



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV TEPLoty A SUCHA NA OBSAH PROTEINŮ
GLIADINOVÉ FRAKCE U DVOU ODRŮD PŠENICE**

IMPACT OF TEMPERATURE AND DROUGHT ON GLIADINS CONTENT IN TWO VARIETIES OF WHEAT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Seidlová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1300/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kateřina Seidlová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce u dvou odrůd pšenice

Zadání bakalářské práce:

Na základě studia literatury pojednejte o vlivu teploty a sucha na vybrané odrůdy pšenice. Rovněž pojednejte o proteinech gliadinové frakce.

V experimentální části práce sledujte vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce u vybraných odrůd.

Termín odevzdání bakalářské práce: 25.5.2018

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

Kateřina Seidlová
student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce u dvou odrůd pšenice. Vybranými odrůdami byly Hyfi a Julie kultivované při teplotách 26, 29, 32, 35 a 38 °C v podmínkách, kde bylo kontrolováno zavlažování. Pro vzorky kultivované za vlhka měla půda vlhkost větší než 70 %, za sucha měla půda vlhkost nižší než 30 %. Po sklizni byla zrna rozemleta na mouku, ze které byly gliadiny extrahovány 2-chlorethanolem. Pro separaci gliadinů byla použita metoda A-PAGE, kvantifikace byla provedena počítačovou denzitometrií. Byl zjištěn výrazný vliv genotypu na lepkové proteiny. Zatímco u odrůdy Hyfi při současném působení sucha neměla teplota v rozmezí 26–38 °C výrazný vliv na obsah gliadinů, u odrůdy Julie vykazoval obsah gliadinů zřetelné maximum při 32 °C. Odrůda Hyfi se tedy vyznačovala větší odolností vůči teplotnímu stresu než odrůda Julie. U obou odrůd byl obsah gliadinů vyšší za sucha než při zavlažování.

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the effect of high temperature and drought on protein content of gliadin fraction on two varieties of wheat. Chosen varieties were Hyfi and Julie, cultivated at 26, 29, 32, 35 and 38 °C during flowering in watering controlled conditions. The condition for 'wet' samples was at least 70 % soil moisture and for 'dry' samples less than 30 % soil moisture. After harvesting, the seeds were milled into flour from which the gliadins were extracted with 2-chlorethanol. A-PAGE method was used for gliadin separation, quantification was carried out through computer densitometry. A significant genotype effect was discovered. Whilst temperature ranging from 26-38 °C with simultaneous drought stress had no significant effect on gliadin content of Hyfi variation, gliadin content of Julie variation shown obvious maximum at 32 °C. Therefore, Hyfi variation shown better resistance to heat stress than Julie variation. Both variations had higher gliadin content under drought stress than under good watering conditions.

KLÍČOVÁ SLOVA

pšenice, gliadiny, lepek, sucho, teplota, A-PAGE

KEY WORDS

wheat, gliadins, gluten, drought, temperature, A-PAGE

SEIDLOVÁ, K. *Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce u dvou odrůd pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 36 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis autora

Poděkování: Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D., za veškerou pomoc, podporu, cenné rady a připomínky, za věnovaný čas a odborné vedení mé bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Pšenice.....	8
2.2	Pšeničné zrno.....	8
2.2.1	Anatomie pšeničného zrna	8
2.2.2	Chemické složení pšeničného zrna.....	9
2.2.2.1	Sacharidy	9
2.2.2.2	Lipidy	10
2.2.2.3	Další složky	10
2.3	Pšeničné proteiny	10
2.3.1	Rozpusťné proteiny.....	10
2.3.2	Lepkové proteiny.....	11
2.3.2.1	Gliadiny	11
2.4	Technologická jakost pšenice.....	11
2.4.1.1	Objemová výtěžnost (Rapid Mix Test)	12
2.4.1.2	Obsah dusíkatých látek.....	12
2.4.1.3	Sedimentační test podle Zelenyho.....	12
2.4.1.4	Číslo poklesu (The Hagberg Falling Number)	13
2.4.1.5	Objemová hmotnost.....	13
2.4.1.6	Vaznost mouky.....	13
2.4.1.7	Doplňková kritéria.....	13
2.5	Metody stanovení gliadinů	13
2.6	Globální změna klimatu	14
2.7	Vliv klimatických změn na rostliny	15
2.7.1	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂	15
2.7.2	Vliv zvýšené teploty.....	15
2.7.3	Fotosyntéza.....	16
2.7.4	Transpirace	16
2.8	Vliv klimatických změn na pšenici	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1	Materiál	18
3.2	Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE	18
3.2.1	Přístroje	19
3.2.2	Chemikálie.....	19
3.2.3	Příprava roztoků	19

3.2.4	Příprava vzorků	20
3.2.5	Příprava polyakrylamidového gelu.....	20
3.2.6	Elektroforéza	20
3.2.7	Fixace a vizualizace bílkovin	20
3.3	Vyhodnocení gelů.....	20
4	VÝSLEDKY	22
4.1	Srovnání obsahu gliadinů při kultivaci za mokra a sucha	24
4.1.1	Odrůda Hyfi.....	24
4.1.2	Odrůda Julie	25
4.2	Závislost obsahu gliadinů na teplotě kultivace při současném stresu suchem	27
4.2.1	Porovnání frakcí α gliadinů mezi odrůdami	27
4.2.2	Porovnání frakcí β gliadinů mezi odrůdami	28
4.2.3	Porovnání frakcí γ gliadinů mezi odrůdami	28
4.2.4	Porovnání frakcí ω -1,2 gliadinů mezi odrůdami	29
4.2.5	Porovnání frakcí ω -5gliadinů mezi odrůdami	29
4.2.6	Porovnání celkového obsahu gliadinů mezi odrůdami.....	30
5	DISKUZE.....	31
6	ZÁVĚR.....	32
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	33
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	36

1 ÚVOD

Jedním z žhavých témat dnešní doby je fenomén tak zvaného globálního oteplování, jehož projevem jsou měnící se klimatické podmínky na planetě Zemi. Tento jev není nijak výjimečný, co se týče historie naší planety, protože je dokázáno, že pravidelně dochází ke střídání dob ledových a meziledových. Avšak to, co způsobuje největší obavy odborníků je nevyvratitelný fakt, že nikdy k těmto změnám nedocházelo v takové míře a takovou rychlostí. Jedním z hlavních faktorů podporujících oteplování naší planety je nárůst skleníkových plynů. V posledním století se zvýšila produkce těchto plynů, takže se pozitivní a pro život nezbytný skleníkový efekt umocnil na nežádoucí míru. Vědci předpovídají, že důsledkem měnících se klimatických podmínek dojde k nárůstu extrémních meteorologických jevů a zároveň k prohloubení rozdílů mezi tradičně suchými a dešťovými oblastmi. Tyto změny budou mít samozřejmě dopad jak na přírodní, tak na sociální systém. Lidé se budou stěhovat za pitnou vodou a potravou a dojde tak k environmentální migraci. Jedním z řešení problému, jak uživit stále rostoucí lidskou populaci v nehostinných podmínkách pro pěstování rostlin je stále ještě mladé genové inženýrství. Díky znalosti genetické informace rostliny a její odrůdy je možné ji geneticky modifikovat, a tak ji přizpůsobit podmínkám v dané oblasti. Nejvýznamnějšími stresovými faktory pro růst rostlin jsou sucho a vysoká teplota, jejichž vliv je sledován v této bakalářské práci.

Jako zástupce rostlinného světa byla vybrána pšenice. Je to nejrozšířenější obilovina světa a její mouka je jednou z nejdůležitějších surovin pro obyvatele Země. S rostoucí světovou populací se zvyšují požadavky na efektivní a ekonomickou produkci kvalitní pšenice, a tedy kvalitního pšeničného proteinu. Tato práce se zaměřuje na pšeničné bílkoviny zejména kvůli jejich významu na kvalitu výsledného produktu. Pšeničné bílkoviny se dělí na lepkové (gliadiny a gluteniny) a nelepkové. Lepkové proteiny jsou zásadní tím, že dávají pšeničné mouce jedinečné reologické vlastnosti. Jsou schopny tvořit lepek, složitý hydratovaný bílkovinný komplex, který se tvoří v procesu hnětení těsta. Obsah a zastoupení obou lepkových bílkovin jsou hlavními faktory, které ovlivňují pekařské a pečivářenské vlastnosti pšeničné mouky a tím přímo ovlivňují kvalitu všech výrobků z nich vyrobených.

Cílem této práce je stanovit celkový obsah i obsah jednotlivých frakcí gliadinů ve vzorcích dvou odrůd pšenice, Hyfi a Julie, kultivovaných za vlhka a sucha při různých teplotách. Práce je částí rozsáhlého experimentu, který realizoval Ústav výzkumu globální změny AV ČR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pšenice

Rod pšenice (*Triticum*) se systematicky řadí do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Mezi obilovinami se vyznačuje především svou schopností tvořit trojrozměrný viskoelastický komplex bílkovin, který dává pšeničné mouce jedinečné reologické vlastnosti při pečení.

Historie pěstování pšenice spadá až do Mezopotámie. Archeologické nálezy ukazují, že nejstarší zemědělství bylo spojeno s oblastí tzv. úrodného půlměsíce v oblasti Blízkého východu mezi řekami Eufrat a Tigris, toto období přechodu od společnosti lovců a sběračů se tradičně nazývá neolitická revoluce. Starověké zemědělství zahrnovalo chov ovcí a koz a kultivaci plodin jako jsou ječmen a pšenice. Odborníci datují domestikaci a kultivaci pšenice do období 7500-6500 př. n. l. [1]. V novodobých dějinách byla velkým milníkem tzv. zelená revoluce v polovině 20. století, kdy pěstování nových odrůd mnoha plodin umožnilo velký nárůst produkce potravin [2]. Pšenice je nyní světově nejrozšířenější obilovinou a představuje důležitý zdroj potravin, především bílkovin [3]. Její nutriční hodnota není sice, tak vysoká jako v případě jiných potravin, ale to kompenzuje množstvím, které lidé denně zkonzumují.

2.2 Pšeničné zrno

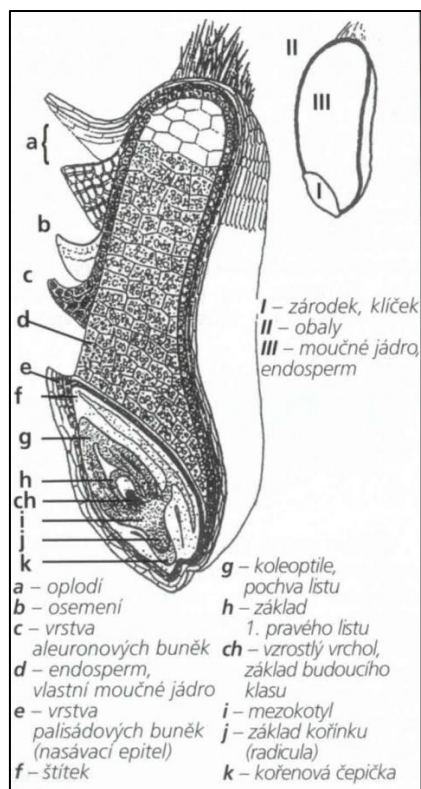
2.2.1 Anatomie pšeničného zrna

Strukturní a mechanické vlastnosti zrna se mění s jeho anatomickými částmi. Pšeničné zrno se skládá z oplodí, osemení, aleuronové vrstvy, endospermu a klíčku. Vnější vrstvou je oplodí neboli perikarp, který je tvořen 4 vrstvami. Ty pokrývají zrno mnohvrstevnou slupkou a působí jako ochranné pletivo. Těmito vrstvami jsou pokožka (epidermis), vnější oplodí (epikarp), mesokarp a vnitřní oplodí (viz obrázek 1). Epidermis je tvořena zdřevnatělými buňkami, epikarp podélnými buňkami a mesokarp příčnými buňkami. Během zrání se z jejich buněk ztrácí cytoplazma, a nakonec zůstávají pouze zhrublé zdřevnělé stěny. Vrstva podélných buněk je po endospermu na minerální látky nejchudší, obsahuje poměrně málo bílkovin, avšak velmi mnoho pentosanů, vlákniny a celulosy. Příčné buňky obsahují více minerálních látek a bílkovin [4]. Osemení je tvořeno částečně rozpustnými polysacharidy, ty váží vodu a bobtnají. Tvoří cenný zdroj vlákniny a minerálních látek.

Pod epidermis se nachází aleuronová vrstva. Ta je složena z velkých tlustostěnných buněk na podélném průřezu čtyřhranných, na příčném šestihdranných. Obsahuje důležité bílkoviny, tuk, minerální látky a značné množství vitamínů [4].

