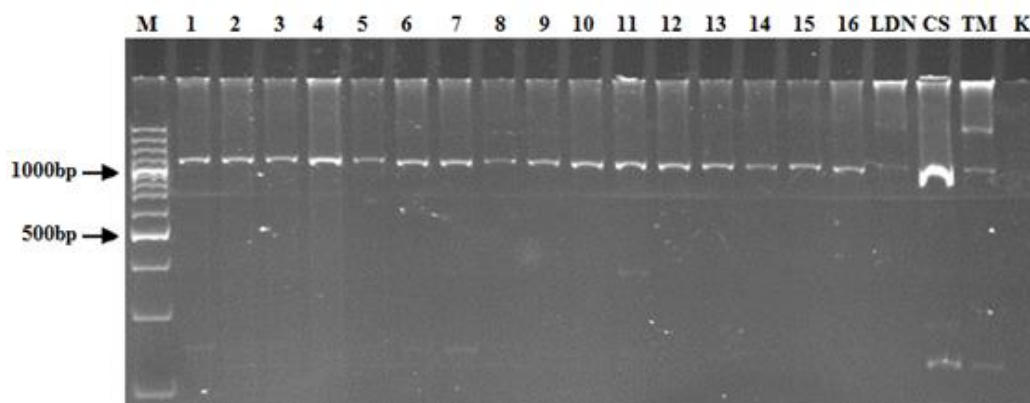


Obr.8 Diagram SSII-A génu

Diagram SSII-A génu s vyznačenými pozíciami primerov a SNP. Sivé oblasti predstavujú oblasti exónov, čierne zvislé šípky znázorňujú SNP v diverzných vzorkách druhu *T. aestivum* a sivé šípky SNP v druhej testovacej populácii kultúrnych pšeníc. 1) AMY_F81; 2) AMY_R81; 3) AMY_F74; 4) AMY_R72; 5) AMY_F51; 6) AMY_R51; 7) AMY_F52; 8) AMY_R52; 9) AMY_F4; 10) AMY_R4; 11) AMY_F5; 12) AMY_R5; 13) AMY_F67; 14) AMY_F7; 15) AMY_R7; 16) AMY_F11; 17) AMY_R11; 18) AMY_F12; 19) AMY_R12; 20) AMY_F13; 21) AMY_R13; 22) AMY_F14; 23) AMY_R15; 24) AMY_F16; 25) AMY_R16; A) SNP(T za C); B) SNP(G za A); C) SNP(C za G); D) SNP(C za G); E) Inzercia(A); F) Delécia(G); G) SNP(G za A); H) SNP(C za T); I) SNP(A za G)

4.4 Identifikácia polymorfizmu v SSII-A géne medzi testovacími líniami

K identifikácii polymorfných oblastí SSII-A génu bola použitá kolekcia 16 diverzných líní pšenice vrátane vzdialených príbuzných *Triticum militinae* a *Triticum durum* (kultivar Langdon). U týchto vzdialených príbuzných neboli primery AMY_F74/AMY-R72 použité, pretože dochádzalo k amplifikácii aj nešpecifického produktu (Obr.9). PCR produkty z ostatných líní mali požadovanú dĺžku.



Obr.9 PCR pre primerový pár AMY_F74 a AMY_R72 v 4% PAA géli

Elektroforetogram zobrazuje príklad amplifikácii DNA jednej oblasti SSII-A génu pomocou vybraných primerov testovaných na diverzných vzorkách. V prípade TM a LDN došlo k amplifikácii aj nešpecifického produktu, preto tento pár primerov na daných vzorkách nebol použitý. 1-16-*Triticum aestivum*, LDN-*Triticum durum* Langdon, CS-*Triticum aestivum* Chinese Spring, TM-*Triticum militinae*, K-kontrola, M-veľkostný marker 100

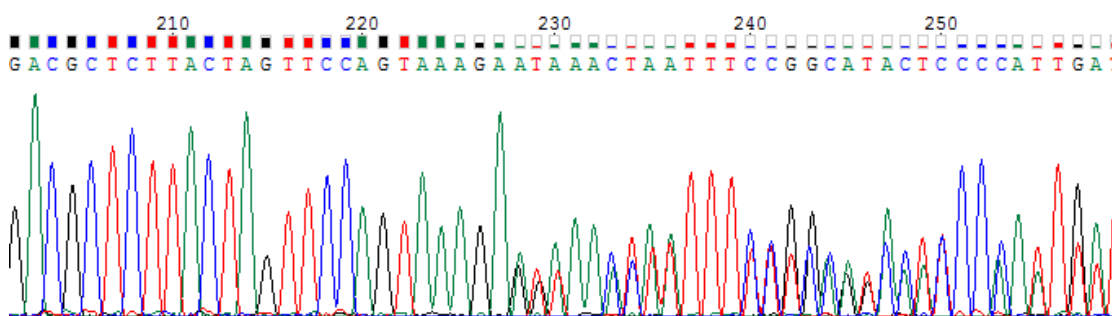
Všetky exónové oblasti vrátane niektorých intrónových oblastí a jednej promótorovej oblasti génu škrobovej syntázy II boli osekvenované zo všetkých diverzných vzoriek. Výnimkou bola len oblasť prvého exónu, cca 300 bp, zahrňujúca pár primerov AMY_F74/AMY_R72, pri ktorej bol výsledný band zložený z viac než jedného produktu. U primeru AMY_R72 došlo k osekvenovaniu oblasti dlhej cca 101 bp, neprislúchajúcej k SSII génu na 7A chromozóme, ale bola identifikovaná ako oblasť chromozómu 3BS pšenice. Z toho vyplýva, že pár primerov AMY_F74/AMY_R72 nebol špecifický pre požadovanú oblasť SSII-A génu a viazal sa na viac ako jednu oblasť genómu.

Analýzou sekvencií SSII-A génu v diverzných vzorkách bola odhalená prítomnosť 7 jedno-nukleotidových polymorfizmov. Bola zistená tranzícia, transverzia, inzercia a delécia. PCR produkty, ktoré obsahovali jedno-nukleotidové polymorfizmy boli poskytnuté 3 pámi primerov - AMY_F81/AMY_R81, AMY_F67/AMY_F7 a AMY_F7/AMY_R7 (Tab.5).

V štyroch diverzných vzorkách, a tiež u *Triticum militinae* a *Triticum durum* Langdon bola po analýze sekvencií zistená oblasť zmesných signálov s dĺžkou cca 76 bp v rámci páru primerov AMY_F5/AMY_R5, ktorá sa nachádza v oblasti tretieho intrónu (Obr.10).

Tabuľka č.5.: Charakterizácia polymorfizmu v diverzných vzorkách v SSII-A géne

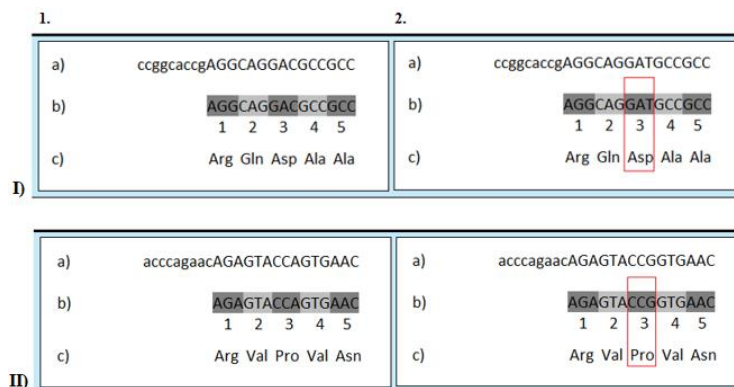
Názov páru primerov	Typ polymorfizmu	Oblasť polymorfizmu	Počet línií obsahujúcich SNP v 16 vzorkách
AMY_F81/AMY_R81	SNP (T za C)	promótorova oblasť	15
	SNP (G za A)		2
	SNP (C za G)		15
	SNP (C za G)		15
	Inzercia (A)		1
AMY_F67/AMY_R7	Delécia (G)	intrón 6	15
AMY_F7/AMY_R7	SNP (G za A)	intrón 7	15



Obr.10 Chromatogram zobrazujúci zmesnú sekvenciu

Sekvencia oblasti primerov AMY_F5/AMY_R5 v CHROMAS programe zobrazujúca oblasť zmesných signálov nachádzajúcich sa od cca 1836 bp do 1912 bp v SSII-A géne v 6 vzorkách.

