



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

**ANALÝZA PROTEINŮ GLUTENINOVÉ FRAKCE U OZIMÉ
PŠENICE KULTIVOVANÉ V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A
ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO**

ANALYSIS OF GLUTENIN FRACTION IN WINTER WHEAT CULTIVATED IN AMBIENT AND ELEVATED
CARBON DIOXIDE CONCENTRATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Marta Čileková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1008/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Marta Čileková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Analýza proteinů gluteninové frakce u ozimé pšenice kultivované v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého

Zadání bakalářské práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na kvalitu pšeničného zrna. Zvláště se zaměřit na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce. V experimentální části sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah proteinů gluteninové frakce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Marta Čileková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Zvyšovanie koncentrácie CO₂ v atmosfére ovplyvňuje fotosyntézu rastlín a následne jej metabolity. V tejto práci sme sa zamerali na zistenie vplyvu zvýšenej koncentrácie CO₂ v atmosfére na glutenínovú frakciu bielkovín u ozimnej pšenice (*Triticum aestivum*). Sledovaná odroda Bohemia pestovaná v roku 2014 bola pestovaná pri normálnej (AC) a zvýšenej (EC; 700 µmol.mol⁻¹) koncentrácii oxidu uhličitého v atmosfére. Polovica vzoriek bola hnojená dusíkatým hnojivom (N⁺; 200 kg.ha⁻¹), druhá polovica bez dusíkatého hnojenia (N⁻). Polovica vzoriek bola pestovaná v suchých podmienkach (DRY) druhá mala počas kultivácie prístup k prirodzeným zrážkam (WET). Posledný sledovaný parameter bola kultivácia za prístupu UV žiarenia (UV⁺) a bez prístupu UV žiarenia (UV⁻). Gluteníny boli z múky extrahované isopropanolom s DTT, separované metódou SDS-PAGE a kvantifikované počítačovou denzitometriou. Zvýšená koncentrácia CO₂ preukázateľne znížila obsah glutenínov vo variantách UV⁺. Najvýznamnejší vplyv na obsah glutenínov malo dusíkaté hnojenie, ktoré výrazne zvyšuje ich obsah v pšeničnom zrne. Pri nehnojených variantách pri UV⁻ sa dosahovali vyššie koncentrácie glutenínov pri zavlažovaní, pri UV⁺ naopak pri kultivácii za sucha. Pri hnojených variantách bol rozdiel medzi AC a EC štatisticky zanedbateľný. Najvyšší obsah glutenínov bol u varianty UV⁺DRY AC N⁺.

ABSTRACT

Increasing carbon dioxide concentrations in the atmosphere has influence on plant's photosynthesis and its metabolites. This bachelor thesis is focused on analysis of glutenin fraction in winter wheat (*Triticum aestivum*) var. Bohemia grown in ambient (AC) and elevated (EC; 700 µmol.mol⁻¹) carbon dioxide concentrations. Plants were cultivated in conditions with nitrogen fertilization (N⁺; 200 kg.ha⁻¹) and without fertilization (N⁻), in presence of UV-B radiation (UV⁺) and absence of UV-B radiation (UV⁻), at drought (DRY) and with ambient irrigation (WET). Grain was harvested at 2014. The glutenin proteins were extracted from flour by isopropanol and DTT then separated by SDS-PAGE and quantified by computer densitometry. Elevated carbon dioxide concentration decreased glutenin concentration in variant UV⁺ otherwise differences between AC and EC variants were nonsignificant. The nitrogen fertilization markedly increased glutenin content. Higher concentrations of glutenins were found in variants UV⁻ WET and UV⁺ DRY. The highest concentrations of glutenins were found in conditions with presence of UV radiation, drought and nitrogen fertilization.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

ozimná pšenica, gluteníny, zvýšená koncentrácia oxidu uhličitého, vplyv dusíkatého hnojiva, UV žiarenie, sucho, SDS-PAGE

KEYWORDS

winter wheat, glutenins, elevated carbon dioxide concentration, influence of nitrogen fertilization, UV radiation, SDS-PAGE

ČILEKOVÁ, M. *Analýza proteinů gluteninové frakce u ozimé pšenice kultivované v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 35 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len se súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Podakovanie: Veľmi rada by som poďakovala môjmu vedúcemu bakalárskej práce, pánovi PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za jeho vždy ústretový prístup, cenné rady a čas venovaný tejto bakalárskej práci. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Dominike Hamříkovej za pomoc a cenné rady ohľadom práce v laboratóriu.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Zmeny klímy	8
2.2	Súčasná zmena klímy	8
2.3	Zmeny koncentrácie CO ₂	9
2.4	Skleníkový efekt	11
2.5	Vplyv zvýšenej koncentrácie CO ₂ na rastliny	11
2.5.1	Vplyv zvýšenej koncentrácie CO ₂ na pšenicu.....	12
2.6	Pšeničné proteíny.....	13
2.6.1	Lepok.....	13
2.6.2	Gliadíny a gluteníny	14
2.7	Metódy analýzy pšeničných proteínov	15
2.7.1	Elektroforéza v polyakrylamidovom géle	15
2.7.2	ELISA.....	17
2.7.3	Hmotnostná spektrometria	17
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	18
3.1	Materiál.....	18
3.2	Stanovenie obsahu glutenínovej frakcie metódou SDS-PAGE.....	18
3.2.1	Prístroje	18
3.2.2	Chemikálie	19
3.2.3	Príprava roztokov	20
3.2.4	Príprava gélov	21
3.2.5	Príprava vzoriek	22
3.2.6	Elektroforéza	22
3.2.7	Vizualizácia bielkovín.....	23
3.2.8	Vyhodnotenie gélov	23
3.2.9	Spracovanie výsledkov.....	24
4.	VÝSLEDKY	25
5.	DISKUSIA	30
6.	ZÁVER.....	32
7.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	33
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	37