Jádro neboli endosperm je složeno z protáhlých parenchymatických buněk s tenkými buněčnými stěnami tvaru nepravidelného mnohostěnu. Tvoří vnitřní obsah zrna a obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu (škrob a bílkoviny). Rozdrcený endosperm je mouka [4]. Klíček (embryo), zárodek nové rostliny, je při zpracování oddělován, kvůli vysokému obsahu tuku, který snižuje jeho stabilitu. Nicméně se využívá pro krmné účely.

Při standardním mletí dochází k tzv. vymílání zrna. To znamená konečné mletí na mouku požadované zrnitosti (granulace). Z prvních mlecích chodů se získávají tzv. nízkovymleté mouky, které mají světlou barvu a nižší biologickou hodnotu. Postupně se vymílají části bližší obalovým vrstvám a v nich se zvyšuje obsah minerálních látek, vlákniny a dalších biologicky aktivních látek. Těmto moukám se říká výše vymleté a jsou charakteristické tmavší barvou a vyšší biologickou hodnotou, ale horší chutí a horšími pekařskými vlastnostmi [5].



Obrázek 1: Morfologie pšeničného zrna [4]

2.2.2 Chemické složení pšeničného zrna

Obilné zrna obsahuje všechny základní skupiny látek jako ostatní rostlinný materiál [4]. V mouce pro pekařské účely posuzujeme hlavně stav sacharido-amylasového komplexu a bílkovino-proteinasového komplexu [7].

2.2.2.1 Sacharidy

Největší podíl hmotnosti zrna tvoří sacharidy, z toho převážně polysacharidy jako jsou škrob, celulóza, hemicelulózy a pentosany [6]. Neškrobové polysacharidy jsou obsaženy v obalových vrstvách a tvoří vlákninu potravy. V mouce se vyskytuje i řada monosacharidů (např. glukosa, fruktosa, galaktosa, apod.), oligosacharidů (maltosa, sacharosa) a také sacharidy ve formě komplexů s proteiny (glykoproteiny) i lipidy (glykolipidy). Sacharido-amylasový komplex je tvořen sacharidy spolu s amylolytickými enzymy. V pekařské technologii se tento komplex projevuje při zrání těsta a během pečení [7].

Škrob je obsažen v endospermu a v pšeničném zrna se jeho obsah pohybuje v rozpětí 50–70 % sušiny obilí. Je složen ze dvou frakcí – amylosy (α -1,4 glykosidová vazba mezi jednotkami glukosy) a amylopektinu (α -1,4 a α -1,6 glykosidové vazby mezi jednotkami glukosy). Charakteristickou vlastností je, že ve vodě škrobová zrna bobtnají a při zahřátí na teplotu okolo 65 °C dochází k tzv. mazovatení škrobu. Rychle se zvýší viskozita suspenze a zrna mnohonásobně zvětší svůj objem, následně praskají, jejich obsah vytéká, a tak vzniká silně viskózní roztok – škrobový maz [6]. Škrobový maz je hlavním nositelem vláčnosti a obsažené vody ve střídě výrobku a jeho vlastnosti významně ovlivňují pekařskou technologickou jakost mouky. Po hydrolýze amylasami se stává zdrojem kvasitelných cukrů pro kvasinky při kynutí. Negativním jevem je tzv. retrogradace škrobu, kdy při nižších teplotách dochází ke ztrátě vody a pružnosti a tím i ke stárnutí pečiva [7].

2.2.2.2 Lipidy

V pšeničném zrně je pouze malá část tvořena tuky. V rostlinném organismu mají úlohu stavební a zásobní. Vznikají a ukládají se v semenech teprve v pokročilém stádiu ukládání zásobních látek. Technologicky významnou vlastností je, že podléhají enzymatické hydrolýze a oxidaci, a tak nabývají hořké chuti a zapáchají v důsledku vzniku rozkladných produktů, hlavně aldehydů a ketonů. Z nasycených mastných kyselin je nejvíce mezi tuky v zrně zastoupena kyselina palmitová, z nenasycených kyselina linolová (nejméně 50 %), olejová a menší množství kyseliny linolenové. V klíčku a v aleuronové vrstvě se nachází podíl fosfatidů, zahrnujících lecithiny [4].

2.2.2.3 Další složky

Mezi další složky, které lze nalézt v pšeničném zrně, se řadí vitaminy, které se nalézají zejména v klíčku zrna a v aleuronové vrstvě. Jsou to nepostradatelné organické látky, katalyzující mnoho životně důležitých biochemických procesů. Obsah vitaminů v obilovinách kolísá ve značně širokém rozmezí [4].

Minerální látky jsou sloučeniny a ionty, které tvoří popel, tedy zbytek po spálení rostlinného materiálu. V zrně tvoří 1,5–3 %, ale jejich obsah silně ovlivňuje půdní a agrotechnické podmínky. Největší podíl popelu tvoří kyselina fosforečná ve formě fytinu [4].

2.3 Pšeničné proteiny

Bílkoviny jsou v nejvíce zastoupeny v endospermu, kde tvoří bílkovino-proteinasový komplex, směs moučných bílkovin a enzymů, které se zapojují do technologického procesu pečení [7]. Jejich význam v pšeničné mouce je jak nutriční, tak technologický. Obsah proteinů a skladba aminokyselin je nejdůležitější parametr pro určení výživové hodnoty pšenice v potravě člověka a zvířat. Obsah a profil aminokyselin je důležitou vlastností, která určuje kvalitu pšeničného zrna. Významně jsou zastoupeny kyselina glutamová a prolin, naopak nízký je obsah lysinu, z toho důvodu není pšeničná bílkovina plnohodnotná [8].

Pšeničné proteiny tvoří asi 8–20 % (průměrně 12–13%) sušiny zrna, kdy záleží na odrůdě a podmínkách růstu a pěstování. Obsah bílkovin kolísá v různých částech zrna, relativně nejvyšší je v aleuronové vrstvě a v klíčku [4]. V endospermu ubývá obsah bílkovin směrem do středu. Tyto bílkoviny přecházejí do mouky a jsou hlavními nositeli reologických vlastností těsta.

V roce 1907 Osborne [9] klasifikoval pšeničné proteiny podle rozpustnosti do čtyř skupin na albuminy, globuliny, prolaminy (u pšenice se nazývají gliadiny) a gluteliny (u pšenice se nazývají gluteniny). Dále se bílkoviny zrna dají rozdělit na strukturní, metabolické a zásobní. Mezi strukturní a metabolické se řadí albuminy, globuliny a amfifilní proteiny. Zásobní proteiny se dělí na gliadiny (přítomné jako monomery) a gluteniny (přítomné jako polymery). Syntéza a akumulace těchto bílkovinných frakcí se mění v průběhu vývoje zrna obzvláště v podmínkách, které limitují růst a vývoj zrna [8].

2.3.1 Rozpustné proteiny

Mezi nelepkové proteiny patří albuminy a globuliny. Tyto bílkoviny tvoří asi 20 % všech bílkovin v pšeničném zrně. Jejich funkce je jak metabolická, tak zásobní [10].

Albuminy jsou neutrální sloučeniny dobře rozpustné v destilované vodě, ale také v solných roztocích, kyselinách i bázích. Vysolují se z roztoků jejich nasycenými solemi. Globuliny jsou slabě kyselé bílkoviny nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve vodných roztocích solí (např. 5 % NaCl) [4].

2.3.2 Lepkové proteiny

Lepek byl objeven roku 1728 Italem Beccarim. Přípravuje se vypráním prohněteného a odleželého těsta vodou jako tzv. mokrý lepek ve formě pružného a vazkého kaučukovitého gelu žlutozelené nebo žlutošedé barvy. Lepek je složitý trojrozměrný útvar, jehož peptidické řetězce jsou pospojovány různými můstky, zejména disulfidickými; význam však mají i můstky methylenové, vznikající reakcí primárních nebo sekundárních aminů s amidy nebo guanidyl-deriváty různých látek s formaldehydem [4]. Existuje přímá závislost mezi obsahem lepku v mouce a potenciální pekařskou jakostí [4].

Lepkové proteiny tvoří asi 80 % obsahu všech bílkovin v endospermu zrna. Gliadiny, mají nižší molekulovou hmotnost (obvykle 60-80 kDa), charakter sirupovité hmoty a dodávají lepkovému komplexu tažnost. Gluteniny tvoří vysokomolekulární frakci (molekulární hmotnost obvykle kolem 2000 kDa), mají vláknitou strukturu a jsou nositeli pružnosti [6]. Různý poměr elasticity a tažnosti těsta potom umožňuje použití mouky ze zrna potravinářské pšenice buď pro výrobu pečárenských či pečivárenských výrobků. Vyvážená elasticita a tažnost těsta předurčuje použití takových odrůd k pečárenské výrobě kynutých těst, a naopak vysoká tažnost a nízká elasticita lepkových bílkovin je vhodná pro pečivárenské prokypřované výrobky [5].

Gluteniny a gliadiny jako zásobní proteiny mají vysoký obsah prolinu a glutaminu [8]. Gliadiny obsahují více amidického dusíku (glutaminu), což snižuje počet elektronegativních karboxylových skupin a omezuje elektrostatické síly, poutající peptidické řetězce. Gluteniny, obsahují méně glutaminu, jsou kompaktnější, a tedy méně rozpustné.

2.3.2.1 Gliadiny

Tato práce se zaměřuje na obsah gliadinů ve vzorcích pšeničné mouky. Původně byly nazývány prolaminy podle vysokého obsahu aminokyseliny prolinu a glutaminu. Gliadiny jsou zásobní proteiny tvořící lepkový komplex. Většinou se vyskytují ve formě monomerů a výjimečně tvoří agregáty. Dělí se do tří až čtyř skupin podle pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu při elektroforéze v kyselém prostředí (A-PAGE) na α/β , γ , a ω [11], přičemž α -gliadiny mají nejvyšší mobilitu, se snižující mobilitou za nimi následují β , γ , a ω -gliadiny. Jsou to bílkoviny rozpustné ve zředěných alkoholech, ale zcela nerozpustné v absolutním ethanolu. Jejich rozpustnost se zvyšuje postupným ředěním ethanolu a při 55 % dosahuje maxima. Také se nepatrně rozpouštějí ve vodě, kyselinách a alkalických loužích. Koagulují buď zahřevem na 60 až 70 °C nebo při rychlém sušení [8].

Hlavním rysem gliadinů je vysoký genetický polymorfismus, například jedna odrůda může obsahovat až 50 různých gliadinů. Molekulární hmotnost α , β a γ frakcí se pohybuje v rozmezí 30-40 kDa a ω frakce v rozmezí 40-50 kDa [3].

Gliadiny jsou považovány za hlavní faktor, který spouští celiakii, což je běžné autoimunní onemocnění tenkého střeva, pro které je charakteristická citlivost na určité sekvence aminokyselin, jež se objevují ve frakcích prolaminů pšenice, ječmene a žita, tedy gliadinů, hordeinů a secalinů. Lidé s diagnostikovanou celiakií musí dodržovat bezlepkovou dietu. Po požití výše uvedených bílkovinných alergenů dochází k imunitní odpovědi, která poškozuje tenké střevo [11][12]. Mimo zažívací potíže může pšeničná mouka způsobovat také například astma.

2.4 Technologická jakost pšenice

Technologickou jakost pekárenské pšenice ovlivňuje nejen počasí, ale především zvolená odrůda. Na výslednou jakost mohou mít dále vliv faktory, jako jsou klimatické podmínky pěstování (vliv lokality) a agrotechnické postupy, mezi které patří zejména úroveň minerální výživy, výskyt chorob a polehání. Tyto faktory mají aditivní účinek na technologickou jakost potravinářské pšenice [5].

Kvalitní pšeničná surovina, určená pro zpracování ve mlýnech, je dána odrůdovou skladbou potravinářských pekárenských pšeníc. Odrůdy jsou zařazeny do kategorií pekařské jakosti – třída elitní (E), kvalitní (A), chlebová (B) a pšenice nevhodné (C) [5]. Pro zařazení odrůdy je rozhodujících šest základních parametrů; měrný objem pečiva, hodnota sedimentačního testu podle Zelenyho, číslo poklesu, obsah dusíkatých látek, vaznost mouky a objemová hmotnost. Odrůda je zařazena do jakostní skupiny podle znaku, v němž dosahuje nejnižší úrovně [6].

2.4.1.1 Objemová výtěžnost (*Rapid Mix Test*)

Hlavním a nejdůležitějším kritériem kvality je tzv. pekařský pokus (měrný objem pečiva). Ten se používá, protože analytickými metodami je sice možné určit kvantitu bílkovin, nicméně stanovit jejich kvalitu, tak jednoduché není. Platí, že pokud se z mouky upeče dostačující produkt při pekařském pokusu, pak se z ní upeče dostačující produkt i v pekárně [13].