Na základe výsledných sekvencií SSII-A génu v diverzných vzorkách bola osekvenovaná oblasť druhého exónu SSII-A génu pre zistenie miery diverzity v 384 kultúrnych pšeničných líniiach. Táto oblasť bola amplifikovaná z primerov AMY_F51/AMY_R51. V rámci populácie kultúrnych pšeníc bola identifikovaná nízka miera variability predstavujúca 2 jedno-nukleotidové polymorfizmy len v 6 líniiach (Tab.6). Zistené tranzície predstavovali tiché mutácie, ktoré nespôsobili žiadnu zmenu v aminokyselínovej sekvencii (Obr.11).



Obr.11 Zobrazenie jedno-nukleotidového polymorfizmu

Zobrazenie tichých mutácií v oblasti druhého exónu SSII-A génu ohraničujúcej párom primerov AMY_F51/AMY_R51 v druhu *Triticum aestivum*. **1)** zobrazuje referenčnú genomickú sekvenciu *T. aestivum* kultivaru Chinese spring; **2)** zobrazuje získanú sekvenciu v testovacích vzorkách; **I)** zobrazuje na 3. kodóne v 3. pozícii tranzíciu cytozínu za tymín, pričom nedochádza k zmene aminokyseliny asparágovej; **II)** zobrazuje na 3. kodóne v 3. pozícii tranzíciu adenínu za guanín, pričom nedochádza k zmene aminokyseliny prolínu

Tabuľka č. 6.: Charakterizácia polymorfizmu oblasti druhého exónu

Názov páru primerov	Typ polymorfizmu	Oblasť polymorfizmu	Počet línii obsahujúcich SNP v 384 vzorkách
AMY_F51/AMY_R51	SNP (C za T)	exón 2	3
	SNP (A za G)		3

V prípade línie *Triticum durum* Langdon bola po analýze sekvencií odhalená jedna substitúcia pri porovnaní so sekvenciou línie *Triticum aestivum*. Zámena guanínu za adenín bola zistená v tretej intrónovej oblasti a preto nemala vplyv na expresiu SSII-A génu. Porovnanie sekvencií SSII-A génu druhu *Triticum aestivum* s druhom *Triticum militinae* ukázalo viacpočetné zmeny oproti porovnaní s druhom *Triticum durum* Langdon. V *Triticum militinae* bolo identifikovaných 48 zmien v sekvencii SSII génu, z toho 43 zmien v intrónovej oblasti a 5 zmien v exónovej oblasti (Tab.7).

Tabuľka č. 7.: Charakterizácia zmien sekvencie SSII-A génu v TM

Názov páru primerov	Typ zmeny	Oblasť zmeny
AMY_F51/AMY_R51	A za G C za T	exón 2
AMY_F52/AMY_R52	Delécia (2bp)	intrón 3
AMY_F4/AMY_R4	Tranzícia – 2x	intrón 3
AMY_F67/AMY_R7	A za C	exón 5
	Tranzícia – 4x	intrón 5
	Transverzia – 1x	intrón 6
	Tranzícia – 8x	
	Transverzia – 7x	
Delécia – 4x (1bp až 6bp)		
Inzercia (2bp)		
AMY_F7/AMY_R7	T za A	exón 7
	G za T	intrón 7
	Tranzícia – 12x	
	Transverzia – 2x	
	Inzercia (105bp)	
Delécia (6bp)		

Z piatich zmien v kódujúcich oblastiach SSII-A génu druhu *T. militinae* len dve z nich mali za následok zmenu aminokyseliny vo výslednom proteíne (Obr.12). V prvom prípade došlo k zámene cysteínu za tymín, čoho výsledkom bola zámena aminokyseliny prolínu za serín. V druhom prípade došlo k zmene adenínu za cytozín. Táto zámena spôsobila zámenu aminokyseliny izoleucínu za leucín.

	1.	2.
d)	a) agaacAGAGTACCAAGTGAAC b) AGAGTACCAAGTGAAC 1 2 3 4 5 c) Arg Val Pro Val Asn	a) agaacAGAGTACCGGTGAAC b) AGAGTACCGGTGAAC 1 2 3 4 5 c) Arg Val Pro Val Asn
II)	a) gtgacAAGGCGCCGAGTCC b) AAGGCGCCGAGTCC 1 2 3 4 5 c) Lys Ala Pro Glu Ser	a) gtgacAAGGCGTCGGAGTCC b) AAGGCGTCGGAGTCC 1 2 3 4 5 c) Lys Ala Ser Glu Ser
III)	a) ttgacGCTCCTATCTCCGA b) GCTCCTATCTCCGA 1 2 3 4 5 c) Ala Pro Ile Phe Arg	a) ttgacGCTCCTCTCTCCGA b) GCTCCTCTCTCCGA 1 2 3 4 5 c) Ala Pro Leu Phe Arg
IV)	a) gttCCTGGCACGTTCCA b) CCTGGCACGTTCCA 1 2 3 4 5 c) Pro Trp His Val Pro	a) gttCCATGGCACGTTCCA b) CCATGGCACGTTCCA 1 2 3 4 5 c) Pro Trp His Val Pro
V)	a) tacatAACATCGCGACCAG b) AACATCGCGACCAG 1 2 3 4 5 c) Asn Ile Ala His Gln	a) tacatAACATCGCTACCAG b) AACATCGCTACCAG 1 2 3 4 5 c) Asn Ile Ala His Gln

Obr.12 Zobrazenie zmien v SSII-A géne v *T. militinae* v kódujúcich oblastiach v porovnaní s druhom *T. aestivum*

1) zobrazuje referenčnú genomickú sekvenciu *T. aestivum* kultivaru Chinese spring; 2) obdĺžnik zobrazuje sekvenciu druhu *T. militinae*; **I)** zobrazenie zmeny na 3. kodóne v 3. pozícii adenínu za guanín, pričom nedochádza k zmene aminokyseliny prolínu; **II)** zobrazenie zmeny v 3. kodóne v 1. pozícii cysteínu za tymín, pričom dochádza k zmene aminokyseliny prolínu za serín; **III)** zobrazenie zmeny adenínu za cytozín v 1. pozícii v 3. kodóne, pričom dochádza k zmene aminokyseliny izoleucínu za leucín; **IV)** zobrazenie zmeny v 1. kodóne v 3. pozícii tymínu za adenín, pričom nedochádza k zmene aminokyseliny prolínu; **V)** zobrazenie zmeny v 3. kodóne v 3. pozícii guanínu za tymín, kedy nedochádza k zmene aminokyseliny alanínu

4.5 Porovnanie SSII génu medzi jednotlivými subgenómami 7AS, 7BS a 7DS

Porovnávanie kódujúcich sekvencií prebehlo na základe mRNA sekvencií dostupných v databáze ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>), kde podľa Shimbata *et al.* (2005) mRNA wSs2a-2 génu (AJ269503) (Gao a Chibbar, 2000) predstavuje kódujúcu sekvenciu génu SSII-A, mRNA wSs2a-3 génu (AJ269504) (Gao a Chibbar, 2000) predstavuje kódujúcu sekvenciu génu SSII-B a mRNA wSs2a-1 génu (AJ269502) (Gao a Chibbar, 2000) predstavuje kódujúcu sekvenciu génu SSII-D. Výsledky ukázali priemernú mieru polymorfizmu medzi jednotlivými homológnyimi subgenómami. Identita sekvencií bola vo všetkých prípadoch viac ako 95%. Pri porovnaní mRNA sekvencií SSII-A génu a SSII-B génu bolo zistených 99 substitúcií, 6 jedno-nukleotidových inzercíí a 9 delécií v rozmedzí 1 až 11 nukleotidov. V prípade porovnania mRNA sekvencií SSII-A génu a SSII-B génu bolo zistených 95 substitúcií, 2 jedno-nukleotidové inzercie a 10 delécií v rozmedzí 1 až 11 nukleotidov. Z porovnania mRNA sekvencií SSII-B génu a SSII-D génu bolo identifikovaných 103 jedno-nukleotidových substitúcií, 3 inzercie v rozpätí 1 až 3 nukleotidy a 6 delécií v rozmedzí 1 až 11 nukleotidov.