1. ÚVOD

Zvyšovanie koncentrácie oxidu uhličitého v atmosfére je dlhodobý pozorovaný jav. Počas 20. storočia, v období industriálnej éry však toto zvyšovanie začalo naberať na rýchlosti. Oxid uhličitý a ostatné skleníkové plyny prepúšťajú krátkovlnné žiarenie zo Slnka na Zem, neprepúšťajú však dlhovlnné žiarenie zo zemského povrchu, a tak sa teplo odráža späť a spodné vrstvy vzduchu sa zahrievajú. Zvyšujúca sa koncentrácia CO₂ v atmosfére je hrozbou, pretože má najväčší podiel na skleníkovom efekte. Výsledkom skleníkového efektu je ohrievanie ovzdušia, roztápanie ľadovcov a zmena celkovej klímy ovplyvňujúcej živočíšstvo aj rastlinstvo na Zemi.

Najväčšou výzvou pre poľnohospodársku produkciu je užiť ľudskú populáciu ktorá stále narastá. Z tohto dôvodu je nutné zvyšovať poľnohospodársku produkciu a sústavne ju adaptovať na meniace sa klimatické podmienky. Je nutné teda pozorovať predovšetkým vplyv CO₂ na plodiny ktoré sú priamo spojené s ľudskou výživou. Najväčšiu úlohu medzi obilninami zohráva pšenica a tá je aj predmetom štúdia v tejto práci. Oxid uhličitý je substrátom fotosyntézy rastlín, ktorá ho premieňa na biomasu. Zvýšený obsah CO₂ vo vzduchu indukuje zvýšenú produkciu biomasy. Kultivácia pšenice v podmienkach zvýšenej koncentrácie CO₂ sa prejavuje intenzívnejším odnožovaním, väčším počtom klasov, vyššou hmotnosťou obilky a vyššou celkovou hmotnosťou biomasy. Najvýživnejšou zložkou pšenice je lepok, ktorého závislosť na koncentrácii CO₂ nie je tak jednoznačná a jeho obsah má tendenciu so zvyšujúcou sa koncentráciou CO₂ v atmosfére klesať.

Pšenica má ako jediná obilnina zloženie lepku ideálne pre tvorbu elastického cesta schopného tvorby bublín. Lepok sa skladá z gliadínov a glutenínov a ich vzájomný pomer udáva kvalitu cesta. Kým gliadíny zodpovedajú za elasticitu a rozťažnosť cesta, gluteníny mu dodávajú pevnosť a súdržnosť. Jeden bez druhého nie sú schopné vytvoriť cesto požadovaných kvalít. Obsah proteínov lepku ovplyvňujú do veľkej miery aj vonkajšie podnety. Preukázaný je vplyv dusikátého hnojenia, ktoré zvyšuje obsah lepkových proteínov v endosperme zrna.

Táto bakalárska práca sa zaoberá analýzou pšeničných bielkovín, konkrétne glutenínovej frakcie. Výskum bol zameraný na zistenie spojitosti medzi momentálnym trendom zvyšujúcej sa koncentrácie CO₂ v ovzduší a jeho dopadom na proteíny v pšenici. Sledované boli aj ďalšie vplyvy, konkrétne pôsobenie UV žiarenia, sucha a dusikátého hnojenia.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Zmeny klímy