Podle objemové výtěžnosti se odrůdy pšenice zařazují do kvalitativních skupin pro pekárenské využití. Jeho součástí je komplexní hodnocení pečiva. Kromě objemové výtěžnosti se při něm posuzují také další vlastnosti těsta a pečiva, jako např. pružnost těsta, vyvázanost těsta (trhnutí kůrky), hnědnutí pečiva, křehkost kůrky, stejnoměrnost pórů, pružnost střidy a chuť pečiva [5].

2.4.1.2 Obsah dusíkatých látek

V pšeničné mouce se dále stanovuje obsah dusíkatých látek neboli hrubé bílkoviny. Na její obsah má vliv dusíkaté hnojení, teplotní podmínky pěstování a ročník [5]. Se stoupajícím obsahem hrubé bílkoviny se zlepšuje povaha (jakost) těsta a zvyšuje se objem pečiva. Při nízkém obsahu se snižuje tažnost lepku a tím i těsta [5].

Obsah dusíkatých látek se stanovuje zavedenými analytickými metodami. Jednou z absolutních metod je Kjeldahlova metoda. Při této metodě se organické dusíkaté látky mineralizací mokrou cestou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedou na síran amonný. Z něj se v alkalickém prostředí uvolní amoniak, který se stanoví titračně. Obsah dusíku v pšeničné mouce se následně přepočítá na obsah hrubé bílkoviny po vynásobení faktorem 5,7 [7]. Stanovení je popsáno normou ČSN ISO 1871 [14].

Kjeldahlova metoda je sice metodou absolutní, ale je zdoluhavá, naopak rychlou metodou je NIRS (Near-infrared Spectroscopy). Podstatou je analýza světla o vlnových délkách blízké infračervené oblasti odraženého od vzorku nebo vzorkem propuštěného [7]. Kromě obsahu dusíkatých látek, lze stanovit i ostatní složky v mouce, např. vlhkost, popel, škrob, tuk, lepek, aj. [7].

2.4.1.3 Sedimentační test podle Zelenyho

Kvalita a množství lepku se stanovuje sedimentačním testem podle Zelenyho. Při něm se sleduje sedimentace moučné suspenze v prostředí kyseliny mléčné (o předepsané koncentraci). Výsledkem je objem sedimentu v ml [7]. Průběh testu je popsán v normě ČSN EN ISO 5529 [15].

Pro výslednou technologickou jakost potravinářské pšenice není důležitý pouze obsah bílkovin či mokrého lepku, ale především viskoelastické vlastnosti těchto bílkovin a jejich kvalita, umožňující

fermentační procesy v těstě (kynutí) [5]. Obsah mokrého lepku je ovlivněn ročníkem a vlastností odrůdy. Odrůda může mít vysoký obsah mokrého lepku, to ale není rozhodujícím faktorem pro objem pečiva. Lepková bílkovina může mít špatné viskoelastické vlastnosti. Pomocí tohoto testu lze vyřadit nevhodné odrůdy nebo partie zrna s nízkým obsahem bílkovin a nekvalitním lepkem [5].

2.4.1.4 Číslo poklesu (*The Hagberg Falling Number*)

Před sklizní může dojít, v důsledku nadměrného příjmu vlhkosti, k procesu klíčení zrna v klasu. Tento proces má negativní vliv na zásobní látky uložené v endospermu. Číslo poklesu je kritériem, které toto poškození odhaluje. Je výrazně ovlivněno počasím v době dozrávání zrna a sklizně, ale také odrůdou [6]. Jeho stanovení je popsáno normou ČSN EN ISO 3093 [16].

Nízké číslo poklesu snižuje pekařskou kvalitu zeslabením pružnosti střídy pečiva, snižuje schopnost těsta vázat vodu, a to v důsledku vysoké aktivity α -amylasy [5][6]. Pečivo má obvykle malý objem, nevhodnou vyvážanost, těsto je lepivé a těžko zpracovatelné [5]. Naopak vysoké číslo poklesu značí nízkou aktivitu α -amylasy a mouky pak mají sklon vytvářet suché těsto i malý objem výrobku [6].

2.4.1.5 Objemová hmotnost

Ukazatelem mlynářské jakosti je objemová hmotnost, která je dána požadavky normy ČSN EN ISO 7971-3 [17] a silně závisí na pěstitelských podmínkách, ročníku, zdravotním stavu, polehlosti a úrodě. Například po deštivém počasí objemová hmotnost zralého zrna rychle klesá. Nepovažuje se za objektivní měřítko kvality zrna, protože vliv jmenovaných faktorů není jednoznačný [5][6].

2.4.1.6 Vaznost mouky

Vaznost mouky se stanovuje pomocí farinografu a udává, kolik procent vody je mouka schopna vázat. Je závislá na celkovém obsahu bílkovin a bobtnavosti mokrého lepku. Ovlivňuje výtěžnost a stabilitu těsta a je vlastností odrůdy. Mouka z tvrdých zrn vykazuje větší mechanické poškození škrobu a v důsledku toho váže větší množství vody než mouka z měkkozrnných odrůd. Vaznost patří mezi důležitá pekařská kritéria, protože je měřítkem výtěžnosti a stability těsta [5]. Farinografická zkouška je popsána v normě ČSN ISO 5530-1 [18].

2.4.1.7 Doplnková kritéria

Mezi doplňková kritéria se řadí obsah mokrého lepku, obsah popela v zrně pšenice, tvrdost zrna, hmotnost tisíce zrn a výtěžnost mouky T-550 [5].

Stanovení obsahu mokrého lepku spočívá v tom, že se z těsta připraveného z testované mouky vypere bílkovina pomocí 2 % roztoku NaCl. Odstraněním přebytečné vody se z lepku získá tzv. mokrý lepek. Ten se zváží a výsledkem stanovení po přepočtu na sušinu mouky je % mokrého lepku v sušině vzorku [7]. Stanovení obsahu mokrého lepku je popsáno v normách ČSN 46 10 11-9 část 9 [20] a ČSN 56 05 12-10[21].

Popel v sušině se stanovuje podle výše zmíněné metody NIR nebo spalováním v peci, podle normy ČSN ISO 2171 (46 10 19) [22].

2.5 Metody stanovení gliadinů

Nejčastější metodou separace a stanovení gliadinů je gelová elektroforéza. Princip dělení je založen na pohyblivosti jednotlivých v rámci síťového efektu a zároveň na elektroforetické pohyblivosti dělených látek [23].

Nejběžněji používaným nosičem je polyakrylamidový gel. Je inertní, mechanicky pevný, průhledný a je možné si ho předem připravit v požadovaných vlastnostech, jako jsou hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu aj. Připravuje se kopolymerací dvou monomerů – akrylamidu a N, N'-methylenbis(akrylamidu). Iniciátorem kopolymerace je peroxodisíran amonný a stabilizátorem je tetramethylethyldiamin (TEMED) [23].

Polyakrylamidový gel je tvořen strukturou otevřených pórů určité velikosti, obsahující kapalinu s pufrem. Bílkoviny, které jsou velikostí podobné velikosti póru, se do nich zachytávají, a tak se ve svém pohybu opoždějí. Díky tomuto efektu se dělí podle své velikosti [23].

Mezi různými elektroforetickými metodami je nejčastější metodou pro stanovení gliadinů elektroforéza při kyselém pH (A-PAGE) [24]. Tato metoda probíhá za nativních podmínek, tím pádem nedochází k denaturaci bílkovin a zůstává zachována jejich sekundární i terciární struktura. Díky tomu je možné separovat molekuly na základě jejich tvaru a velikosti náboje. Kyselé pH se udržuje pomocí pufru tvořeného kyselinou octovou a glycinem na hodnotě okolo 3. Protonací postranních řetězců aminokyselin v kyselém prostředí získají veškeré proteiny stejný náboj, a proto se pohybují ke katodě [25].

Po dokončení elektroforetického dělení je nutné vzniklé zóny bílkovinných frakcí zviditelnit pomocí nejrozličnějších technik. Obvykle se barví ponořením gelu do alkoholového roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250 a G-250). Proteiny jsou v tomto roztoku jednak denaturovány a tím i fixovány, jednak se vytvářejí komplexy barvivo-protein [23].

Ke kvantitativnímu hodnocení zón se obvykle používá počítačová denzitometrie (podrobněji viz s. 20).

2.6 Globální změna klimatu

Klima (podnebí) je definováno jako „režim povětrnostních stavů (počasí) na určitém místě nebo v určitém prostoru, odvozený od měření meteorologických jevů za dlouhou řadu let“ [26]. Pojem globální změna klimatu se myslí odchylka od dlouhodobých klimatických parametrů Země. Mezi tyto parametry můžeme zařadit například teplotu, srážky, rychlost větru a jsou porovnávány s měřenými hodnotami těchto parametrů od počátku 20. století [27].

Klima na planetě Zemi se v minulosti proměňovalo. Za posledních 650 000 let proběhlo sedm cyklů, při kterých došlo střídavě k postupu a ústupu ledovců. Poslední doba ledová náhle skončila před asi 7 000 lety a tím začala moderní klimatická éra – éra lidské civilizace. Současný trend ohřívání planety má zvláštní význam, jelikož je extrémně pravděpodobné, že jeho velká část (pravděpodobně více než 95 %) je způsobena lidskou činností a od poloviny 20. století narůstá nevídanou rychlostí. Průměrná teplota planety stoupla od konce 19. století přibližně o 1,1 °C [28]. Je nevyvratitelným faktem, že dochází k tání ledu v arktickém moři, na všech kontinentech ustupují horské ledovce a sněhové pokrývky a urychluje se tání grónské a antarktické ledovcové pokrývky. Tání sněhu a ledu, kromě zvyšující se hladiny světových oceánů, způsobuje další oteplování, a to proto, že sníh a led odrážejí sluneční paprsky, pokud ale roztají, na jejich místě se objeví tmavší povrch, který tepelné paprsky naopak absorbuje, a to ve svém důsledku způsobuje další oteplení a následné tání [29].

Nejvýraznějším projevem antropogenního původu globální změny klimatu je zvýšený skleníkový efekt. Ten je způsobený vyšší produkcí takzvaných skleníkových plynů, mezi které se řadí oxid uhličitý, metan, oxidy dusíku, freony, ale i vodní pára, jejíž produkce není jednoznačně ovlivněna lidskou činností, ale lidé výrazně zasahují do koloběhu vody [27]. Je třeba zmínit, že přirozený skleníkový efekt je nutný k udržení obyvatelné teploty planety Země. Jeho principem je, že výše zmiňované skleníkové plyny absorbují tepelné záření povrchu Země a nižších vrstev atmosféry a poté odrážejí velkou část této energie zpět na povrch. Nicméně, při zvýšených koncentracích skleníkových plynů způsobených lidskou činností se tento, původně kladný, efekt zintenzivňuje a dochází k nebývalým změnám v zemském klimatu [29]. Oteplování Země není rovnoměrné, a proto dochází k velkým změnám průměrných lokálních teplot. Globální a lokální oteplování způsobuje nárůst intenzity a četnosti extrémních meteorologických jevů a velké změny v přírodě [30]. Některé části světa čekají častější nebo vážnější sucha a záplavy, naproti tomu jiné oblasti, například subarktické, se mohou stát obyvatelnějšími. Tyto změny mají vliv nejen na přírodní systém, ale v rámci systému sociálního způsobí problémy spojené s environmentální migrací [30].

2.7 Vliv klimatických změn na rostliny

Teplota hraje hlavní roli v prakticky každém aspektu růstu a vývoje rostliny. Ovlivňuje fotosyntézu, dýchání, vývoj rostliny a růst kořene. Každá rostlina má určité optimální rozmezí teplot, ve kterém je její růst a vývoj největší [31]. Aby se zlepšila zemědělská produkce v rámci omezené půdní plochy, je nutné zajistit výnosnější sklizeň navzdory nepříznivým podmínkám [31]. S podrobnými znalostmi reakcí různých druhů na vnější prostředí, a se znalostí genetických manipulací, jež máme dnes k dispozici, by nemělo být obtížné přizpůsobit plodiny ve velkých částech světa novým klimatickým poměrům. Mělo by se to podařit přinejmenším v případě plodin, které dozrávají během jednoho nebo dvou roků [2][31].

Jak již bylo řečeno, předpokládá se, že srážky, v blízké budoucnosti, budou nerovnoměrně rozloženy v průběhu roku. To znamená, že naroste četnost a závažnost period sucha [27]. Stres suchem se projevuje poklesem dostupnosti vody v půdě, který vede k omezení růstu a transpirace rostlin [27]. Velkým faktorem ovlivňujícím metabolismus rostlin je obsah volného oxidu uhličitého v atmosféře.