6. DISKUSIA

Na biosyntéze škrobu sa podieľa niekoľko druhov enzýmov. Jedným z nich je aj škrobová syntáza II, ktorá je v pšenici zapojená do syntézy amylopektínového reťazca. Neprítomnosť enzýmu SSII v rastlinných druhoch má za následok zmenu pomeru hlavných zložiek škrobu, a to zvýšenie podielu amylózy (Yamamori *et al.*, 2000). V rámci tejto práce bola uskutočnená charakterizácia pšeničného génu škrobovej syntázy II z pšeničného chromozómu 7A s cieľom získať predstavu o diverzite tohto génu v rámci šľachtiteľských materiálov a odvodiť molekulárny marker.

Ako prvý krok bol SSII-A gén anotovaný s ohľadom na nové zdroje sekvencií (IWGSC, 2014). Pre istotu bola anotácia uskutočnená v dvoch predikčných programoch Fgenesh (Salamov *et al.*, 2000) a Geneid (Parra *et al.*, 2000). Predikcia génu programom Fgenesh sa nezhodovala so sekvenciou mRNA SSII-A génu nachádzajúcou sa v databáze NCBI (AJ269503) (Gao a Chibbar, 2000). Nukleotidová sekvencia cDNA klonu pre SSII-A gén určená podľa Gao a Chibbar (2000) sa na 95% zhodovala so pšeničným SSII-A génom popísaným z predchádzajúcej štúdie podľa Li *et al.* (1999), a preto bola použitá ako porovnávací sekvencia pri anotácii. Sekvencia génu určená programom Fgenesh mala určené pozície štart a stop kodónu o niekoľko nukleotidov skôr v porovnaní s porovnávanou sekvenciou, a to pri štart kodóne o 985 nukleotidov a pri stop kodóne o 3473 nukleotidov. Celkovo bol predigovaný gén určený Fgenesh programom kratší o 2488 nukleotidov a mal 16 zostihových miest, z ktorých 12 sa zhodovalo s porovnávanou sekvenciou. Na základe odlišných výsledkov Fgenesh s mRNA sekvenciou SSII-A génu (Gao a Chibbar, 2000) bol použitý tiež program Geneid. Výsledky z tohto programu sa zhodovali s mRNA sekvenciou SSII-A génu (Gao a Chibbar, 2000), a takisto so sekvenciou SSII-A génu, ktorú stanovili vo svojej štúdii Shimbata *et al.* (2005), a preto bola predikcia z Geneid programu použitá na anotáciu pšeničného SSII-A génu. Všeobecne platí, že kódujúca oblasť DNA býva bohatšia na cytozín a guanín kvôli termostabilite DNA (Bernardi, 1989). Exónové sekvencie anotovaného SSII-A génu boli oblasti bohatšie na cytozín a guanín (63%) v porovnaní so sekvenciami intrónov (39%), čo podporuje správnosť výberu kódujúcej sekvencie. U eukaryotických genómov je skutočných ORF (otvorený čítací rámec) veľmi málo v porovnaní s možnými kombináciami štart a stop kodónov (Burge a Karlin, 1997). Dĺžka génov je variabilnejšia než u prokaryot a väčšina eukaryotických génov môže obsahovať intróny, ktoré môžu posúvať ORF pri priamom čítaní, v dôsledku čoho môžu byť

pravdepodobné rôzne varianty génov (Boue *et al.*, 2003) ako v prípade aj SSII-A génu. Vďaka alternatívnym zostihom teda môžeme získať rôzne varianty génov a preto sa nedá úplne vylúčiť ani funkčnosť génu určeného Fgenesh programom. Najlepšie overenie anotácie predstavuje laboratórny experiment, pri ktorom sa osekvenuje molekula RNA prítomná v živých bunkách. Zistí sa tak, že daný gén je v bunke aktívny, prekladá sa do RNA a ktorá varianta sa prekladá.

SSII gén z genómu A pšenice je pokladaný za variantu génu s najväčším príspevkom k variabilite tohto znaku (Yamamori a Endo, 1996), preto bolo potrebné navrhnúť primery špecifické pre tento genóm. Navrhovanie 7A špecifických primerov bolo možné vďaka porovnávaniu získanej sekvencii génu škrobovej syntázy II v referenčnej genomickej sekvencii *Triticum aestivum* kultivaru Chinese spring (nepublikované výsledky) a sekvenciám homológnych subgenómov SSII génu dostupných v NCBI databáze (AB201446, AB201447) (Shimbata *et al.*, 2005). Úspešnosť špecificity navrhnutých primerov predstavovala 48% (Tab.4). Zo špecifických primerov pre sekvenovanie SSII-A génu bolo využitých 10 párov primerov (Obr.8) (Tab.4), ktoré pokrývali takmer celý gén a časť promotóra. Nízka úspešnosť navrhovania špecifických primerov bola pravdepodobne spôsobená nízkou mierou polymorfizmu medzi homológnymi subgenómami. Identita sekvencií predstavovala viac ako 95%, v dôsledku čoho často dochádzalo k amplifikácii nešpecifického produktu. Najväčší podiel na nízkej úspešnosti mala oblasť prvého exónu SSII génu, ktorú sa nepodarilo osekvenovať napriek použitiu 13 párov primerov. Z výsledných PCR amplifikácií a časti osekvenovanej pomocou primeru AMY_R72, ktorá predstavovala oblasť chromozómu 3BS pšenice možno predpokladať, že oblasť prvého exónu má repetitívny charakter a preto nie je jednoduché ju osekvenovať. V štúdiu Shimbata *et al.* (2005), z ktorej boli použité dva páry primerov pre danú oblasť, pri ktorých takisto dochádzalo k amplifikácii aj nešpecifického produktu, použili metódu subklonovania, kedy sa PCR produkt zaklonuje do plazmidového vektora, vďaka čomu je možné oddeliť jednotlivé amplikóny z homológnych subgenómov. V rámci tejto diplomovej práce nebolo možné vykonať túto metódu z časových dôvodov. Celková dĺžka amplifikovaných PCR produktov pomocou 13 špecifických párov primerov (Tab.4) pre SSII-A gén pokrývala 88% SSII-A génu. Dosiahnutá hodnota je vyššia v porovnaní s hodnotou z predchádzajúcej štúdiu Huang a Brûlé-Babel (2010), ktorá sa zameriavala na vývoj genóm-špecifických primerov pre homológne SS-II gény v alopolyploidných pšeniach, kde celková dĺžka

amplifikovaných PCR produktov predstavovala 61,6% SSII-A génu. V tejto štúdií okrem iných oblastí takisto nebola amplifikovaná oblasť prvého exónu SSII-A génu.

Analýzou sekvencií SSII-A génu v diverzných vzorkách druhu *T. aestivum* bolo zistených 7 jedno-nukleotidových polymorfizmov v nekódujúcich a mimogénových oblastiach SSII-A génu a preto nemali vplyv na štruktúru výsledného proteínu. Pri 4 diverzných vzorkách druhu *T. aestivum*, a tiež tetraploidných druhoch *T. militinae* a *T. durum* Langdon od cca 1836 bp do 1912 bp v oblasti tretieho intrónu SSII-A génu bola zistená oblasť zmesných signálov (Obr.10). Príčinou vzniku zmesnej sekvencie mohla byť nedostatočná špecificita primerov alebo duplikácia tejto oblasti. V týchto sekvenciách bola identifikovaná mutácia, spôsobujúca posun čítacieho rámca, pri ktorej na začiatku bola získaná čistá sekvencia až do bodu mutácie, kedy sa objavili zmesné signály. Pri tejto mutácii dochádzalo k amplifikácii PCR produktov o rovnakej dĺžke, ktoré nebolo možné odhaliť elektroforetickou separáciou PCR produktov. Kópie PCR produktov pochádzali s najväčšou pravdepodobnosťou z homológnych subgenómov, v ktorých sekvencie sa menili len v určitej oblasti. Určenie, či ide o kópie génu z jedného genómu alebo z homológnych genómov by mohlo byť urobené pomocou triedenia chromozómov skupiny 7 a amplifikácia z chromozóm špecifických DNA. V súčasnosti je možné triediť takmer všetky chromozómy pšeničného genómu pomocou metódy FISHIS (Giorgi *et al.*, 2013).