Klíma je definovaná ako režim poveternostných stavov na určitom mieste, odvodený z merania meteorologických prvkov za určitý čas. Klíma odpovedá priemerným hodnotám atmosférických a hydrostatických premenných behom určitej doby na určitom mieste a zahŕňa aj obvyklé extrémny [1]. Štúdie sedimentov [2] ukazujú, že za posledných 65 miliónov rokov sa klíma sústavne menila od extrému so zvyšujúcou sa teplotou, kedy sa na pólach Zeme nenachádzal ľad, do extrémov ako boli doby ľadové. Zmeny v klíme ovplyvňujú najmä periodické oscilácie Zeme na jej obežnej dráhe a tým spôsobené zmeny v distribúcii a množstve slnečnej energie dopadajúcej na Zem. Periodické zmeny klímy sú tiež dôsledkom zmien kontinentálnej geografie, topografie a oceánskych prúdov. Keďže väčšina z týchto procesov je ovplyvnená pohybmi tektonických platní, postupne sa menia, väčšinou jednosmerne po určité časové obdobie miliónov rokov. Pre konkrétnejšie poukázanie na zmeny, ktoré ovplyvnili klímu a majú tektonický pôvod je tu napríklad severoatlantický vulkanizmus, vytvorenie a rozšírenie Tasmánskeho a Drakovho prielivu, kolízia Indie s Áziou a následný vznik Himalájí a Tibetskej náhornej plošiny, pozdvihnutie západnej časti Panamy a zatvorenie hlavného Amerického prielavu. Autori z COHMAP (Cooperative Holocene Mapping Project) [3] uvádzajú, že od počiatku industrializačnej éry ide však značne z väčšej časti o antropogénnu zmenu klímy, súvisiacu so zvyšovaním koncentrácie oxidu uhličitého a iných skleníkových plynov v atmosfére. Vplyv zvyšujúcej sa koncentrácie skleníkových plynov a ich radiačné pôsobenie ovplyvnilo klímu najviac zo všetkých pôsobiacich vplyvov za posledných 22 000 rokov [4]. Výsledok výskumu meniacej sa koncentrácie skleníkových plynov v ľadovcoch za posledných 650 000 rokov [4] ukázali že koncentrácia plynov sa pred industriálnou érou menila v určitých hraniciach. Koncentrácia CO₂ sa prirodzene pohybovala medzi 180 ppm do 300 ppm, koncentrácia NH₄ od 320 do 790 ppb a koncentrácia N₂O sa pohybovala medzi 195 až 290 ppb. Za posledných 200 rokov bola táto prirodzená koncentrácia zvýšená. Koncentrácia metánu sa zvýšila až o 120 %, o 25 % koncentrácia oxidu uhličitého a o 9 % koncentrácia oxidu dusného. Tieto záznamy ukazujú masívne zvýšenie antropogénnych plynov od počiatku industrializácie.

2.1 Súčasná zmena klímy

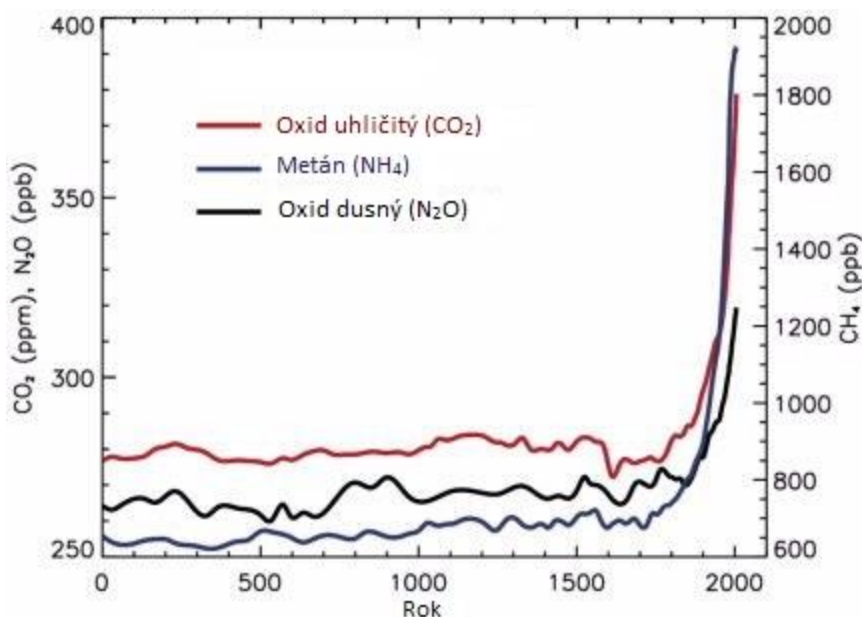
Existencia a konanie našej civilizácie prerástlo od zmien v jednotlivých typoch ekosystémov až na globálnu úroveň a nazývame ho globálna zmena klímy (GZK). Jednou z týchto zmien je zvyšujúca sa koncentrácia skleníkových plynov v atmosfére. Medzi skleníkové plyny s priamou väzbou na ľudskú činnosť patrí oxid uhličitý uvoľňovaný pri spaľovacích procesoch, metán produkovaný hospodárskymi zvieratami, oxidy dusíku ako produkty spaľovacích motorov a rôznych priemyslových výrobní, freóny vypúšťané z rôznych chladiacich zariadení a vodná para. Tieto plyny sú priepustné pre krátkovlnnú zložku dopadajúceho slnečného žiarenia ale nepriepustné pre dlhovlnnú zložku žiarenia emitovaného zo zemského povrchu. V dôsledku toho dochádza k ohrievaniu prízemných vrstiev ovzdušia. [1]. Najväčší vplyv na otepľovanie má oxid uhličitý (až 47 %), metán (27 %) a freóny (10 %) [6]. Analýza teploty v pôde [5], prevedená po 10 metroch do celkovej hĺbky až 600 metrov

elektrickým odporovým teplomerom s presnosťou na $0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ ukázala, že súčasná povrchová teplota je o $1,0 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ vyššia, než bola pred piatimi storočiami. Pritom za prvé 4 storočia sa teplota zvýšila o toľko ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) ako v priebehu samotného 20. storočia.