2.7.1 Vliv zvýšené koncentrace CO₂

Z historického hlediska není zvýšená koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře ničím nevídaným. Při přechodech z doby ledové do meziledové docházelo ke změně jeho koncentrace asi o 30 %. To napovídá, že v uplynulých 150 000 letech byly koncentrace CO₂ a změny klimatu těsně spojeny. Pokles jeho koncentrace značil příchod doby ledové a jeho nárůst příchod doby meziledové. Nikdy však nedocházelo ke změnám jeho koncentrací v tak krátkém časovém úseku a s takovou rychlostí jakou registrujeme v současnosti, kdy rostliny nejsou schopny adekvátně reagovat adaptací svých vlastností [32].

Primárními reakcemi na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře jsou změny rychlostí fotosyntézy, fotorespirace a vodivosti průduchů [32]. Zjednodušeně se dá říci, že stimuluje rychlost fotosyntézy a potlačuje fotorespiraci. Tento jev je výrazný zejména u C-3 rostlin [27]. Při urychlení asimilace CO₂ (při jeho zvýšené atmosférické koncentraci) dochází k nárůstu kořenové biomasy, jak hlavního, tak i jemnějšího vlášení a díky tomu může rostlina zvýšit příjem živin [27].

2.7.2 Vliv zvýšené teploty

Zvýšená koncentrace skleníkových plynů je provázena zvýšením teploty [32]. Nárůst teploty mění průběh vegetační sezóny. Na jaře se vyšší teplota projeví urychlením fotosyntézy a růstu, naopak na

podzim se projeví jako urychlení dekompozičních procesů. To vytváří negativní bilanci uhlíku v ekosystémech, protože na jaře je příjem uhlíku vyšší a na podzim nižší [27]. Dalším faktorem změny půdního koloběhu uhlíku jsou takzvané jarní mrazíky, jelikož dochází k změnám koloběhu živin a změnám struktury poškozených porostů. Navíc je známo, že rostliny adaptované na vyšší koncentraci oxidu uhličitého jsou náchylnější k mrazům, protože listy takových rostlin omezují transpiraci a jsou tedy přizpůsobeny vyšším teplotám [27].

2.7.3 Fotosyntéza

Fotosyntetizující organismy, jako jsou zelené rostliny, převádějí oxid uhličitý a vodu na organické sloučeniny uhlíku při procesu nazývaném fotosyntéza. Tento děj zahrnuje dva procesy. Prvním je tzv. světelná fáze, při které se oxiduje voda za vzniku kyslíku, ATP a NADPH, které je redukčním činidlem v druhé fázi. Ta se nazývá Calvinův cyklus a dochází při ní k vazbě oxidu uhličitého a produkci cukrů [33].

Za zvýšené teploty rychlost fotosyntézy prudce klesá. Tento pokles je spojován s omezenou funkcí fotosystému II (PSII), která nastává z důvodu nestability tylakoidové membrány (dochází k její dezorganizaci) a ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy (Rubisco) [31][33]. Teplotní stres také ovlivňuje elektronový transport a tím různě postihuje PSII a PSI [34]. Právě fotosystém II je nejcitlivějším bílkovinným komplexem při fotosyntéze, protože vysoké teploty přímo deaktivují komplex, který vyvíjí kyslík, a dokonce i teplotní stres v menším rozsahu způsobí jeho deaktivaci [31].

Dále při teplotním stresu dochází k dramatické ztrátě pigmentu, a navíc se zvyšují nároky na dýchání (převod bílkovinných komplexů), čímž se snižuje počet látek potřebných pro růst rostliny. Například zvýšení teploty z 18 na 33 °C zvýší rychlost dýchání o více než 80 % [31].

V průběhu fotosyntézy CO₂ reaguje s ribulosa-1,5-bisfosfátem za tvorby glycerát-3-fosfátu, ten je redukován na triosa-fosfát. Většina triosa-fosfátů se uchovává v chloroplastu. Tato proměna uvolňuje anorganický fosfát (Pi), který se vrací do chloroplastu, kde dochází k syntéze ATP. Tato regenerace ATP je nezbytná pro ideální fixaci uhlíku.

Při zvýšené teplotě dochází k inhibici fotosyntézy. Toto je možná způsobeno snížením aktivace enzymu Rubisco, jehož aktivita je inhibována zvýšenou teplotou. Tento enzym je velmi citlivý na teplotní denaturaci už při mírných podmínkách. Teplotní stres také ovlivňuje elektronový transport a tím různě postihuje PSII a PSI [34].

Jak již bylo zmíněno, opačný efekt nastává při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře. Ten urychluje rychlost fotosyntézy zejména při vyšších ozářeních. Enzym Rubisco je kvantitativně nejvýznamněji ovlivněn oxidem uhličitým, protože rostliny jsou saturovány tímto plynem, a tak se zvýší rychlost karboxylace, a navíc je inhibována oxygenasová aktivita enzymu Rubisco neboli fotorespirace, která rychlost fotosyntézy za standardní koncentrace CO₂ snižuje [32]. Přímé působení CO₂ se projevuje nejen v souvislosti s aktivitou enzymu Rubisco, ale i v souvislosti s jeho regulačními účinky na vazbu atomů manganu na donorové straně a vazbu chinonů na akceptorové straně PSII [32].

Propojením těchto dvou efektů – vyšší teploty a vyššího obsahu CO₂, získáme stále pozitivní vliv na fotosyntézu. Vyšší obsah oxidu uhličitého totiž zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy, a tak kompenzuje negativní vliv zvýšené teploty [32].

2.7.4 Transpirace

Transpirace je děj, při kterém je z povrchu rostliny vydávána voda. Tímto mechanismem rostlina ovlivňuje svou teplotu a také působí jako hlavní mediátor ztrát energie. Její rychlost je dána tzv.

deficitem tlaku par (vapour pressure deficit, VPD) mezi vnitřkem listů a okolním vzduchem a dalšími fyzikálními faktory, mezi které patří teplota listů a vzduchu, rychlost větru a podobně [18].

Transpirace rostlin je nejběžnější a nejúčinnější metodou, jak zchladit rostlinná pletiva. S teplotou také rostou požadavky na ni. Obecně se rychlost transpirace zvyšuje se zvyšující se teplotou rostliny, a tak dochází k velkým ztrátám vody v rostlině [31]. Reakcí na stres sucha je snížení transpirace. Její omezení má negativní dopad na vodní potenciál, který klesá, a tak dochází k řetězové reakci. Snížení vodního potenciálu indukuje uzavření průduchů a současně je limitován příjem oxidu uhličitého ve fotosyntetických reakcích. Následně se tak snižuje zásobování rostlinných pletiv živinami [27].

2.8 Vliv klimatických změn na pšenici

Při vyšších teplotách dochází ke snížení sklizně zrn, jejich počtu a kvality. Nejcitlivějším obdobím je období rozkvétání, připisuje se to zrychlenému růstu, redukované fotosyntéze a přímým vlivem na reprodukční procesy. Jako horní hraniční teplota pro pšenici je obecně přijímána hodnota 31°C. To znamená, že do této teploty by nemělo docházet ke snížení výtěžku zrn, v závislosti na fázi vývoje rostliny, genotypu a přístupu vody [31].

Kromě přímého negativního důsledku teplotního stresu na fertilitu pylu a sterilizaci zrna, je také negativně ovlivněno jeho plnění. Konečná hmotnost zrna je určena délkou a rychlostí jeho plnění. Je řízena fotosyntézou, respektive úrovní asimilačních produktů, v listech a stéble, a také remobilizací skladovaných uhlíkatých a dusíkatých sloučenin a jejich následným transportem do klasu a zrna. Jako taková je tedy hmotnost zrna extrémně citlivá na teplotní stres, který zásadně snižuje fotosyntézu, a tedy i plnění zrna [31].

Při zkoumání vlivu nedostatku vody na růst pšenice, je důležité vzít také v potaz její interakci s koncentrací CO₂ a dostupnost vody. Pokud je rostlina dobře zásobena vodou klesá její spotřeba vody asi o 2 % [32]. Při zvýšené koncentraci CO₂ se může kompenzovat až 30 % nepříznivého vlivu stresu suchem na rychlost čisté fotosyntézy. Míra aklimace rostlin pšenice, která se projevuje poklesem hodnot rychlosti fotosyntézy a některých dalších fotosyntetických parametrů, závisí na ostatních podmínkách růstu. Při zajištění optimální minerální výživy a dostatku vody je patrný jen minimální pokles obsahu fotosyntetických bílkovin, přičemž nedochází k poklesu obsahu enzymu Rubisco, světlosběrných komplexů nebo chlorofylu [32].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Experiment koncipovali a provedli pracovníci Ústavu výzkumu globální změny Akademie věd České republiky ve spolupráci s Mendelovou univerzitou. Pro experiment byly použity dva genotypy pšenice ozimé: Hyfi a Julie. Osivo bylo zaseto v říjnu 2014 do černých plastových nádob s vnitřními rozměry $10,5 \times 10,5 \times 21,5$ cm v množství dvou zrn na jednu nádobu. Půda použitá do nádob pocházela z experimentální stanice v Polkovicích na Moravě. Půdní typ byl na základě měření klasifikován na luvickou černozem s půdotvorným substrátem spraš. Nádoby byly v hale Mendelovy univerzity v Brně vystaveny okolním meteorologickým podmínkám až do dosažení fáze naduřování horní listové pochvy, která předchází fázi metání. Jako ochrana před zmrznutím byl okolo nádob použit keramzit. Hnojení proběhlo jednorázově v březnu 2015 vodným roztokem dusičnanu amonného v koncentraci 0,29 g dusičnanu ve 14 ml vody na jednu nádobu. Vzorky byly ošetřeny fungicidy a insekticidy a v květnu 2015 převezeny do Ústavu globální změny AV ČR, kde byly umístěny do kultivačních komor pro jednotlivé teploty.

V období kvetení byly simulovány stresy nedostatku půdní vláhy a vysoké teploty s teplotními maximy 26 °C v kontrolní komoře, 29 °C, 32 °C, 35 °C a 38 °C. V tabulce 1 jsou uvedeny podmínky v jednotlivých komorách: různé teploty v každé komoře, naopak stejně byly v každé komoře nastaveny fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a relativní vlhkost (RV). Pro variantu stresu suchem byla vlhkost půdy udržována pod 30 %, kontrolní, optimálně zalévaná varianta nad 70 %. Po 14 dnech stresového režimu byly rostliny vyjmuty z komor a vystaveny aktuálnímu počasí. Po sklizni byly vzorky zrn rozemlety na mouku a dále byly zpracovány v rámci experimentální části této bakalářské práce.

Tabulka 1: Podmínky v kultivačních komorách (K) – denní teploty (Komora 1 = kontrolované podmínky), fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a relativní vlhkost (RV). (Převzato s laskavým svolením Ing. Karla. Klema, Ph.D. z Ústavu výzkumu globální změny.)

Čas	K 1 t (°C)	K 2 t (°C)	K 3 t (°C)	K 4 t (°C)	K 5 t (°C)	FAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	RV (%)
0:00	20	20	20	20	20	0	85
4:00	18	18	18	18	18	0	90
6:00	18	18	18	18	18	0	90
12:00	26	29	32	35	38	1500	45
14:00	26	29	32	35	38	1500	45
20:00	22	22	22	22	22	0	75
24:00	20	20	20	20	20	0	85

3.2 Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle normy ČSN 46 1085-2 [24]. Gliadiny se z mouky extrahovaly 25% roztokem 2-chlorethanolu a podrobily se elektroforetické separaci při pH 3,2 při stabilizovaném napětí 480 V. Tím se rozdělily podle hmotnosti a povahy povrchového náboje. Poloha a intenzita proteinových zón odpovídá genetické konstituci, a proto je možné považovat elektroforeogram za „otisk prstu“ daného genotypu.

3.2.1 Přístroje

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

Zařízení pro vertikální deskovou elektroforézu s délkou gelu 160 až 200 mm (včetně příslušenství gelových kazet, stojanu na odlévání gelů, hřebenu pro vytvarování nanášecích jamek v gelu apod.) – Owl Separation Systém, Inc., Portsmouth, NH USA

Stejnoseměrný stabilizovaný napájecí zdroj pro elektroforézu – Major Science-MP-500P

Laboratorní odstředivka 5430 R, firma EPPENDORF

Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE

Třepačka KS 130BASIC, firma IKA

Vortex – Stuart, firma MERCI

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

Bis-akrylamid (SIGMA ALDRICH)

Močovina (MERCK)

Kyselina askorbová (SIGMA ALDRICH)

Síran železnatý (LACHNER), 0,15 % vodný roztok připravený těsně před každým použitím

Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH), 10 % vodný roztok

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

2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)

Pyronin Y (SIGMA ALDRICH)

Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)

Glycin (SIGMA ALDRICH)

Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA ALDRICH)

3.2.3 Příprava roztoků

Extrakční roztok pro gliadiny: 25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu G se doplní vodou do 100 ml. Roztok se skladuje v chladničce.