Na základe výsledkov sekvenovania SSII-A génu v diverznej populácii pšeničných línií bola oblasť exónu dva vybratá pre testovanie diverzity tohto génu v rámci šľachtiteľských materiálov. Avšak bola pozorovaná len veľmi nízka miera polymorfizmu. Zistené polymorfizmy predstavovali synonymické mutácie, ktoré nemajú žiadny vplyv na polypeptidový reťazec (Obr.11). Ďalším problémom je, že polymorfizmus bol pozorovaný len v 1,6% línií. Príčinou môže byť obmedzená diverzita šľachtiteľských materiálov v dôsledku intenzívneho šľachtenia (Feuillet *et al.*, 2007).

Najpočetnejšie genetické variácie v sekvencii SSII-A génu boli pozorované pri porovnaní referenčnej genomickej sekvencií hexaploidného druhu *T. aestivum* s tetraploidným druhom *T. militinae*. Zmeny v exónových oblastiach v dvoch prípadoch predstavovali variant meniaci zmysel informácie v kódujúcej sekvencii DNA, ktorý rovnako mení aj sekvenciu polypeptidového reťazca (Obr.12). V prvom prípade došlo k zámene aminokyseliny prolínu za serín. Zatiaľ čo aminokyselina prolín má hydrofóbny, nepolárny aromatický postranný reťazec, serín je alifatická hydroxyaminokyselina s

hydrofilným, polárnym zvyškom, takže touto zmenou môže dôjsť k zámene funkcie proteínu. V druhom prípade bola zistená zámena aminokyseliny izoleucínu za leucín. Aminokyseliny izoleucín a leucín sú aminokyseliny s podobnými vlastnosťami, obe majú nepolárny alkylový a hydrofóbny zvyšok, teda vlastnosti a štruktúra vytváraného polypeptidu sa dôsledkom tejto zmeny s najväčšou pravdepodobnosťou výrazne nezmení.

V prípade ďalšieho tetraploidného druhu *T. durum* kultivaru Langdon bola zistená len jedna substitúcia v intrónovej oblasti, ktorá pravdepodobne nemala vplyv na expresiu SSII génu. Podobné výsledky boli uvedené aj v štúdiu Huang a Brûlé-Babel (2010), ktorí zistili veľmi vysokú identitu SSII génu v homológnych A genómoch medzi durum a hexaploidnou pšenicom. Výrazné rozdiely v sekvenciách SSII-A génu pri porovnaní hexaploidného druhu *T. aestivum* s tetraploidným druhom *T. militinae* oproti porovnaniu s tetraploidným druhom *T. durum* Langdon mohli byť spôsobené rozdielnym vývojovým predkom jednotlivých druhov. *T. aestivum* a *T. durum* majú spoločného predka *T. turgidum* (nazývanú tiež „Emmer“ pšenica s genómom AABB) (Luo *et al.*, 2007), a preto sa dajú očakávať blízke vzťahy medzi chromozómami. Na druhej strane *T. militinae* vznikla z *T. timopheevii* (genóm A¹A¹GG). Timopheevii pšenice vznikli pravdepodobne v izolácii od bežnej *T. turgidum* (Jiang a Gill, 1994), pričom došlo k určitej diferenciacii A genómu *T. timopheevii* v porovnaní s A genómom polyploidných pšenice a dokonca sa predpokladá, že hybridy medzi *T. timopheevii* a *T. turgidum* sú sterilné (<http://www.fao.org/3/a-y4011e/y4011e07.htm>). Pretože tetraploidný druh *T. militinae* vznikol nezávisle na „Emmer“ pšeniciach, mohol by sa stať zdrojom variability pre gén SSII-A. Prenos genetickej informácie z *T. militinae* do *T. aestivum* bol už v minulosti úspešný (napr. Jakobson *et al.*, 2006). Bolo by zaujímavé zistiť, či introgresia časti chromozómu 7A (Jakobson *et al.*, 2012) zahŕňa aj lokus génu SSII-A a či to má vplyv na zloženie škrobu v zrnách tejto introgresnej línie. Sekvencie získané v tejto práci sú vhodným markerom pre testovanie takéhoto prenosu.

Z analýz sekvencií bola zistená nízka miera polymorfizmu medzi testovanými kultúrnymi pšenícami druhu *T. aestivum*, čo dokazuje, že SSII gén pre 7A chromozóm je vysoko konzervovaný, a nie je vhodný pre tvorbu diagnostických markerov využiteľných v šľachtení bežných kultúrnych pšeníc. Okrem introgresie z príbuzných pšeníc je mutagenéza ďalšou možnosťou na zvýšenie genetickej variability. Najšľubnejšiu mutačnú metódu predstavuje TILLING (cielené indukované lokálne mutácie v genóme) metóda (Henikoff *et al.*, 2004), ktorá je založená na chemickej mutagenéze genómu rastlín s použitím chemických mutagénov (napr. EMS, azid sodný, atď.), ktorými je

možné indukovať veľkú hustotu bodových mutácií. Použitím citlivých technológií vysokokapacitného genotypovania je možné detegovať mutácie cieľových génov. TILLING metóda je vhodná pre akýkoľvek organizmus, ktorý môže byť silne mutagenizovaný a v porovnaní s inými metódami sú náklady a čas pri tejto metóde oveľa nižšie (Slade a Knauf, 2005). Táto metóda je zvlášť výhodná pre plodiny ako je pšenica, nakoľko polyploidia umožňuje vysokú hustotu mutácií. V štúdií Sestili *et al.* (2009) pomocou mutagenézy vytvorili nové alelické variácie SSII génu v hexaploidnej pšenici kultivaru Cadenza. V tejto štúdií využili TILLING metódu, pomocou ktorej v SSII géne indukovali niekoľko jedno-nukleotidových substitúcií, predčasný stop kodón a aminokyselinové substitúcie. Pomocou SDS-PAGE analýzy mutagenizovaných línií SSII enzýmu potom identifikovali línie s úplnou stratou kódovaného proteínu v dôsledku zavedenia predčasného stop kodónu alebo mutácie v mieste zostrihu, ktorá môže spôsobiť stratu exónu. TILLING metódu využili aj v štúdií Dong *et al.* (2009), v ktorej dokázali, že HRM (High resolution melting) analýza kombinovaná s mutáciou Surveyor® je dostatočne citlivá na detekciu jedno-nukleotidových substitúcií v PCR amplikóne, ktorý obsahuje produkt zo všetkých troch homológnych subgenómov. Metóda bola testovaná v TILLING populácii hexaploidnej pšenice kultivaru Ventura ošetrenej EMS, u ktorej genotypovanie prebehlo v koncovej karboxylovej doméne SSII génu. Hogg *et al.* (2013) vo svojej štúdií uskutočnili mutagenézu škrobovej syntázy II pomocou chemického mutagénu EMS. Skrížili línie *T. durum* s deléciou v prvej exónovej oblasti SSII géne s líniou *T. durum* odrody Mountrail a ich potomstvo ošetrili EMS. Z dvojitých mutantných línií zistili v dôsledku indukovaných mutácií zvýšenie obsahu amylozy o 15% v škrobových zrnách.

Expresia génu môže byť ovplyvnená aj pomocou epigenetických zmien (Wolffe a Matzke, 1999). Epigenetické zmeny regulujú expresiu génu reverzibilnými kovalentnými modifikáciami DNA, RNA alebo proteínov bez zmeny poradia nukleotidov alebo aminokyselín. Epigenetické zmeny sú dedičné a ovplyvňujú tak fenotyp bez zmeny genotypu (Wolffe a Matzke, 1999). Medzi epigenetické zmeny patrí DNA metylácia a modifikácia histónov (Holliday, 1987; Li, 2002). DNA metylácia znamená prenos metylovej skupiny zo substrátu S-adenozyl-metionínu na pyrimidín cytozínu v pozícii 5' za vzniku 5-metylcytozínu. Prenos metylovej skupiny zabezpečuje skupina enzýmov nazývaná DNA metyltransferázy. Táto časť DNA je následne neprístupná pre RNA polymerázu, a teda informácia kódovaná na tomto úseku nemôže byť exprimovaná (Rohlf *et al.*, 2012). Za modifikáciu histónov sú zodpovedné deje, ktorých výsledkom je aktívny

chromatín a zaradujeme k nim acetyláciu, fosforyláciu, metyláciu a ubikvitináciu histónov (Allfrey *et al.*, 1964). Dvojzávitnica DNA je v bunke omotaná okolo bielkovín nazývaných históny. Aby sa nejaký gén mohol prejaviť, musí sa obmotanie uvoľniť, aby bol príslušný úsek DNA prístupný pre iné proteíny. Tie zabezpečia funkčnosť génu tým, že sa DNA prepíše do RNA. Ak sú však históny pozmenené, DNA sa neodmotá a proteíny zabezpečujúce funkčnosť nemajú ku génu prístup (Felsenfeld a Groudine, 2003). Dá sa teda predpokladať, že deacetylácia histónov pomocou histonových deacetyláz (Kuo a Allis, 1998) a DNA metylácia môžu viesť k inaktivácii génu škrobovej syntázy II v rôznych rastlinných druhoch.