O vplyve ľudskej spoločnosti na globálny ekosystém pojednávajú už významné konferencie v roku 1992 v Rio De Janeiro a v roku 1997 v Kjótu, ktoré sú súčasťou konvencie OSN o klimatických zmenách. Správa z roku 1995 uvádza ako jeden z dvoch základných problémov GZK nárast obsahu skleníkových plynov (CO_2 , NH_4 , N_2O), ktoré môžu ovplyvniť otepľovanie Zeme a nárast koncentrácie aerosólov [5].

2.2 Zmeny koncentrácie CO_2

Za uplynulých 150 000 rokov môžeme pozorovať prepojenie zmeny klímy a koncentrácie CO_2 . Nástup dôb ľadových bol sprevádzaný poklesom koncentrácie CO_2 . Koniec dôb ľadových bol charakteristický uvoľnením až niekoľkých gigaton uhlíka z mora do ovzdušia. S rastúcou teplotou klesá rozpustnosť plynov v kvapaline, a tak sa po oteplení, tieto obrovské množstvá uhlíka uvoľnili z mora do atmosféry [5]. Kolísanie koncentrácie oxidu uhličitého teda nie je pre nás neznámy jav, obávaná však môže byť rýchlosť zvyšovania koncentrácie od obdobia rozvoja priemyslu.



Obrázok 1 Zmeny koncentrácie skleníkových plynov za posledných 2 000 rokov [16].

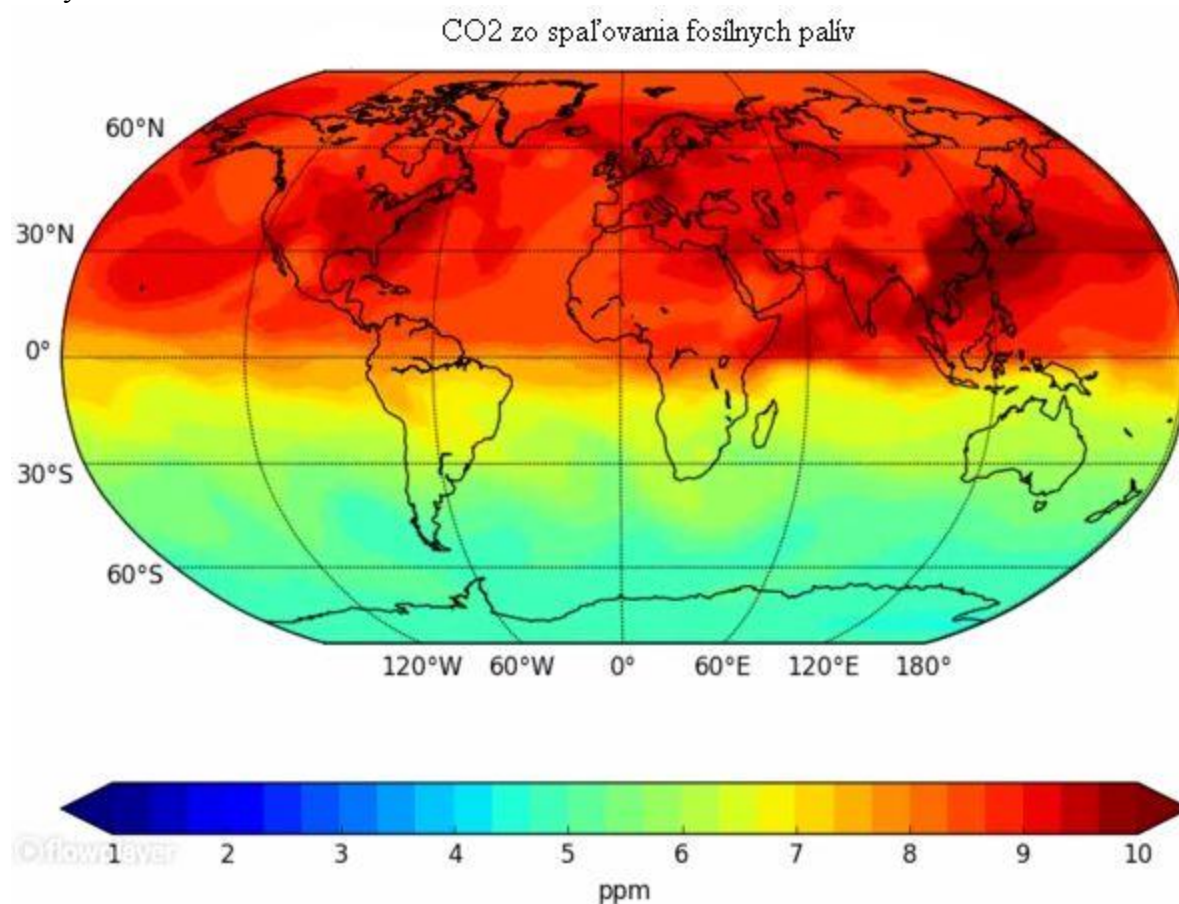
Obr. 1 ukazuje priebeh zvyšovania koncentrácie skleníkových plynov v čase. Je zjavné zvýšenie koncentrácie všetkých skleníkových plynov v 20. storočí spolu so začiatkom industrializácie.