Elektrodotý tlumivý roztok: 4,0 ml ledové kyseliny octové a 0,4 g glycinu se doplní vodou do 1000 ml odměrné baňky. Roztok se udržuje v chladničce.

Gelový tlumivý roztok: K 20 ml ledové kyseliny octové a 1,00 g glycinu se přidá 1000 ml vody. Roztok se udržuje v chladu.

Fixační roztok: 100 g kyseliny trichloroctové se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.

Barvicí roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 se rozpustí v ethanolu a doplní se ethanolem na objem 100 ml.

3.2.4 Příprava vzorků

Extrakce gliadinů byla provedena podle normy ČSN 46 1085-2 [27]. Do mikrozkušavky Eppendorf bylo naváženo asi 50 mg pšeničné mouky, což zhruba odpovídalo hmotnosti jednoho zrna. Bylo přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny. Obsah byl důkladně promíchán na vortexu a ponechán v uzavřené kyvetě přes noc při asi 4-8 °C v chladničce. Následně byla směs odstředována po dobu 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu a supernatant byl použit k elektroforéze.

3.2.5 Příprava polyakrylamidového gelu

Do asi 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo přidáno v tomto pořadí 10,00 g akrylamidu, 0,40 g bisakrylamidu, 6,00 g močoviny, 0,10 g kyseliny askorbové a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna do objemu 100 ml gelovým tlumivým roztokem. Pak byla směs vychlazená na 6 °C, najednou bylo přidáno 0,2 ml roztoku peroxodisíranu amonného a 0,3 ml TEMEDu, směs byla promíchána a hned vlita do vychlazené gelové kazety. Na povrch kazety byl umístěn hřeben, aby se vytvořily vzorkové prohlubně. Gelový roztok musí kazetu přeplnit, čímž je zabezpečena dostatečná polymerace horního okraje gelu. Polymerace proběhla během 5 minut.

3.2.6 Elektroforéza

Gel (v kazetě) byl vytáhnut ze stojanu, hřeben byl vytáhnut z gelu a skla se vyčistila od přebytečného gelu ethanolem. Poté byly prohlubně pro dávkování vzorků promyty elektrodovým tlumivým roztokem a kazeta s gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury. Elektrodový tlumivý roztok byl nalit do aparatury do takové hladiny, aby zalil elektrody. Zdroj napětí byl zapojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody, anody, k záporné elektrodě ve spodní části aparatury. Po dobu 60 minut byla spuštěna tzv. „předelektroforéza“ – probíhala bez nadávkovaných vzorků při konstantním napětí 480 V. Po uplynutí této doby byl zdroj napětí vypnut a do jamek byly nadávkovány připravené vzorky (extrakty) v množství 5 µl. Přístroj byl opět spuštěn po dobu dvojnásobné doby běhu barviva pyroninu Y v čele. Doba elektroforézy byla stanovena na přibližně 4 hodiny. V průběhu elektroforézy bylo nutné celou aparaturu chladit studenou vodou kvůli velikosti vloženého napětí.

3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin

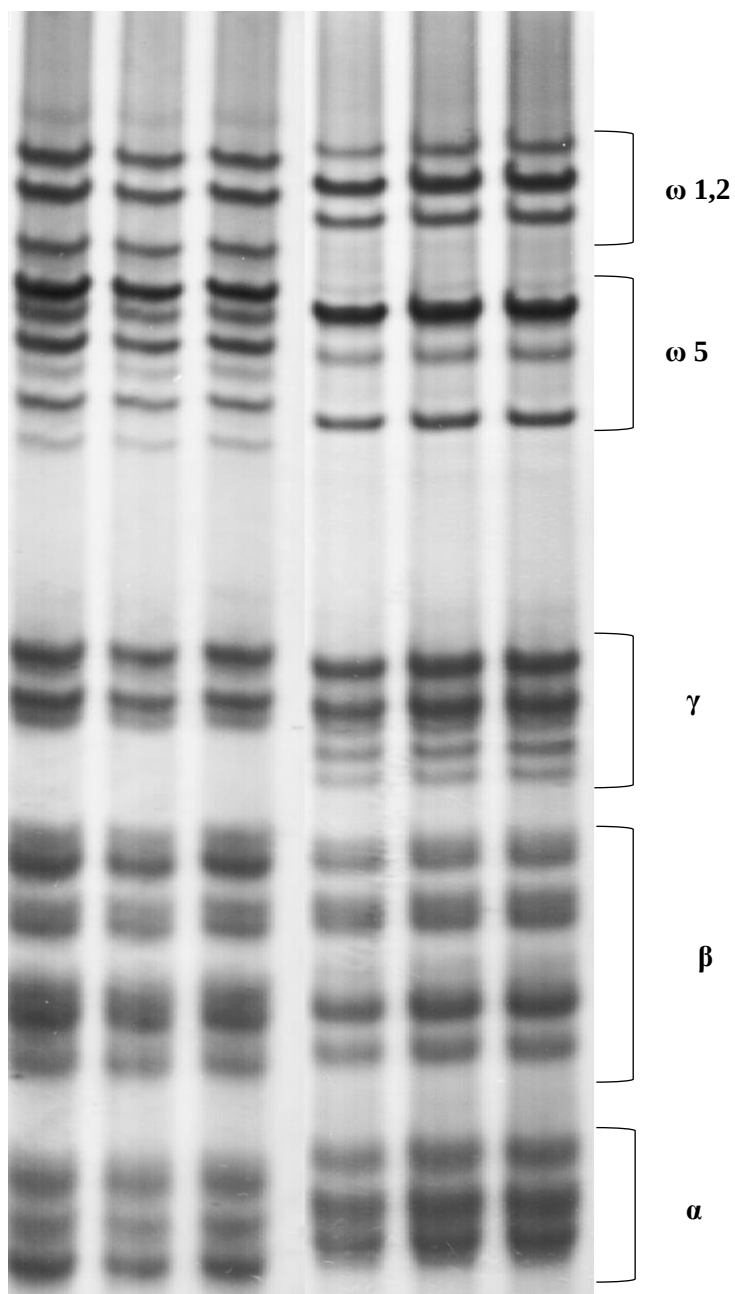
Po skončení elektroforézy byla kazeta s gelem ponořena do destilované vody v připravené misce. Gel byl uvolněn ze skel do vody a byly odříznuty vzorkovací prohlubně. Destilovaná voda byla z misky vylita a gel byl převrstven směsí 300 ml fixačního roztoku a 15 ml barvicího roztoku, tak aby byl gel během barvení zcela ponořen. Miska s gelem byla umístěna po dobu 24 hodin na třepáčku. Po obarvení gelu byl roztok z misky vylit a gel byl promyt vodou z vodovodu, tak aby bylo odstraněno přebytečné barvivo. Gel (s popiskem vzorků) byl uchováván na skle zabalený do potravinářské fólie, která jej chránila před vyschnutím, v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3 Vyhodnocení gelů

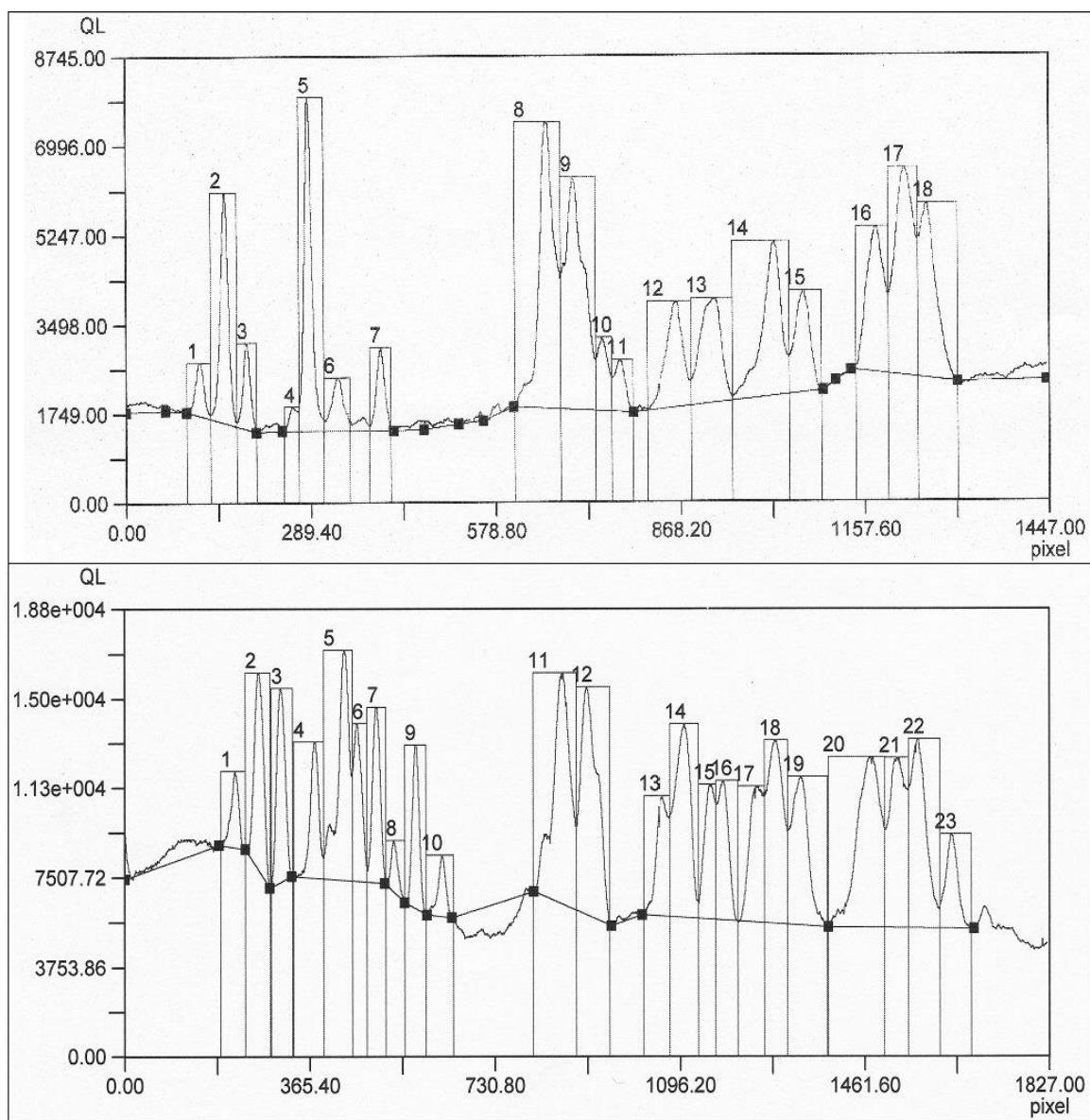
Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace gliadinových frakcí byla provedena počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.1). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Kvůli nedostupnosti standardu nebyly tyto plochy píků přepočteny na koncentraci. Pro porovnání jednotlivých variant byly tedy použity příslušné plochy píků [38].

4 VÝSLEDKY

Zkoumány byly dvě odrůdy pšenice, a to Julie a Hyfi. U Julie bylo identifikováno a stanoveny 18 gliadinových frakcí, u Hyfi 23 frakcí. Rozdělení jednotlivých frakcí lze pozorovat na obrázku 2, chromatogramy pro stanovení jednotlivých frakcí jsou na obrázku 3.