Navrhnuté genóm-špecifické primery pre gén škrobovej syntázy II A chromozómu, môžu byť využité pri rôznych štúdiách genetickej diverzity SSII génu v tetraploidných ale aj hexaploidných druhoch pšenice. Z výsledkov tejto práce je zrejmé, že SSII-A gén je veľmi konzervovaný a nie je vhodný na tvorbu markerov pre šľachtenie. Avšak tieto výsledky môžu byť využité pri štúdiu regulácie tohto génu na epigenetickej úrovni. Jednou z najslubnejších možností pre šľachtiteľov je využitie mutagenézy, najmä TILLING metódy, ktorá bola úspešne využitá vo viacerých popísaných štúdiách. Špecifické primery pre SSII-A gén navrhnuté v tejto práci potom môžu byť využité pre detekciu indukovaných mutácií.

6. ZÁVER

Predkladaná diplomová práca bola zameraná na charakterizáciu génu škrobovej syntázy II na 7A chromozóme v rôznych odrodách pšenice. Mutáciou daného génu môže dôjsť k zvýšeniu amylózy v škrobe, čo má veľa priaznivých účinkov na zdravie človeka. Cieľom bolo získať predstavu o diverzite tohto génu v rámci šľachtiteľských materiálov a odvodiť molekulárny marker.

Hlavným cieľom experimentálnej časti bolo osekvenovanie SSII-A génu v rôznych druhoch pšenice. Za daným účelom bolo získaných 13 genóm-špecifických párov primerov pre SSII-gén na 7A chromozóme. Z analýzy výsledných sekvencií SSII-A génu v diverzných vzorkách druhu *T. aestivum* a kultúrnych pšeniciach druhu *T. aestivum* boli identifikované len 2 jedno-nukleotidové polymorfizmy v oblasti druhého exónu SSII-A génu v 1,6% línií kultúrnych pšeníc. Pri porovnaní SSII-A génu *T. aestivum* s druhmi *T. durum* Langdon a *T. militinae* bolo zistených 5 jedno-nukleotidových substitúcií v kódujúcich oblastiach v sekvencii druhu *T. militinae*, z ktorých len 2 mali vplyv na sekvenciu polypeptidového reťazca.

Z nízkej miery polymorfizmu SSII-A génu vyplýva, že tento gén nie je vhodný pre tvorbu markerov. Jednou z najslubnejších možností pre šľachtiteľov je využitie rôznych druhov mutagenézy. Genóm-špecifické primery vytvorené v danej diplomovej práci môžu byť užitočné pri rôznych ďalších štúdiách SSII-A génu v hexaploidných ale aj tetraploidných pšeniciach.

7. LITERATÚRA

- Acker, L., Brauner-Glaesner, G.** (1982): Role of starch lipids in cereal lipids, their composition and significance for baking quality of wheat flours. *Getreide, Mehl und Brot*. 36:291-295.
- Akerberg, A., Liljeberg, H., Björck, I.** (1998): Effects of Amylose/Amylopectin Ratio and Baking Conditions on Resistant Starch Formation and Glycaemic Indices. *Journal of Cereal Science*. 28:71-80.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E.** (1994): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 51(5):786-794.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D.** (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.
- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, Ch.L.** (2009): Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 67(4):188-206.
- Anker-Nilssen, K., Faergestad, E.M., Sahlstrøm, S., Uhlen, A.K.** (2006): Interaction between barley cultivars and growth temperature on starch degradation properties measured in vitro. *Animal Feed Science Technology*. 130:3-22.
- Badaeva, E.D., Ruban, A.S., Zoshchuk, S.A., Surzhikov, S.A., Knüpffer, H., Kilian, B.** (2016): Molecular cytogenetic characterization of *Triticum timopheevii* chromosomes provides new insight on genome evolution of *T. zhukovskyi*. *Plant Systematics and Evolution*. 302:943-956.
- Ball, S., Morell, M.** (2003): From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*. 54:1-722.
- Bennett, M.D., Smith, J.B.** (1991): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society*. 334:309-345.
- Bernardi, G.** (1989): The isochore organization of the human genome. *Annual Review of Genetics*. 23:637-661.
- Bietz, J. A., Wall, J.S.** (1972): Wheat gluten subunits: Molecular weights determined by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*. 49:416-430.
- Boue, S., Letunic, I., Bork, P.** (2003): Alternative splicing and evolution. *BioEssays*. 25:1031-1034.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L.A., D'Amore, R., Allen, A.M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W.R., Hall, A., Mayer,**

- K.F.X, Edwards, K.J., Bevan, M.W., Hall, N.** (2012): Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*. 491:705-710.
- Buleón, A., Collona, P., Planchot, V., Ball, S.** (1998): Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23:85-112.
- Burge, Ch., Karlin S.** (1997): Prediction of Complete Gene Structures In human Genomic DNA. *Journal of Molecular Biology*. 268:78-94.
- Burrell, M.M.** (2002): Starch: the need for improved quality or quantity – an overview. *Journal of Experimental Botany*. 54(382):451-456.
- Čizmarová, M., Ilenčíková D., Kovács, L.** (2013): Molecular genetics for doctors. *Pediatrics for practice*. 14(6):238-241.
- Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J.** (1969): Chemie potravin. 2. vydanie. Praha. SNTL – Nakladatelství technické literatury. 142s. ISBN: 80-7080-097-6.
- Debet, M.R., Gidley, M.J.** (2007): Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? roles for amylose, protein, and lipid in granule „ghost“ integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(12):4752-4760.
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M.** (2001): The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology*. 158:479-487.
- Devos, K.M., Gale, M.D.** (1997): Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology*. 35(1-2):3-15.
- Diviš, J.** (2000): Pěstování rostlin. 1. vydanie. České Budějovice. Jihočeská univerzita. Zemědělská fakulta. 258s. ISBN 80-7040-456-6.
- Dong, Ch., Vincent, K., Sharp, P.** (2009): Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor®. *BMC Plant Biology*. 9:143.
- Dudáš, F.** (1981): Skladování a zpracování rostlinných výrobků. 2. vydanie. Praha. Statní zemědělské nakladatelství. 383s. 07-083-81.
- Eliasson, A.-C., Carlson, T.L.-G., Larsson, K., Mieziš, Y.** (1981): Some effects of starch lipids on the thermal and rheological properties of wheat starch. *Starch/Stärke*. 33:130-134.
- Eliasson, A.C.** (2004): Starch in food: Structure, function and applications. 1.vydanie. Cambridge. Woodhead Publishing. 624s. ISBN 781855739093.
- Felsenfeld, G., Groudine, M.** (2003): Controlling the double helix. *Nature*. 421:448-453.
- Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R.** (2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *TRENDS in Genetics*. 24(1):24-32.

- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E., Pérez-Álvarez, J.A.** (2010): Resistant starch as functional ingredient. *Food Research International*. 43:931-942.
- Gao, M., Chibbar, R.N.** (2000): Isolation, characterization, and expression analysis of starch synthase IIa cDNA from wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Genome*. 43:768-775.
- Giorgi, D., Farina, A., Grosso, V., Gennaro, A., Ceoloni, C., Lucretti, S.** (2013): FISHIS: Fluorescence *In Situ* Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. *PloS One*. 8(2):e57994.
- Girhammar, U., Nair, B.M.** (1992): Isolation, separation and characterization of water soluble non-starch polysaccharides from wheat and rye. *Food Hydrocolloids*. 6(3):285-299.
- Gömöry, P.** (2014): Genetika. 1.vydanie. Zvolen. Technická univerzita. Lesnícka fakulta. 99s.
- Henikoff, S., Bradley, J.T., Comai, L.** (2004): TILLING: Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiology*. 135(2):630-636.
- Higgins, J.** (2004): Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *Journal AOAC International*. 87:761-8.
- Hogg, A.C., Gause, K., Hofer, P., Martin, J.M., Graybosch, R. A., Hansen, L.E., Giroux, M.J.** (2013): Creation of a high-amylose durum wheat through mutagenesis of starch synthase II (SSIIa). *Journal of Cereal Science*. 57:377-383.
- Holliday, R.** (1987): The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 238:163-170.
- Holm, J., Bjorck, S., Ostrowska, A.X., Eliasson, A.-C., Asp, N.-G., Larsson, K., Lundquist, L.** (1983): Digestibility of Amylose-Lipid Complexes in-vitro and in-vivo. *Starch/Stärke*. 35(9):294-297.
- Huang, X.-Q., Brûlé-Babel, A.** (2010): Development of genome-specific primers for homoeologous genes in allopolyploid species: the *waxy* and *starch synthase II* genes in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) as examples. *BMC Research Notes*. 3:140.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Hasekorn, R., Gornicki, P.** (2002): Genes encoding plastid acetyl-Co A carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(1):8133-8138.
- Charmet, G.** (2011): Wheat domestication: Lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies*. 334:212-2011.

- Chen, Y.W.** (2001): How to prepare a DNA sequencing chromatogram for publication. *Technical Tips Online*. 02135.
- Jakobson, I., Peusha, H., Timofejeva, L., Järve, L.** (2006): Adult plant and seeding resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* x *Triticum militinae* hybrid kline. *Theoretical and Applied Genetics*. 112(4):760-9.
- Jakobson, I., Reis, D., Tiidema, A., Peusha, H., Timofejeva, L., Valárik, M., Kladvivová, M., Šimková, H., Doležel, J., Järve, K.** (2012): Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat-*Triticum militinae* introgression line. *International Journal of Plant Breeding Research*. 125:609-623.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W.-C., Augustin, L.S.-A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A.L., Axelsen, M.** (2002): Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 76:266S-73S.
- Jiang, J., Gill, B.S.** (1994): Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Research*. 2(1):59-64.
- Jones, D.T.** (2000): Gene Prediction in the postgenomic era. *Current Opinion Structure Biology*. 10(3):371-9.
- Kainuma, K.** (1988): Structure and chemistry of the starch granule. The biochemistry of plants. 1. edition. New York. Academic Press. 141-180s. ISBN 0-12-675414-4.
- Kiselov, Y.** (2006): Wheat starch granule.JPG. dostupné na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wheat_starch_granules.JPG.
- Koichiro, T., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.** (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725–2729.
- Konik-Rose, C., Thistleton, J., Chanvrier, H., Tan, I., Halley, P., Gidley, M., Kosar-Hashemi, B., Wang, H., Larroque, O., Ikea, J., McMaugh, S., Regina, A., Rahman, S., Morell, M., Li, Z.** (2007): Effects of starch synthase IIa gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 115:1053-1065.
- Kuo, M.H., Allis, C.D.** (1998): Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. 20(8): 615-26.
- Leloup, V.M., Colona, P., Ring, S.G., Roberts, K., Wells, B.** (1992): Microstructure of amylose gels. *Carbohydrate Polymers*. 18:189-197.
- Li, E.** (2002): Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature*. 3:662-673.

- Li, Z., Chu, X., Mouille, G., Yan, L., Kosar-Hashemi, B., Hey, S., Napier, J., Shewry, P., Clarke, B., Appels, R., Morell M.K., Rahman S.** (1999): The Localization and Expression of the Class II Starch Synthases of Wheat. *Plant Physiology*. 120:1147-1155.
- Li, Z., Sun, F., Xu, S., Chu, X., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ali, S., Rampling, L., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Morell, M. K.** (2003): The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Plant Physiology*. 3:76-85.
- Lipavský, J.** (2000): Tvorba výnosu obilnin a možnosti modelování těchto procesů. *Agris-Online*. ISSN: 1804-1930.
- Luo, M.C., Yang, Z.-L., You, F.M., Kawahara, T., Waines, J.G., Dvorak, J.** (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics*. 144:947-959.
- Mangelsdorf, P.C.** (1953): Wheat. *Scientific American*. 189:50-59.
- Martin, J. H., Waldren, R. P., Stamp, D. L.** (2006): Principles of field crop production. 4. edition. New Jersey. Pearson Prentice Hall. 954s. ISBN 01-3025-967-5.
- Matsuoka, Y., Arami, S., Sato, M., Haraguchi, H., Kurimoto, Y., Imai, S., Tanaka, K., Mano, J., Furui, S., Kazumi, K. K.** (2012): Development of Methods to Distinguish between Durum/Common Wheat and Common Wheat in Blended Flour Using PCR. *Food Hygiene and Safety Science*. 53(5):195-202.
- Meyer, K.H., Gurtler, P., Bernfeld, P.** (1947): Structure of amylopectin. *Nature*. 160:900-901.
- Michalík, I., Bauerová, M.** (2016): Bielkovinový komplex zrnín z hľadiska výživnej hodnoty II. *Naše pole*. 2:36-38.
- Mikulíková, D., Horváthová, V., Žofajová, A.** (2008): Obsah a zloženie škrobu v zrne pšenice, raže a tritikale. *Chemické Listy*. 102:822-828.
- Morrison, W.R., Karkalas, J.** (1990): Starch: Methods in Plant Biochemistry 2. London. Academic Press. 323-352s. ISBN 0-12-461012-9.
- Mua, J.P., Jackson, D.S.** (1997): Fine Structure of Corn Amylose and Amylopectin Fractions with Various Molecular Weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5(10):3840–3847.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T.** (1995): Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics*. 248: 253-259.

- Nelson, O., Pan, D.** (1995): Starch synthesis in maize endosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46:1-575.
- Nugent, A.P.** (2005): Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*. 30:27-54.
- O'Sullivan, A.C., Perez, S.** (1999): The relationship between internal chain length of amylopectin and crystallinity in starch. *Biopolymers*. 50(4):381-90.
- Parra, G., Blanco, E., Guidó, R.** (2000): GeneID in Drosophila. *Genome Research*. 10:511-515.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Šafář, J., Šimková, H., Doležel, J., Bernard, M., Feuillet, C.** (2008): A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science*. 322(5898):101-4.
- Petr, J., Černý, V., Hruška, L.** (1988): Yield Formation in the Man Field Crops. Amsterdam. Elsevier. 121-124s. ISBN 0-444-98954-4.
- Preiss, J.** (1991): Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation in plants. *Oxford Surveys of Plant molecular and Cell biology*. 7:59-114.
- Rayas-Duarte, P., Robinson, S.F., Freeman, T.P.** (1995): In situ location of a starch granule protein in durum wheat endosperm by immunocytochemistry. *Cereal Chemistry*. 72:269-274.
- Richardson, P.H., Jeffcoat, R., Shi, Y.-Ch.** (2000): High-Amylose Starches: From Biosynthesis to Their Use as Food Ingredients. *Mrs Bulletin*. 80:20-24.
- Rodríguez, S., Perera, E., Maestra, B., Díez, M., Naranjo, T.** (2000): Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. *Genome*. 43(6):923-930.
- Rohlf, T., Steiner, L., Przybilla, J., Prohaska, S., Binder, H., Galle, J.** (2012): Modeling the dynamic epigenome: from histone modifications towards self-organizing chromatin. *Epigenomics*. 4(2):205-219.
- Rozen, S.G., Untergrass, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M.** (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acid Research*. 40:115.
- Rückschloss, L., Hanková, A., Havrlentová, M., Matušková, K.** (2015): Šlechtitelské cíle z hlediska obsahových látek obilnín. *Naše pole*. 6:30-31.
- Salamov, A., Solovyev, V.** (2000): Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Research*. 10:516-522.
- Sestili, F., Botticella, E., Bedo, Z., Phillips, A., Lafiandra, D.** (2009): Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Molecular Breeding*. 25:145-154.