Počas posledných 1 000 rokov bola koncentrácia oxidu uhličitého v atmosfére pomerne stála, udržiavala sa v rozmedzí od 270 do $290\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ [20]. S rozvojom priemyslu a následnej priemyselnej revolúcie sa však táto hodnota prudko zvýšila. V súčasnej dobe je obsah CO_2 v atmosfére $390\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (údaj z roku 2010) [22]. Z analýzy ľadovcov LawDome [21], ktorá dokumentuje posledných 1 000 rokov a skúmala vzorky vzduchu odobrané z ľadovca,

autori stanovili počiatok neúmerneho zvyšovania koncentrácie CO_2 na začiatok 19. storočia, čo autori vyvodzujú ako dôsledok počiatkov rozvoja priemyslu. Od tejto doby zvyšovanie stále nabera na intenzite. Podľa analýzy v rokoch 1970 – 1979 bol nárast koncentrácie $1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, zatiaľ čo v rokoch 2000-2006 to bolo už $1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ [28,29]. Počas roka sú patrné aj sezónne výkyvy, ktoré sú však z dlhodobého hľadiska zanedbateľné.

V roku 1994 bol vytvorený jeden z najväčších výskumov [5] zmeny koncentrácie CO_2 kedy sa počas jedenástich rokov odoberali vzorky vzduchu v týždňových intervaloch, z tridsiatich-dvoch stanovišť po celom svete. Bolo spracovaných cez 17 000 vzoriek, ktoré preukázali badateľné zvýšenie koncentrácie CO_2 za uplynulých jedenásť rokov. Pre príklad, na južnom póle sa koncentrácia CO_2 za sledovanú dobu zvýšila približne o $12 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Na severnej pologuli bola preukázaná sezónna dynamika, prevažne v dôsledku fotosyntézy a dýchania suchozemského ekosystému. Ročná priemerná koncentrácia CO_2 je vyššia na severnej pologuli, pretože sú tu sústredené antropogénne emisie CO_2 . Udáva sa že až 90 % všetkých emisií fosílnych palív je sústredených na severnej pologuli. V priebehu leta však na severnej pologuli klesne koncentrácia CO_2 až pod hodnoty odpovedajúce miestam na južnej pologuli a to kvôli viacnásobne väčšiemu suchozemskému ekosystému viažucemu CO_2 .

Centrum analýzy oxidu uhličitého [23] skúmalo v rokoch 2011 a 2012 vplyv fosílnych palív na vylučovanie a akumuláciu CO_2 .



Obrázok 2 CO_2 v atmosfére uvoľnený spaľovaním fosílnych palív v období rokov 2011 a 2012 [23].

Najväčšiu emisiu CO_2 spôsobenú spaľovaním fosílnych palív vidieť nad východnou Áziou, západnou Európou a východnou časťou severnej Ameriky (obr. 2). Globálne emisie vzrástli

z roku 2011 z 9,4 miliárd ton CO₂ na 9,6 miliárd ton CO₂ v roku 2012. Akumulovalo sa 9 až 10 ppm CO₂ za dva roky, čo predstavuje zvýšenie atmosférického CO₂ o 2,3 % každé 2 roky zo spaľovania fosílnych palív.

2.3 Skleníkový efekt

Každé teleso teplejšie ako 0 K vyžaruje energiu. Spektrálne zloženie vyžarovanej energie sa mení v závislosti na teplote povrchu telesa ktoré energiu vyžaruje. Túto zmenu vyjadruje Wienov zákon posuvu, kde $\lambda_{\max}$ vyjadruje vlnovú dĺžku maxima energie emitovanej telesom o teplote T.

$$\lambda_{\max} = 2900/T \quad (1)$$

Teplota povrchu Slnka je asi 6000 K, čo keď dosadíme do Wienovho zákona posuvu, zistíme že maximum vyžarovanej energie Slnka je vo viditeľnej oblasti spektra, okolo 0,5 μm alebo 500 nm. Rastliny, pôda a iné objekty na povrchu Zeme majú podstatne nižšiu teplotu, okolo 290 K. Emitovaná energia, je teda približne 10 000 nm, čo zaradzujeme do dlhovlnného infračerveného žiarenia.