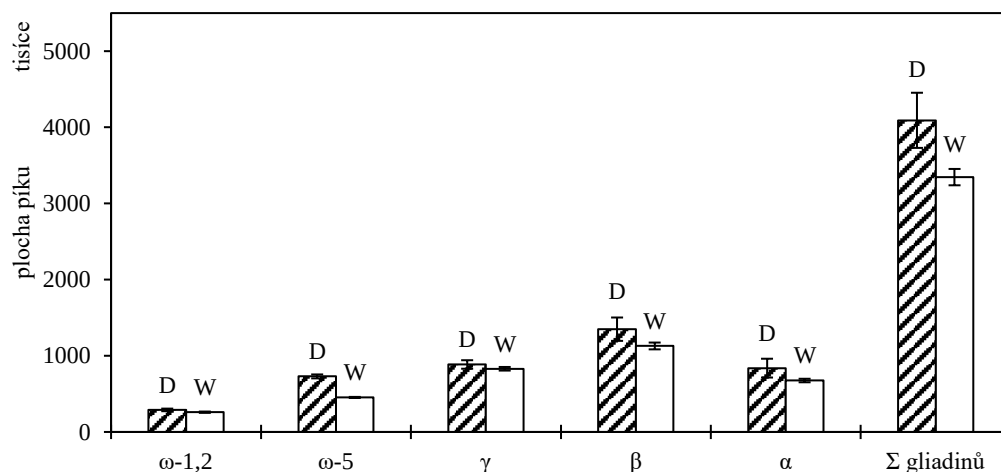
Obrázek 2: A-PAGE gliadinových frakcí pro odrůdy Hyfi (první tři sloupce zleva) a Julie



Obrázek 3: Ukázka chromatogramů, horní chromatogram je pro analýzu odrůdy Julie, spodní pro odrůdu Hyfi

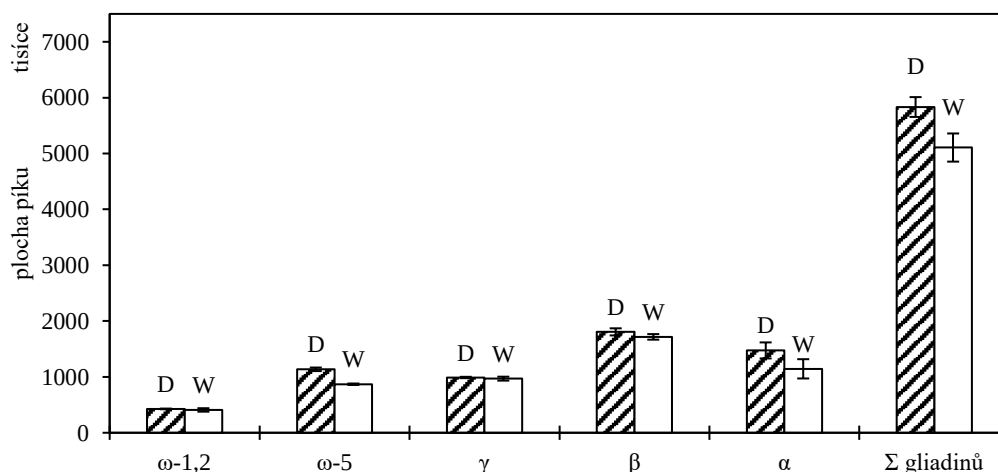
4.1 Srovnání obsahu gliadinů při kultivaci za mokra a sucha

4.1.1 Odrůda Hyfi



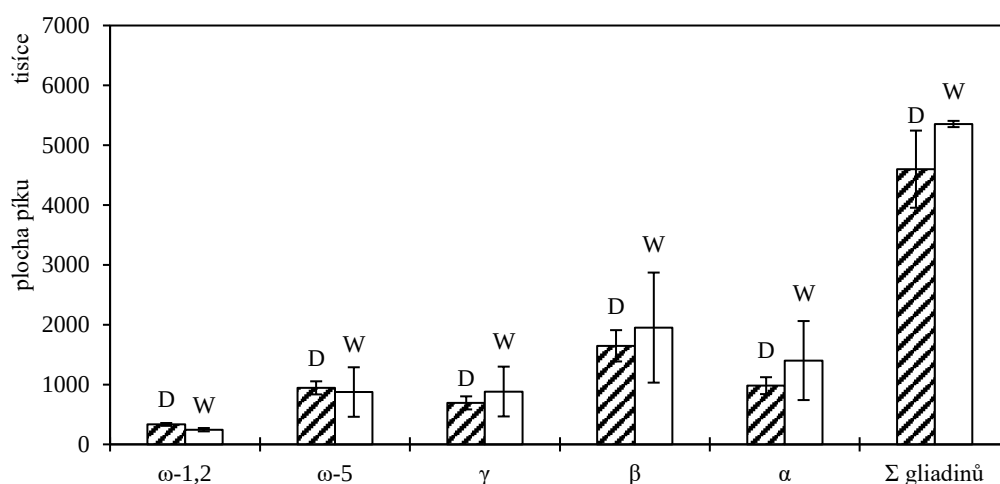
Graf 1: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí odrůdy Hyfi při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) při teplotě 26 °C

Při kultivační teplotě 26 °C (graf 1) byl celkový obsah gliadinů za sucha o 18 % vyšší než u varianty zavlažované. Významný nárůst obsahu gliadinů ve prospěch suché varianty byl zjištěn u frakcí α , β a ω -5 (pro kterou byl nárůst nejvyšší, a to o 24 %), u ostatních frakcí byly rozdíly na hranici statistické chyby.



Graf 2: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí odrůdy Hyfi při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) při teplotě 32 °C

Při kultivační teplotě 32 °C jsme zjistili vyšší obsah gliadinů za sucha u všech frakcí, ale s menšími rozdíly než při teplotě 26 °C (graf 2). Jedinými frakcemi, při kterých byl významný nárůst ve prospěch suché varianty byly frakce ω -5 a α . Celkový obsah gliadinů při kultivaci za sucha byl o 12 % vyšší než za vlhka.

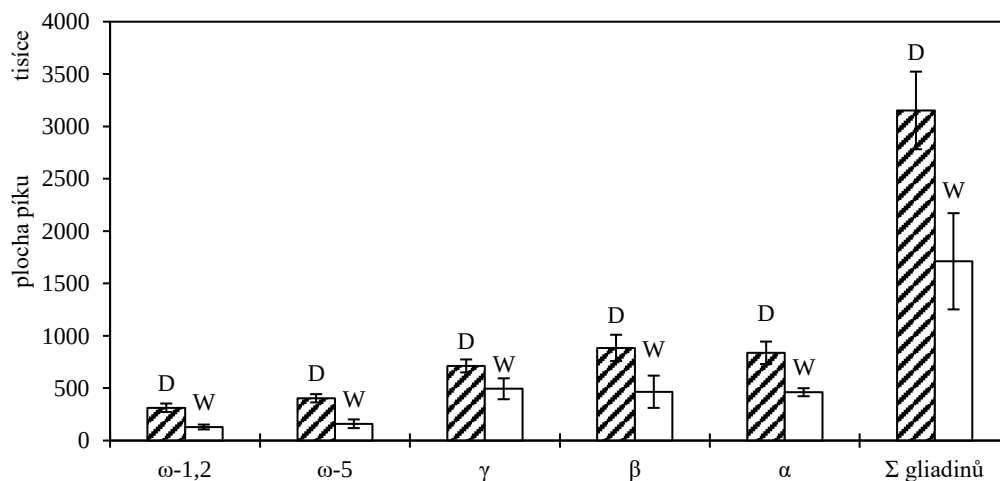


Graf 3: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí odrůdy Hyfi při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) při teplotě 38 °C

Při kultivační teplotě 38 °C byly rozdíly mezi suchou a vlhkou variantou v rámci statistické chyby (graf 3). Je tedy zřejmé, že v tomto případě je teplota limitujícím faktorem

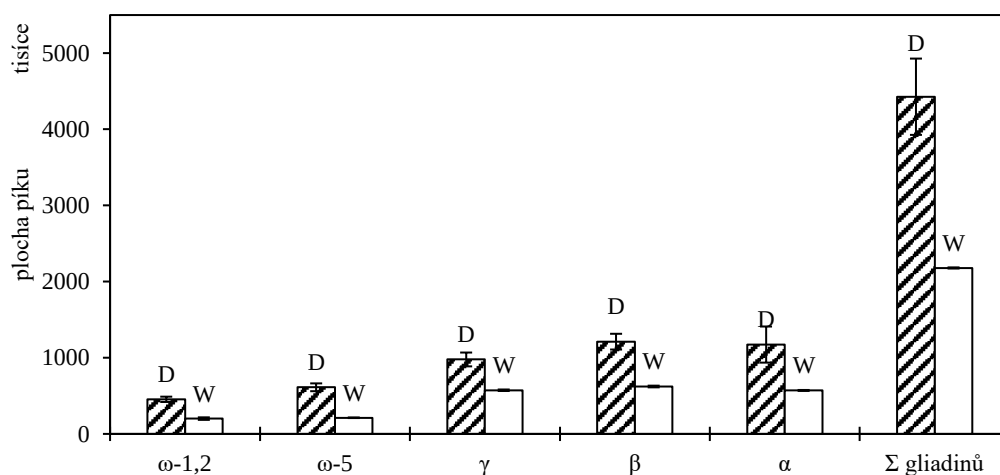
4.1.2 Odrůda Julie

Odrůda Julie vykazovala větší rozdíly v obsahu gliadinů mezi kultivací za sucha a zavlažovanou variantou než odrůda Hyfi.



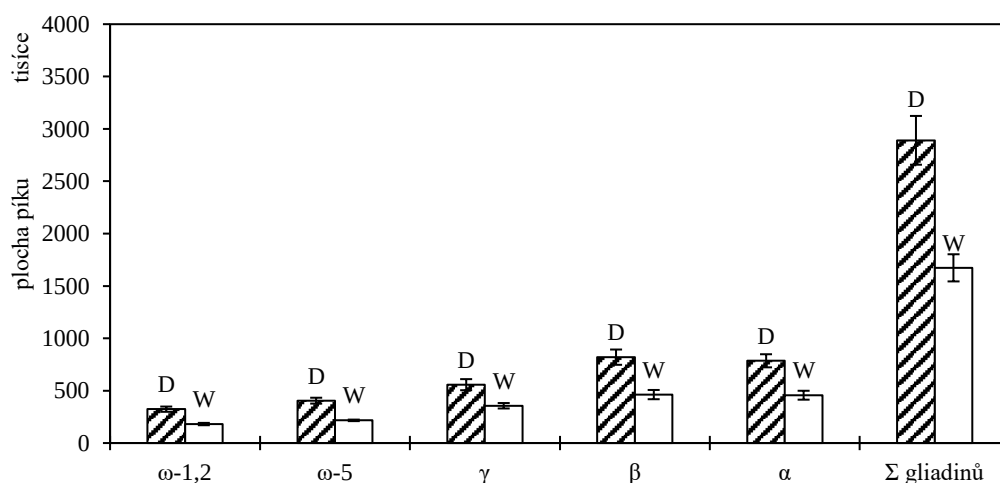
Graf 4: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) odrůdy Julie při teplotě 26 °C

Při kultivační teplotě 26 °C (graf 4) byl pozorován vyšší celkový obsah gliadinů za sucha než za vlhka o 46 %. Pro frakci ω-5 byl zjištěn největší nárůst (o 60 %), frakce ω-1,2 vykazovala nárůst o 59 %, u frakce γ byl pozorován nejmenší rozdíl, a to 31 %. Suchá varianta měla o 47 % více proteinů frakce β a o 45 % více gliadinů frakce α.



Graf 5: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) odrůdy Julie při teplotě 32 °C

Při kultivační teplotě 32 °C (graf 5) vykazovaly všechny frakce vyšší obsah gliadinů za sucha než za vlhka. Frakce ω-1,2 se lišila o 56 %. Frakce ω-5 vykazovala největší rozdíl, a to o 65 %, u frakce γ byl stanoven nejmenší rozdíl, a to na 41 %. Rozdíl u frakce β byl stanoven na 49 % a u frakce α na 51 %. Celkový obsah gliadinů se mezi kultivací za sucha a za vlhka lišil o 51 %.

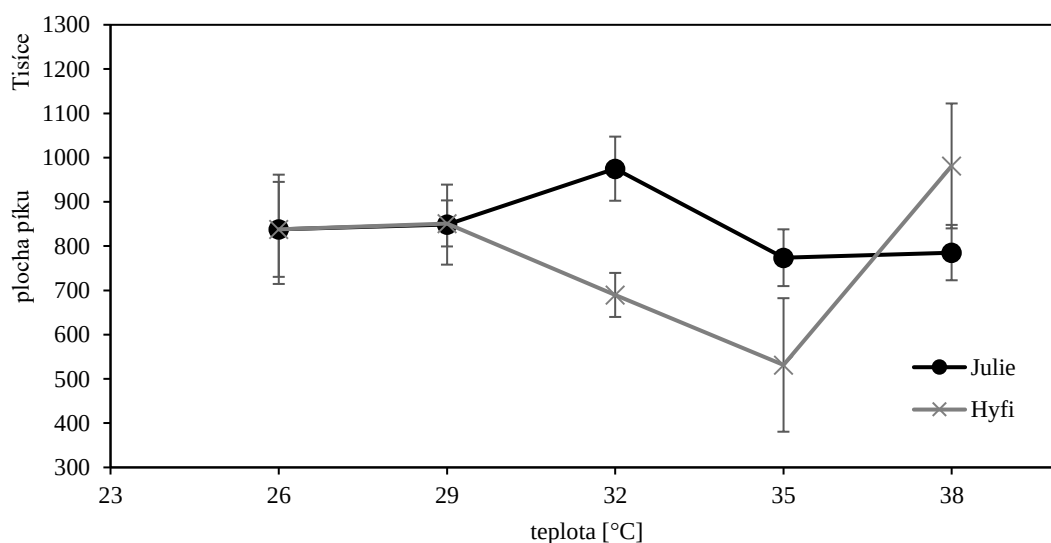


Graf 6: Srovnání obsahu gliadinů jednotlivých frakcí při kultivaci za sucha (D) a vlhka (W) odrůdy Julie při teplotě 38 °C.