- Schulze, M.B., Liu, S., Rimm, E.B., Manson, J.E., Willett, W.C., Hu, F.B.** (2004): Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *American Society for Clinical Nutrition*. 80:348–56.
- Shimbata, T., Nakamura, T., Vrinten, P., Saito, M., Yonemaru, J., Seto, Y., Yasuda, H.** (2005): Mutations in wheat starch synthase II genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line. *Theoretical and Applied Genetics*. 111(6):1072-9.
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L.** (2010): Starch digestibility in food matrix. *Trend in Food Science and Technology*. 21:168-180.
- Slade, A. J., a Knauf, V. C.** (2005): TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement. *Transgenic Research*. 14(2):109-115.
- Slattery, C.J., Kavakli, I.H., Okita, T.W.** (2000): Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Science*. 5(7):291-8.
- Soresi, D., Carrera, A., Echenique, V., Garbus, I.** (2015): Identification of genes induced by *Fusarium graminearum* inoculation in the resistant durum wheat line Langdon(Dic-3A)10 and the susceptible parental line Langdon. *Microbiological Research*. 177:53-66.
- Šárka, E., Smrčková, P., Seilerová, L.** (2013): Rezistentní a pomalu stravitelný škrob. *Chemické Listy*. 107:929-935.
- Šícho, V.** (1969): Potravinářská biochemie. Praha. Nakladatelství technické literatury, 360s. ISBN 04-801-69.
- Tester, R. F.**(2006): Hydrolysis of native barches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*. 130:39-54.
- Wolffe, A.P., Matzke, M.A.** (1999): Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 286:481-486.
- Yamamori, M., Endo, T.R.** (1996): Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:275-281.
- Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K., Matsuki, J., Yasui, T.** (2000): Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theoretical and Applied Genetics*. 101:21-29.
- Yu, X., Li, B., Wang, L., Chen, X., Wang, W., Wang, Z., Xiong, F.** (2015): Systematic Analysis of Pericarp Starch Accumulation and Degradation during Wheat Caryopsis Development. *PLoS One*. 10(9):e0138228.
- Zálešáková, A., Bielková, S., Gregová, E., Kraic, J.** (2004): Vyhľadávanie zdrojov kvality v kolekcii genetických zdrojov pšenice. *Nova Biotechnologica*. 235-242.

Zhang, X., Myers, A.M., James, M.G. (2005): Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiology*. 138:663-674.

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. 1. vydanie. Praha. Profi Press. 179s. ISBN 80-86726-09-6.

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3BS	krátke rameno chromozómu 3B
7AS	krátke rameno chrmozómu 7A
7BS	krátke rameno chrmozómu 7B
7DS	krátke rameno chromozómu 7D
A	adenín
AGP	ADP-glukóza pyrofosforyláza (<i>ADP-Glc pyrophosphorylase</i>)
APS	peroxodisíran amónny (<i>ammonium peroxydisulfate</i>)
bp	počet báзовých párov (<i>base pairs</i>)
C	cytozín
CS	<i>Triticum aestivum</i> kultivar Chinese Spring
DBE	enzým devetviaci škrob (<i>starch debranching enzyme</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoxyribonukleotidový trifosfát (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DP	polymerizačný stupeň
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMS	etylmetánsulfonát (<i>ethyl methanesulfonate</i>)
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
F primer	forward primer
G	guanín
GBSS	škrobová syntáza viazaná na zrná (<i>Granule Bound Starch Synthase</i>)
Glc	glukóza (<i>glucose</i>)
LDN	<i>Triticum durum</i> kultivar Langdon
mRNA	mediatórová ribonukleová kyselina (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
N	nukleotid (<i>nucleotide</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	otvorený čítací rámec (<i>open reading frame</i>)
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová reťazová reakcia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
R primer	reverse primer
SBE	enzým vetviaci škrob (<i>Starch Branching Enzyme</i>)
SNP	jedno-nukleotidový polymorfizmus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SS	škrobová syntáza (<i>Starch Synthase</i>)

SSII-A	škrobová syntáza II pre 7A chromozóm (<i>starch synthase II-7A chromosome</i>)
T	tymín
T_m	teplota topenia
TEMED	N, N, N', N' - tetraetylénmetyléndiamín (<i>tetramethylethylenediamine</i>)
TBE	Thris/Borate/EDTA pufor
TILLING	cielené indukované lokálne mutácie v genóme (<i>Targeting Induced Local Lesions IN Genomes</i>)
TM	<i>Triticum militinae</i>
UV	ultrafialové žiarenie

9. ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1 Zoznam testovaných primerov pre gén škrobovej syntázy II na 7A chromozóme

Príloha 1

Tabuľka P1: Zoznam testovaných primerov pre SSII-A gén

Názov priemera	Sekvencia primeru 5'-3'	T _m (°C)	Dĺžka PCR produktu (bp)
AMY_F1	CCGCCCCTCGTGTAAAG	57,6	524
AMY_R1	GCGCCATACAGCAAGTCATA	57,3	524
AMY_F2	CCACCAAGGTAGTTGGTTCG	59,4	526
AMY_R2	CAACATCGCTGTCAATGTCC	57,3	526
AMY_F3	GGCTCAAATTCGTGGTCTC	57,3	685
AMY_R3	ATCCGACTGCTAACCACCAC	59,4	685
AMY_F6	TGGACTTGGCTAGACTTTGATG	58,4	632
AMY_R6	GACCAAATGTGCATGTGAGG	57,3	632
AMY_F8	CTGGCATATGATTACACATTTTATTTT	55,9	650
AMY_R8	TTAGGAGAAAAGGAACCTGGTG	58,4	650
AMY_F9	GGCCACACACTCCCTATTA	59,4	671
AMY_R9	AGCAGGAGAAGGAGGAGAGG	61,4	671
AMY_F10	GATGCAGTACACTCGGTCCA	59,4	668
AMY_R10	GGCTTGTTGAGGAAGAGCTG	59,4	668
AMY_R14	CGGGGTCTGACAGTCTGAAG	61,4	679
AMY_F15	AGCTAGGTCGCTTGCCATC	58,8	660
AMY_F17	ATCGTCGAAGAAGCTCCAAA	55,3	708
AMY_R17	CGGATCTACAGGGCAGGTAA	59,4	708
AMY_F18	TTTCATAGCCAACCCTGGAG	57,3	655
AMY_R18	CATCAAAGTCTAGCCAAGTCCA	58,4	655
AMY_F19	GGGAGCTAGTTTTTCGGGTTT	57,3	658
AMY_R19	ATGCCAGTCAGTAGGCCTTG	59,4	658
AMY_F20	CCTGCAGGATATGGAAGTGAA	57,9	653
AMY_R20	GCCAAGGAACCTGCAAATTA	55,3	653
AMY_F21	CTCTCCAACCTCAATTGACAACC	58,4	695
AMY_R21	CGTGACAAGTTCAAGCACCA	57,3	695
AMY_F22	GATGCAGTACACTCGGTCCA	59,4	668
AMY_R22	GGCTTGTTGAGGAAGAGCTG	59,4	668
AMY_F23	GGACCCACTTGTGAGCCTAT	59,4	650
AMY_R23	GCCAGAGCAGGAGAAGGAG	61	650
AMY_F24	CTGACCTAGCCGGACCATTA	59,4	671
AMY_R24	GCAAGAGACAAAAAGGGCTTA	55,9	671
AMY_F25	TATTTCCCCAAGCTGTGTC	57,3	662
AMY_R25	CGCCTCGAAATGTTAAGAA	55,3	662
AMY_F26	GCGAGTCCATTCTTTTCTGG	57,3	676
AMY_R26	CCATGGCACTGTACCACATT	57,3	676
AMY_F27	GCGTTCTTTGCTCTGCTCTT	57,3	665
AMY_R27	CTGGTCCGCCATCTTCAG	58,2	665
AMY_F28	TTTCTGGGTACTIONCGTTGG	57,3	652
AMY_R28	AGCATGCTCTCCAGGTCGT	58,8	652
AMY_F29	ATGTTCTCCCTGGTGCAAAA	55,3	721
AMY_R29	TTTGGTGGCTCTAACCGAAC	57,3	721
AMY_F30	GCGCCCGTGTGTATTAT	57,3	678