Podstata skleníkového efektu sa dá vysvetliť na príklade skutočného skleníku. Sklo dobre prepúšťa krátkovlnné slnečné žiarenie. Žiarenie preniká do skleníku, je absorbované rastlinami a objektami a zvyšuje ich teplotu. Objekty následne vyžarujú viac energie ale stále v oblasti dlhovlnného žiarenia, nakoľko ich teplota sa zvýšila len asi na 300 K. Vyžiarená energia putuje ku sklu, ktoré dlhovlnné žiarenie silne pohlcuje. Pohltením žiarenia sa zvyšuje teplota skla, ktoré tak samo zvyšuje svoju vlastnú dlhovlnnú radiáciu. Časť tohto žiarenia je síce odvádzaná do atmosféry mimo skleník, druhá časť sa však vracia do skleníku, kde zvyšuje teplotný účinok krátkovlnného žiarenia Slnka. Výsledkom je postupné zvyšovanie teploty. Uvedené vlastnosti skla, majú aj niektoré plyny, ktoré sa v súčasnej dobe vyskytujú v atmosfére Zeme v čoraz väčšej koncentrácii. Krátkovlnné žiarenie zo Slnka je atmosférou mierne absorbované a plyny skleníkového efektu nemajú na túto absorpciu žiaden dopad. Na rozdiel od toho, dlhovlnné žiarenie emitované zo zemského povrchu zložky atmosféry pohlcujú. Táto absorpcia závisí od obsahu vodných pár, CO₂ a iných plynov. To znamená že zvyšujúci sa obsah CO₂ vo vzduchu zvyšuje absorpciu žiarenia zo Zeme zvyšuje teplotu atmosféry a zvyšuje dlhovlnnú radiáciu ktorá smeruje prevažne späť na Zem. Prirodzený skleníkový efekt, je tu od počiatku existencie Zeme a vytvára vhodnú klímu pre život, bez neho by bola priemerná teplota na Zemi o 33 °C nižšia ako je teraz a tak pravdepodobne nevhodná pre život [5]. Skleníkový efekt teda sám o sebe nie je príčinou meniacej sa klímy a globálneho otepľovania, príčinou je zvýšená koncentrácia skleníkových plynov, ktoré zosilňujú skleníkový efekt.

2.4 Vplyv zvýšenej koncentrácie CO₂ na rastliny

Rastliny pomocou fotosyntézy prevádzajú anorganický uhlík z atmosféry v podobe oxidu uhličitého, na organicky viazaný uhlík v bielkovinách, sacharidoch, tukoch a ďalších látkach [5].

Priame účinky zvýšenej koncentrácie CO₂ vo vzduchu na rastliny sa prejavujú zmenou rýchlosti fotosyntézy, fotorespirácie a vodivosti prieduchov. Koncentrácia CO₂ vo vzduchu

môže vystúpiť až na $800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a to hlavne v noci. Teoretická úvaha aj praktické pokusy dokazujú, že zvýšená koncentrácia CO_2 zvyšuje rýchlosť fotosyntézy pri saturačnej aj podsaturačnej ožiarení. Naopak, rýchlosť transpirácie sa so zvýšenou koncentráciou CO_2 v atmosfére znižuje a to ovplyvňuje obsah vody v pôde, ale aj energetickú bilanciu listov tak, že sa znižuje výdaj energie vo forme latentného tepla (transpirácia) a zvyšuje sa výdaj tepla do okolitého vzduchu. Modelové štúdie poukázali na možný globálny dopad. Pokles vodivosti prieduchov a pokles výdaju latentného tepla môžu spôsobiť oteplenie nad kontinentmi o 1 až 2 stupne, čo ešte zosilní teplotné účinky zmeny klímy. Výsledkom zmien rýchlosti karboxylácie a inhibície fotorespirácie indukovaných zvýšením koncentrácie CO_2 vo vzduchu obklopujúcom fotosyntetické orgány je zvýšenie rýchlosti fotosyntézy. Zvýšená koncentrácia oxidu uhličitého v atmosfére však nepôsobí na všetky rastliny rovnako. Rozdiel je v rastlinách C3 a C4. Rastliny C4 sú pri momentálnej koncentrácii CO_2 týmto substrátom už saturevané a tak sa nemení rýchlosť fotosyntézy aj pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie substrátu. Naopak, rastliny C3, ktoré tvoria asi 95 % všetkých druhov rastlín na Zemi, reagujú na ďalšie zvýšenie koncentrácie CO_2 a rýchlosť fotosyntézy sa môže ďalej zvyšovať [5].