Při kultivační teplotě 38 °C (graf 6) byl celkový obsah gliadinů za sucha vyšší o 42 % než u zavlažované varianty. Pro frakce ω-1,2 a ω-5 byl pozorován rozdíl 44 a 47 %. U frakce γ byl stanoven rozdíl 36 %. Obsah frakce β se lišil o 44 % a u frakce α byl zjištěn rozdíl 42 %.

4.2 Závislost obsahu gliadinů na teplotě kultivace při současném stresu suchem

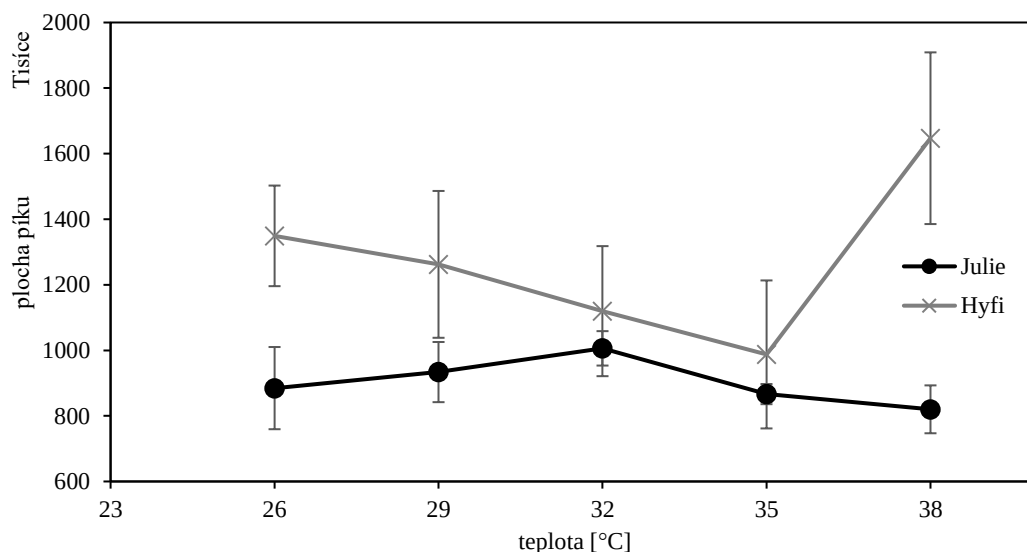
4.2.1 Porovnání frakcí α gliadinů mezi odrůdami



Graf 7: Obsah α -gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Obě odrůdy vykazovaly rozdílný charakter odezvy na teplotu kultivace při současném stresu suchem (graf 7). Maximální obsah α -gliadinů u odrůdy Julie byl zjištěn při 32 °C. Odrůda Hyfi vykazovala mírný pokles obsahu α -gliadinů se zvyšující se teplotou až do 35 °C. Velké hodnoty směrodatné odchylky při teplotách 35 °C a 38 °C však svědčí o tom, že tyto hodnoty jsou zatíženy velkou chybou.

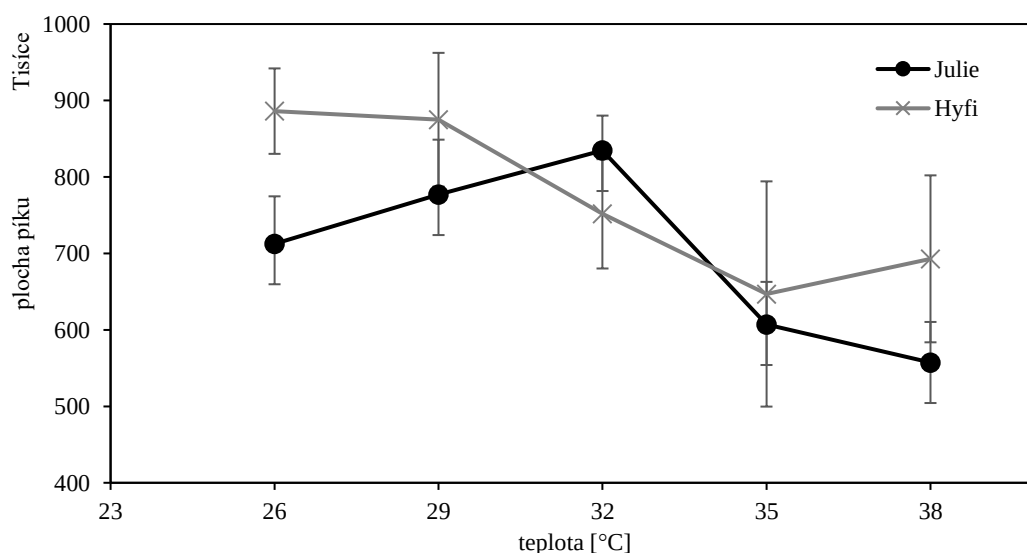
4.2.2 Porovnání frakcí β gliadinů mezi odrůdami



Graf 8: Obsah β -gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Závislost na teplotě kultivace pro β -gliadiny je znázorněna ve výše uvedeném grafu 8. Lze z něj vyčíst, že u odrůdy Hyfi došlo ke statisticky nevýznamnému poklesu této gliadinové frakce při rozmezí teplot 26 °C až 35 °C a k nárůstu při teplotě 38 °C. Opačný charakter teplotní závislosti vykazovala odrůda Julie. U ní došlo k mírnému nárůstu obsahu β -gliadinů od teploty 26 až 32 °C, a poté k poklesu při teplotě 35 a 38 °C.

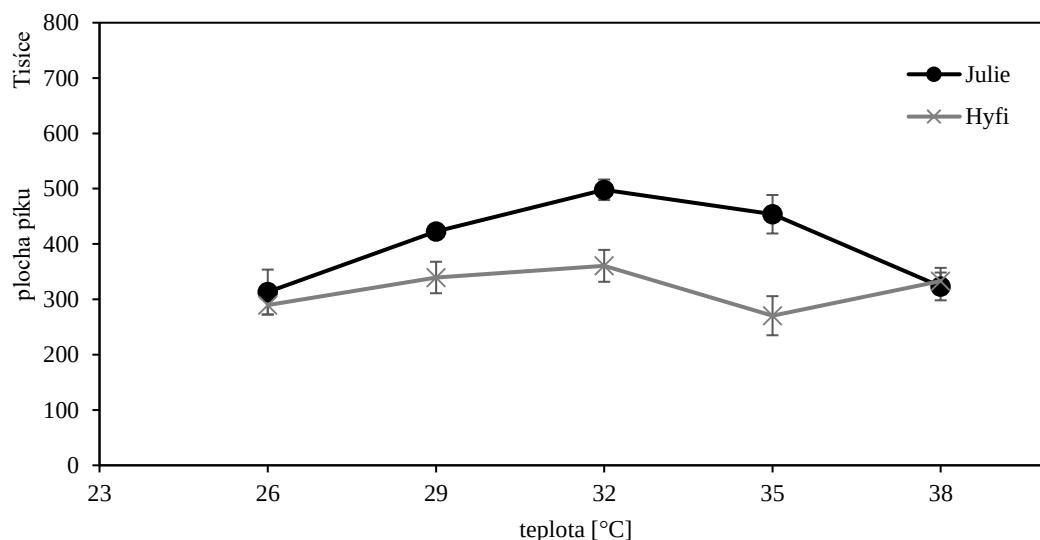
4.2.3 Porovnání frakcí γ gliadinů mezi odrůdami



Graf 9: Obsah γ -gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Obsah γ -gliadinů má pro odrůdu Hyfi mírně klesající charakter, který je podle chybových úseček statisticky nevýznamný. Pro odrůdu Julie se obsah gliadinové frakce zvyšoval do teploty 32 °C a poté prudce klesal (graf 9).

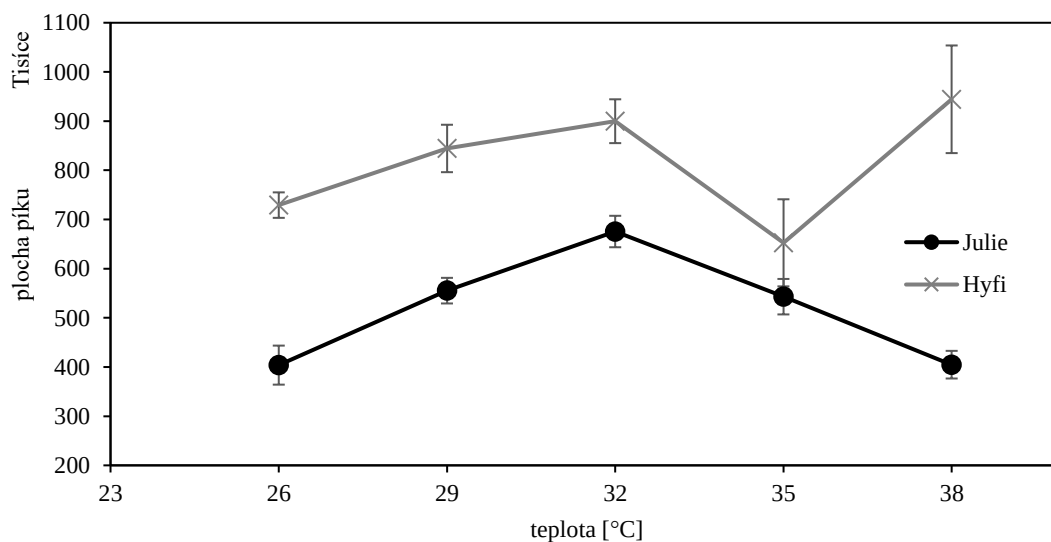
4.2.4 Porovnání frakcí ω -1,2 gliadinů mezi odrůdami



Graf 10: Obsah ω -1,2 gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Pro ω -1,2 gliadiny je teplotní závislost znázorněna výše uvedeným grafem 10. U odrůdy Hyfi byl obsah této frakce v teplotním rozmezí 26–38 °C víceméně konstantní (v rámci statistické chyby), odrůda Julie vykazovala maximum obsahu ω -1,2 gliadinů při teplotě 32 °C, při vyšších teplotách došlo k poklesu.

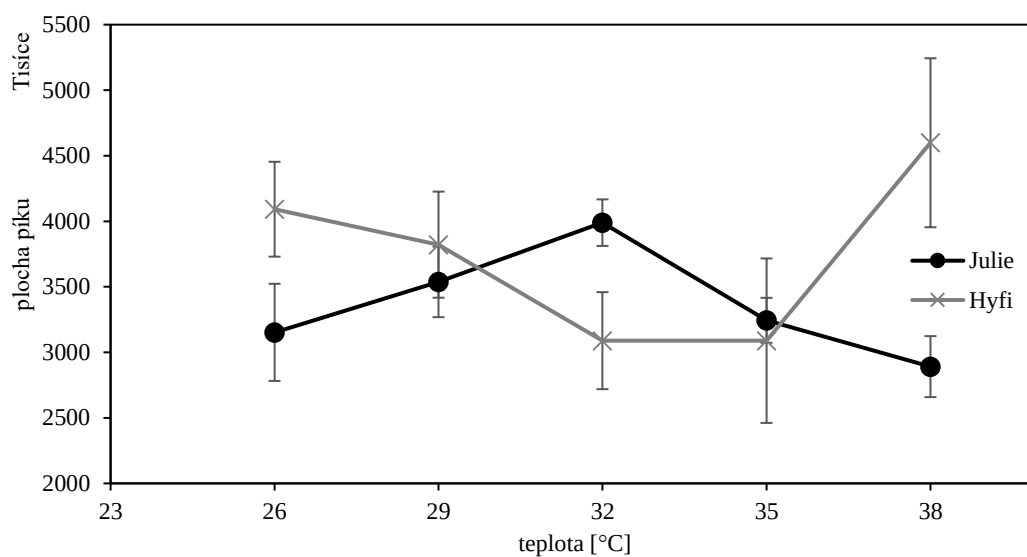
4.2.5 Porovnání frakcí ω -5 gliadinů mezi odrůdami



Graf 11: Obsah ω -5 gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Závislost obsahu ω -5 gliadinů na teplotě znázorňuje graf 11. Odrůda Hyfi vykazovala mírný nárůst do teploty 32 °C, dále následoval pokles k teplotě 35 °C. S přihlédnutím k chybovým úsečkám došlo při teplotě 38 °C k mírnému nárůstu proti teplotě 35 °C. Obsah gliadinové frakce ω -5 odrůdy Julie do teploty 32 °C stoupá a od této teploty klesá.