*T_m daná výrobcom primerov

Pokračovanie Tabuľky P1: Zoznam testovaných primerov pre SSII-A gén

Názov priemera	Sekvencia primeru 5'-3'	T _m (°C)	Dĺžka PCR produktu (bp)
AMY_R30	TCCATCGATATAAGCATGGAAA	54,7	678
AMY_F31	GGGACTATGAGGAAGCCTACG	61,8	650
AMY_R31	TTTCCAAATCAATCGGTGAA	51,1	650
AMY_F32	TGTGTATGCATGTATTTCAACAGA	55,9	668
AMY_R32	AAGTGAACACGCGTGACAAG	57,3	668
AMY_F33	CACCAGGTTCTTTTTCTCCA	57,3	674
AMY_R33	GTTGGGTTGGTGGATGGTC	58,8	674
AMY_F34	CCCCCTATGCACTTCATGTC	59,4	682
AMY_R34	CCCTCGTTAGGCTGGTCATA	59,4	682
AMY_F35	TGCATGACAATAAATGAGACCA	54,7	660
AMY_R35	AGACCTGACGGAGATGGAAA	57,3	660
AMY_F36	GATCAGGGACGCAAAGAATC	57,3	654
AMY_R36	CAAGCGGCCTTAGCTAAAAA	55,3	654
AMY_F37	TTCCCGGAGACACTTGTGAT	57,3	664
AMY_R37	AGCCCAACAGAGTACCGAAC	59,4	664
AMY_F38	AGCGACGTGGAACAAGAACT	57,3	656
AMY_R38	CTCCAGGGTTGGCTATGAAA	57,3	656
AMY_F39	GGCAAAGAGAGGACATCGTG	59,4	660
AMY_R39	CTGGGGTTTTGATGGCTCTA	57,3	660
AMY_F40	GCGCCCGTGTGTGATTTAT	57,3	712
AMY_R40	GGAAGAGAGGAGCGTCAATG	59,4	712
AMY_F41	TGGGGACTATGAAGAAGCCTA	57,9	681
AMY_R41	TATTGTTTGTGGCAGGTGGA	55,3	681
AMY_F42	GCACATTTGGTCAAGCGTTA	55,3	651
AMY_R42	TGGCACACAACAGCAAGTTT	55,3	651
AMY_F43	CGGGTTGCAAAATTATGATG	53,2	654
AMY_R43	ACGAGGGGAAAGGACAAGAG	59,4	654
AMY_F44	TTTGCTCCAAGGCTACCATC	57,3	671
AMY_R44	TGATGATTCGGTTCACATGG	55,3	671
AMY_F45	ATTGCTCGCACTAGGAGGTC	59,4	689
AMY_R45	CGCACCAGAAAAGAATGGAC	57,3	689
AMY_F46	ACAACGGATATGGTGTACAG	57,3	662
AMY_R46	GCGACCATGGAGAGACAGAT	59,4	662
AMY_F47	ATGACTTGCCTTTGGTCCAG	57,3	652
AMY_R47	ACCGGTGGTGTCTAAACTTG	57,3	652
AMY_F48	CAAGTGTGATGAATCCTACTGGT	58,9	653
AMY_R48	GGTTCCACTCCATGTTGTC	59,4	653
AMY_F49	CGGGACTACAAGGAGAGCTG	61,4	635
AMY_R49	GCACACGGTTGAGTTGTAGC	59,4	635
AMY_F50	AGCACACTCCAGTCCAGTCC	61,4	644
AMY_R50	CCGCCGGTAGATTTGTTCT	56,7	644
AMY_F53	GGCACTCCTGCCTGTCTATC	61,4	716
AMY_R53	GGCTTGTGAGGAAGAGCTG	59,4	716
AMY_F54	ATCAACACCGACATCATCCA	55,3	759
AMY_R54	AGCTTGGGGGAAATAGAGGA	57,3	759
AMY_F55	CCCTTTGCGTAGCAATTTTT	53,2	532

*T_m daná výrobcom primerov

Pokračovanie Tabuľky P1: Zoznam testovaných primerov pre SSII-A gén

Názov priemera	Sekvencia primeru 5'-3'	T _m (°C)	Dĺžka PCR produktu (bp)
AMY_R55	CCAACGGAGTACCCAAGAAA	57,3	532
AMY_F56	GCCTGAACTTTCTGGACTTAGTTT	59,3	605
AMY_R56	CACGTCCTGGCTCACGAT	58,2	605
AMY_F57	CGGGCTGAACCAGCTCTAC	61	708
AMY_R57	GCAAGAGTATCAATCCCACAGA	58,4	708
AMY_F58	CACTCCACATTGTTTGAGGAAA	56,4	702
AMY_R58	CAAATGATGTTGAGGATTTTGC	54,7	702
AMY_F59	TGTCATGACCATCCACCAAC	57,3	733
AMY_R59	TTCGAACCTGGGACCTAAAG	57,3	733
AMY_F60	TGGAAGGAGCACAAACAG	57,3	708
AMY_R60	GTGCTCAGGGAGAAGTTGGT	59,4	708
AMY_F61	GTGGCTGCTGAATGTTCTCC	59,4	601
AMY_R61	TGATAGCAACCATTAAGTAAATGT	56,9	601
AMY_F62	GGCACTCCTGCCTGTCTATC	61,4	602
AMY_R62	CCCTTTCCCACACACACATA	57,3	602
AMY_F63	GTCGCAGGTATGCTGGTAGC	61,4	714
AMY_R63	GGCTGGTCATAGTGGGGAGT	61,4	714
AMY_F64	TGCCCAGCTGAGAAGACG	58,8	613
AMY_R64	CTTTCATGTCTTGCACTTAATAACA	56,4	613
AMY_F65	TTTACCCACAGAGCACACTC	59,8	512
AMY_R65	GCGACCTGCACACGAG	56,9	512
AMY_F66	CATTTCCCCGGCCTGAC	57,6	511
AMY_R66	TTGTAGAAACAATTCGTGAGCTG	57,1	511
AMY_R67	CACTTACAAGGGAGATTACG	57,9	422
AMY_F68	TTTTCTATATGTTGGTGTGTTGATTGC	56,9	530
AMY_R68	GCCAAGGAACCTGCAAATTA	55,3	530
AMY_F69	GCCGCCGCGCTACT	50	900
AMY_R69	CAGGTTCAACATCGCTGTCA	57,3	900
AMY_F70	GCTCTGGGCGGAGGAC	59,4	813
AMY_R70	AGAAGCCGAGACCACGAAAT	57,3	813
AMY_F71	CCC GCGCATCGTACC	56	694
AMY_R71	GAATCCGGAGCCACGAC	57,6	694
AMY_F72	ACTCCCGCTGCCACCA	56,9	684
AMY_F73	CGCGCCGCAAAT	44	630
AMY_R73	AGCGCGTGCCTTTTGTAG	56	630
AMY_R74	GCGGCCACCTTCC	50	915
AMY_F75	CGCTTCCAGCGTGCTC	57,6	778
AMY_R75	CCGTTCACTCGGTGGAC	58,8	778
AMY_F76	GAAAGGCAACGGTAAGACGA	57,3	764
AMY_R76	GGAGCACGCTGGAAAGC	57,6	764
AMY_F77	TAGCGCCCTACCAGGGTAAC	61,4	900
AMY_R77	GCTGGACTGGACTGGAGTGT	61,4	900
AMY_F78	CCGGAATAACAAACAAAAGG	56,5	866
AMY_R78	GGAGCACGCTGGAAAGC	57,6	866
AMY_F79	ACCGGCCCGCTTT	48	492
AMY_R79	CGCGCCACACCTC	50	492
AMY_F80	GTGCGTTACCCACAGAG	58,2	912
AMY_R80	GAGCAGAAGCCGAGACCA	58,2	912
AMY_F82	TTGCAGTGCTCTATCTATCTATCTACA	60,4	941
AMY_R82	GCCGTTCACTCGGTGGA	58,8	941
SSII Fowl	GGGGCCGTTTCGTACGTACCC	67,6	983
SSII Rev1	CGAAATTTGAGCCGGACGAC	59,4	983

*T_m daná výrobcom primerov

Pokračovanie Tabuľky P1: Zoznam testovaných primerov pre SSII-A gén

Názov priemera	Sekvenca primeru 5'-3'	T_m (°C)	Dĺžka PCR produktu (bp)
SSII Fow2	AGGGATCCCGTCAAGACGCTCG	65,8	2548
SSII Rev2	GTGCCGTGTGCCAATC	54,3	2548
SSII Fow3	CATGCGGCGGTGTCCCTTATG	63,7	3803
SSII Rev3	TCACCACTGGTACTTGGCCTTGA	62,4	3803
SSII AF1	GCGTTTACCCACAGAGC	58,2	454
SSII AR1	ACGCGCCATACAGCAAGTCATA	60,3	454

*T_m daná výrobcom primerov