2.4.1 Vplyv zvýšenej koncentrácie CO_2 na pšenicu

Pšenica patrí medzi najdôležitejšie plodiny zaistujúce výživu ľudstva a tak jej bola venovaná pozornosť pri skúmaní dopadu zvýšenej koncentrácie CO_2 v atmosfére. Príklad tohto dopadu na jednotlivé parametre pšenice uvádza štúdia Dijkstry et al. [9]. V tabuľke môžeme vidieť zvýšenie hodnôt všetkých parametrov pri kultivácii so zvýšenou koncentráciou CO_2 vo vzduchu. Rozdiely v testovaní dvoch rozdielnych kultivarov pšenice [5] ukázali, že oba kultivary sa od seba priebehom vývoja líšia len na počiatku kultivácie, potom bola už reakcia oboch odrôd na zvýšenú koncentráciu rovnaká. CO_2 indukoval intenzívnejšie odnožovanie, čo sa prejavilo väčšou hustotou porastu a následnou absorpciou väčšieho podielu fotosynteticky aktívnej radiácie dopadajúcej na porast. Rastliny sa tiež vyvíjali rýchlejšie. Za pozitívny vplyv zvýšenej koncentrácie CO_2 sa teda môže považovať najmä zvýšenie rýchlosti fotosyntézy a teda zväčšenie obsahu biomasy, zvýšenie odnožovania a tým zväčšenie asimilačnej plochy porastu a tak aj väčšej hmotnosti obiliek a klasu. Zvýšenie koncentrácie CO_2 sa z týchto údajov môže javiť ako pozitívne, pretože zvyšuje výnosy pšeničných klasov, ale celkový obsah bielkovín, ktoré predstavujú najvýživnejšiu časť pšeničného zrna, sa znížil o 7,9 % [26]. Okrem koncentrácie CO_2 ovplyvňujú rýchlosť fotosyntézy a tvorby biomasy faktory prostredia. Je to dopad slnečného žiarenia, teplota, zavlažovanie a pšenica je do veľkej miery ovplyvnená minerálnou výživou. Neexistujú dlhodobé pokusy [5], ktoré by poukazovali na možnosť vysokej produkcie celkovej sušiny pri minimalizovaných dávkach minerálnych živín. Wolf vo svojom výskume [7] pestoval jarnú pšenicu pri koncentrácii $315 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ a $695 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Sledoval 7 pokusných variant líšiacich sa v dostupnosti N, P a K vedľa kontrolnej varianty s dostatočným zásobením týchto prvkov. Deficit P a N sa prejavil podstatným znížením pozitívneho vplyvu zvýšenej koncentrácie CO_2 na hmotnosť sušiny nadzemných orgánov a obiliek. Naopak, vo väčšine prípadov došlo k poklesu minerálnych živín v dôsledku pôsobenia CO_2 . Toto zníženie odpovedá predstave o znížení obsahu minerálnych živín v rastlinách pestovaných pri zvýšenej koncentrácii CO_2 . Zvýšená koncentrácia CO_2 teda zväčšuje účinnosť minerálnych živín, a je tu možnosť vyšších výnosov

pestovania pšenice pri vyšších koncentráciách oxidu uhličitého a súčasne nižších dávkach priemyslových hnojív.

Tabuľka 1 Charakteristika výnosových prvkov a ďalších zložiek pšenice obcej (*Triticum aestivum*) pri jej plnej zrelosti, pestovanej v normálnej a zvýšenej koncentrácii CO₂ vo vzduchu [9].

Parameter	$\mu\text{mol (CO}_2\text{) mol}^{-1}$	
	374	706
Celková biomasa (gm ⁻²)	2 302	2 709
Výnos zrna (gm ⁻²)	1 009	1 206
Index úrody	0,437	0,443
Hmotnosť sušiny stebľa (gm ⁻²)	579	678
Hmotnosť sušiny listu (gm ⁻²)	362	409
Počet klasov (m ⁻²)	669	756
Počet obiliek v klase	34,3	35,5
Hmotnosť obilky (mg)	40,8	42

2.5 Pšeničné proteíny

Pšeničné zrno sa skladá z troch častí. Sú to obalové časti, klíček a endosperm. Obalové časti sa nazývajú otruby a sú tvorené predovšetkým z polysacharidov ako celulóza, pri spracovávaní zrna sú odstránené. Klíček predstavuje zárodok, obsahuje genetickú informáciu a vyrastie z neho nová rastlina. Pri mlynskom spracovaní býva odstránený kvôli svojej krátkej chemickej stabilite v dôsledku vysokého obsahu tukov. Endosperm tvorí najväčšiu časť zrna a je zdrojom zásobných látok pre rastlinu v období klíčenia. Skladá sa z troch štvrtín zo škrobu a 10 – 13 % tvoria bielkoviny. Pšeničná múka je takmer čistý pomletý endosperm. Obsah a kvalita endospermu určuje kvalitu pšeničnej múky [14]. Podľa rozpustnosti sa bielkoviny v endosperme delia na albumíny, globulíny, gliadíny a gluteníny. Albumíny a globulíny sa radia medzi nelepkové bielkoviny. Veľká časť z nich sú enzýmy a zúčastňujú sa metabolických procesov. Albumíny sú rozpustné vo vode, globulíny v roztokoch solí. Gliadíny a gluteníny sú proteíny ktoré tvoria pšeničný lepok. Gliadíny sú rozpustné v 70 – 80 % ethanole, nerozpustné vo vode a gluteníny sú rozpustné v zriedených roztokoch kyselín a zásad a tiež sú nerozpustné vo vode [17]. Z celkového obsahu bielkovín tvoria 15 – 20 % albumíny a globulíny. Nachádzajú predovšetkým v obalových vrstvách zrna a majú minimálny alebo žiadny vplyv na kvalitu cesta pripraveného z pšeničnej múky. Primárnu úlohu v tvorbe matrixu cesta majú lepkové proteíny [25].