4.2.6 Porovnání celkového obsahu gliadinů mezi odrůdami



Graf 12: Celkový obsah gliadinů u odrůd Julie a Hyfi při různých kultivačních teplotách a současném stresu suchem

Celkový obsah gliadinů pro odrůdu Hyfi vykazuje v rozmezí teplot 26–35 °C statisticky nevýznamný pokles a následný nárůst při teplotě 38 °C. Celkový obsah gliadinových frakcí vykazuje nárůst do teploty 32 °C, kde je zřetelné maximum, při vyšších teplotách obsah gliadinů klesá.

5 DISKUZE

V této bakalářské práci byl sledován vliv teploty a sucha na obsah gliadinové frakce u dvou odrůd pšenice. Pro experiment byly použity vzorky odrůd Hyfi a Julie, které poskytl Ústav výzkumu globální změny AV ČR.

Gliadinové proteiny byly v experimentální části této práce rozděleny metodou A-PAGE a obsah jednotlivých frakcí byl stanoven počítačovou denzitometrií.

Literatura uvádí [35], že hlavními faktory ovlivňujícími kvalitu pšenice jsou genotyp, přírodní vlivy a jejich kombinace. Výsledky této práce souhlasí s tímto tvrzením. Obsah jednotlivých gliadinových frakcí se u obou odrůd za stejných podmínek lišil. Odrůda Julie měla vyšší obsah gliadinových frakcí alfa a ω -1,2, ale nižší obsah ostatních frakcí (β , γ , ω -5) vůči odrůdě Hyfi.

Dále v literatuře autoři srovnávají poměr gliadinových frakcí ku celkovému obsahu gliadinů. Podle García del Moral a kol. [8] se obsah gliadinových frakcí pohybuje v takovémto rozpětí: ω 10-19 %, α + β 42-58 %, γ 24-32 %. S těmito hodnotami se přibližně shoduje naše měření pro všechny frakce odrůdy Julie. Pro odrůdu Hyfi se při porovnání s naším experimentem hodnoty neshodují, pro α + β jsou vyšší (60-77 %) a pro frakci γ je výsledek nižší (15-23 %).

Při působení samotného stresu suchem byl obsah celkových gliadinů i jednotlivých frakcí u obou odrůd vyšší oproti zavlažované variantě. Tento jev se dá vysvětlit tím, že metabolismus proteinů je méně ovlivnitelný vnějšími podmínkami než syntéza škrobu. Rostlina za dobrých podmínek produkuje více škrobu a tím se obsah proteinů v zrně „zředí“. Při porovnání mezi zkoumanými odrůdami byl tento efekt výraznější u odrůdy Julie. Podle literatury [37] je nejvyšší obsah proteinů v zrně při spojení stresu suchem a vyšší teploty. Toto potvrzují naše výsledky, podle kterých je obsah gliadinových frakcí nejvyšší za stresu suchem pro teplotu 32 °C u obou odrůd (graf 2 a graf 5).

Vliv teploty na odrůdu Hyfi je malý, obsah gliadinů v rozmezí teplot 26–35 °C vykazuje mírný pokles. Celkový obsah gliadinů i obsah jednotlivých gliadinových frakcí u odrůdy Julie vykazuje zřetelné maximum při teplotě 32 °C, při vyšších teplotách nastává výrazný pokles. Lze tedy konstatovat, že z hlediska obsahu gliadinů se vůči působení vysoké teploty a sucha jeví odolnější odrůda Hyfi než odrůda Julie. V rámci změny podílu frakcí ku celkovému obsahu gliadinů se uvádí [37], že se zvyšující teplotou se zvyšuje podíl frakcí α -, β -, ω -, zatímco frakce γ - se snižuje. V našem experimentu se obsah všech frakcí u odrůdy Julie zvyšoval do 32 °C, při vyšších teplotách klesal. Odrůda Hyfi je v tomto ohledu méně konzistentní než odrůda Julie. U frakcí α - β - a γ - při teplotách 26–35 °C obsah mírně klesal, obsah ω -1,2 gliadinů byl v rozmezí teplot 26–38 °C přibližně stejný a frakce ω -5 vykazovala mírný nárůst (s výjimkou hodnoty při 35 °C).

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vliv teploty a sucha na gliadinové frakce dvou odrůd pšenice ozimé.

Pro experiment byla použita mouka odrůd Hyfi a Julie. Rostliny byly kultivovány ve speciálních nádobách s půdou typu luvická černozem. Zasety byly v říjnu 2014 a v květnu 2015 byly přemístěny do kultivačních komor, ve kterých byly pěstovány při různých teplotách a současně zavlažovány nebo stresovány suchem. Tomuto režimu byly rostliny vystaveny po dobu 14 dnů během fáze kvetení a poté byly vystaveny aktuálním meteorologickým podmínkám. Po sklizni byly vzorky zrn rozemlety na mouku a dále byly zpracovány postupem popsáním v experimentální části této práce – gliadiny byly extrahovány ze vzorku 2-chlorethanolem, separovány metodou A-PAGE a kvantifikovány počítačovou denzitometrií.

Nejvýznamnější vliv na jednotlivé gliadinové frakce měl jejich genotyp. S výjimkou frakce α - a ω -1,2 byl za stejných podmínek obsah gliadinů vyšší u Hyfi než u Julie. Obsah gliadinů byl za sucha vyšší než za vlhka, přičemž tento efekt je výraznější u odrůdy Julie než u Hyfi. Teplota v rozmezí 26–38 °C při současném působení sucha neměla výrazný vliv na obsah gliadinů u odrůdy Hyfi (s výjimkou hodnoty při 35 °C). Celkový obsah gliadinů i obsah jednotlivých gliadinových frakcí u odrůdy Julie vykazoval zřetelné maximum při teplotě 32 °C, při vyšších teplotách nastal výrazný pokles.

Z hlediska obsahu gliadinů se tedy v podmínkách vyšší teploty a sucha jeví perspektivnější odrůda Hyfi než odrůda Julie.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BELL, G. D. H. *Wheat Breeding Its scientific basis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987, s. 31-49, [cit. 2018-05-10]. ISBN 978-940-0931-312.
- [2] HOUGHTON, John Theodore. *Globální oteplování: [úvod do studia změn klimatu a prostředí]*. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0636-2
- [3] BATTAIS, F., C. RICHARD, S. JACQUENET, S. DENERY-PAPINI a DA. MONERET-VAUTRIN. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* [online]. 2008, Nov 40(3), 67-76 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/0fa5/5779963f05e6d70b1fcc92781c8180a7083e.pdf>
- [4] PŘÍHODA, Jan a Josef. *Cereální chemie a technologie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1985, 248 s.
- [5] ZIMOLKA, Josef a KOL. *Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna*. Praha: Profi Press, 2005. ISBN 978-808-6726-090.
- [6] PRUGAR, Jaroslav. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008, 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [7] *Pekařská technologie*. I., Suroviny. Praha: Pekař a cukrář, 2013. ISBN 978-80-903913-7-6.
- [8] GARCÍA DEL MORAL, L. F., Y. RHARRABTI, V. MARTOS a C. ROYO. Environmentally Induced Changes in Amino Acid Composition in the Grain of Durum Wheat Grown under Different Water and Temperature Regimes in a Mediterranean Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(20), 8144-8151 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1021/jf063094q. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf063094q>
- [9] OSBORNE, T. B. *Vegetable proteins*. London: Longsmas Green, 1924.
- [10] VELÍŠEK, Jan, a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [11] MARÍN, Santiago, Javier GIL-HUMANES, Alberto HERNANDO a Francisco BARRO. Characterization of α/β - and γ -Gliadins in Commercial Varieties and Breeding Lines of Durum Wheat Using MALDI-TOF and A-PAGE Gels. *Biochemical Genetics* [online]. 2011, 49(11-12), 735-747 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1007/s10528-011-9446-4. ISSN 0006-2928. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10528-011-9446-4>
- [12] THOMPSON, Tricia a Enrique MÉNDEZ. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. 2008, 108(10), 1682-1687 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.jada.2008.07.012. ISSN 00028223. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822308014090>
- [13] EDWARDS, W. P. *The science of bakery products*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2007. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [14] ČSN ISO 1871 (560020). *Potravin y a krmiva – Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. 12 s.
- [15] ČSN EN ISO 5529. *Pšenice – Stanovení sedimentačního indexu – Zeleného testu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011. 16 s.
- [16] ČSN EN ISO 3093. *Pšenice, žito a pšeničná a žitná mouka, pšenice tvrdá (durum) a semolina z pšenice tvrdé – Stanovení čísla poklesu podle Hagberga-Pertena*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011. 20 s.

- [17] ČSN EN ISO 7971-3. *Obiloviny – Stanovení objemové hmotnosti zvané "hektolitrová váha" - Část 3: Rutinní metoda*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. 28 s.
- [18] ČSN EN ISO 5530-1. *Pšeničná mouka – Fyzikální vlastnosti těsta – Část 1: Stanovení absorpce vody a reologických vlastností pomocí farinografu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015. 40 s.
- [19] ČSN 46 1100-1. *Obiloviny potravinářské – Část 1: Společná ustanovení*. Praha: Český normalizační institut, 2001. 8 s.
- [20] ČSN 46 10 11-9. *Zkoušení obilovin, luštěnin a olejnin. Zkoušení obilovin. Stanovení mokrého lepku. Stanovení tažnosti lepku. Stanovení bobtnavosti lepku*. Praha: Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1988. 4 s.
- [21] ČSN 56 0512-10. *Metody zkoušení mlýnských výrobků. Část 10, stanovení obsahu mokrého lepku*. Praha: Český normalizační institut, 1995. 8 s.
- [22] ČSN ISO 2171 (461019). *Obiloviny, luštěniny a výrobky z nich – Stanovení obsahu popela spalováním*. Praha: Český normalizační institut, 2008. 16 s.
- [23] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-807-0805-862.
- [24] RUMBO, M., F. G. CHIRDO, S. A. GIORGIERI, C. A. FOSSATI a M. C. AÑÓN. Preparative Fractionation of Gliadins by Electrophoresis at pH 3.1 (A-PAGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1999, 47(8), 3243-3247 [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1021/jf990001e. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/pdf/10.1021/jf990001e>
- [25] Gel Electrophoresis in Food Analysis. OTLES, Semih. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.
- [26] KREČMER V.: *Bioklimatický slovník terminologický a explikativní*. Academia, Praha, 1980.
- [27] MAREK, M. V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [28] *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet* [online]. California: NASA, 2017 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/>
- [29] KARL, Thomas R., Jerry M. MELILLO a Thomas C. PETERSON. *Global climate change impacts in the United States: a state of knowledge report*. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-14407-0.
- [30] KADRNOŽKA, Jaroslav. *Globální oteplování Země: příčiny, průběh, důsledky, řešení*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, c2008, 467 s. ISBN 978-80-214-3498-1.
- [31] EYSHI REZAEI, Ehsan, Heidi WEBBER, Thomas GAISER, Jesse NAAB a Frank EWERT. Heat stress in cereals: Mechanisms and modelling. *European Journal of Agronomy* [online]. 2015, March 2015(vol. 64), 98-113 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.eja.2014.10.003. ISSN 11610301. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1161030114001221>
- [32] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- [33] CAMPBELL, Mary K. a Shawn O. FARRELL. *Biochemistry*. 8th ed. Stamford: Cengage Learning, c2015. ISBN 978-1-285-42910-6.
- [34] RUELLAND, Eric a Alain ZACHOWSKI. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2010, 69(3), 225-232 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.05.011. ISSN 00988472. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009884721000122X>

- [35] ČSN 46 1085-2. *Pšenice obecná a ječmen – Stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty – Část 2: Elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu (PAGE)*. Praha: Český normalizační institut, 1998. 6 s.
- [36] BARUTCULAR, C., M. YILDIRIM, M. KOC, H. DIZLEK, C. AKINCI et al. Quality Traits Performance of Bread Wheat Genotypes Under Drought and Heat Stress Conditions. *Fresenius Environmental Bulletin* [online]. 2016, 25(12A), 6159-6165 [cit.2018-05-17]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Ayman_EL_Sabagh/publication/311927775
- [37] DANIEL, C. a E. TRIBOÏ. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science* [online]. 2000, 32(1), 45-56 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138>
- [38] TOMASZ, T. *Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce u čtyř odrůd pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 69 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
ATP	adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
CO ₂	oxid uhličitý
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NIR	blízká infračervená spektrometrie
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	rubulosa-1,5-bisfosfát
TEMED	tetramethylethyldiamin
VPD	vapour pressure deficit