2.5.1 Lepok

Lepok, taktiež označovaný ako glutén je zmesou proteínov gliadínu a glutenínu v pšeničnom zrne. Lepok je nerozpustný vo vode a môžeme ho získať vymytím škrobu z cesta, vďaka čomu získame elastickú hmotu známu ako seitan. Lepok je zdrojom výživných proteínov

a často sa pridáva do potravy s nízkou nutričnou hodnotou. Hydratovaním gliadínov a glutenínov vzniká elastický a tvárny lepok, ktorý má veľký význam pre prípravu kysnutého cesta a pečených produktov [18]. Funkčné vlastnosti lepku je možné obnoviť rehydratáciou a táto vlastnosť je využívaná pri výrobkoch ako je pšeničný vitálny lepok v podobe suchej zmesi. Ako lepok sa tiež označujú bielkoviny po odstránení kukuričného škrobu z kukurice. Tento lepok má však úplne iné vlastnosti a nie je schopný tvoriť elastickú hmotu, ako pšeničný lepok. V súčasnej dobe sa stále viac stretávame s pojmom celiakia, ktorý označuje autoimunitné ochorenie, ktoré je spôsobené intoleranciou lepku. Intolerancia sa vzťahuje na všetky druhy lepku, nie len na pšeničný, či už ide o proteíny tvoriace lepok v raži, jačmeni alebo ovse. Takzvané „gluten-free“ potraviny označujú produkty, ktoré lepok neobsahujú, alebo obsahujú menej než definované množstvo týchto cereálnych proteínov (zvyčajne to býva 200 ppm) [19].

2.5.2 Gliadíny a gluteníny

Podľa funkcie gliadínov a glutenínov v pšeničnom zrne ich radíme medzi zásobné proteíny [19]. Termín gliadín a glutenín bol osvojený v roku 1980 T.B. Osbornom [7], ako pomenovania pre proteíny pšeničného lepku. Výskumníci predniesli koncept o rozdieloch v kvalite lepku, ktoré by mohli byť spôsobené zmenou v pomere týchto dvoch základných zložiek lepku. Rôzne kvality lepku ďalej podmieňujú kvalitu pšeničnej múky a tie sa prejavia v kvalite pekárenských výrobkov. Už v starších výskumoch [8] sa objavuje porovnanie múky s rôznym pomerom gliadínu a glutenínu. Ukázalo sa, že múka v ktorej má vyššie zastúpenie glutenín vytvára silné, húževnaté a nelepivé cesto. Naopak, väčší pomer gliadínov spôsoboval neformné a lepkavé cesto. Ďalej sa však ukázalo, že problematika nie je tak jednoduchá a jednoznačná. Proteíny tvoriace lepok pre pšenicu predstavujú zásobu aminokyselín ktoré dodávajú živiny zrnám pri klíčení. Dominantná aminokyselina je kyselina glutamová ktorá je v pšenici obsiahnutá ako glutamín, druhou najviac obsiahnutou aminokyselinou je prolín a obsahuje aj stopové množstvá lyzínu.

Hlavný rozdiel medzi gliadínmi a glutenínmi pšenice je v analýze ich funkčnosti. Gliadíny sú monoméne polypeptidové reťazce s molekulovou hmotnosťou 30–80 kDa a gluteníny sú viacreťazcové štruktúry polypeptidov navzájom pospájané disulfidickými väzbami s molekulovou hmotnosťou 15 – 150 kDa [18]. Hydratované gliadíny sú elastickejšie a menej kohézne ako gluteníny a majú predovšetkým vplyv na viskozitu (roztlačnosť) cesta. Hydratované gluteníny sú kohézne aj elastické a sú zodpovedné za pevnosť a elasticitu cesta.

Gluteníny sú polypeptidy lepku, ktoré sú navzájom pospájané disulfidickými mostíkmi. Z lepku je ich možné izolovať premytím 70% ethanolom, v ktorom sa rozpustia gliadíny a vzniknutý sediment predstavuje gluteníny. Gluteníny v endosperme predstavujú 45 % z celkového obsahu bielkovín. Môžu byť klasifikované do dvoch skupín, na vysokomolekulárne (HMW) a nízkomolekulárne (LMW) podjednotky. Vysokomolekulárne gluteníny disponujú molekulovou hmotnosťou od 100 do 140 kDa a tvoria 5 – 10 % z celkového obsahu proteínov, nízkomolekulárne gluteníny od 30 do 55 kDa a tvoria 20 – 30 % celkových proteínov. Navzájom sú pospájané disulfidickými mostíkmi a tvoria heterogénnu zmes polymérnych polypeptidov. Tieto väzby môžu byť rozrušené pri analýze

bielkovín redukčnými činidlami ako β -mercaptoethanol alebo dithiothreitol. Gluteníny teda patria medzi najväčšie proteínové molekuly v prírode s molekulovou hmotnosťou desiatok miliónov. Rozdiely vo veľkosti podjednotiek, polarite a počte cysteínových zvyškov ovplyvňuje možnosť tvorby disulfidických mostíkov. Tie sú zodpovedné za stavbu polymérnej štruktúry glutenínu [24].

2.6 Metódy analýzy pšeničných proteínov

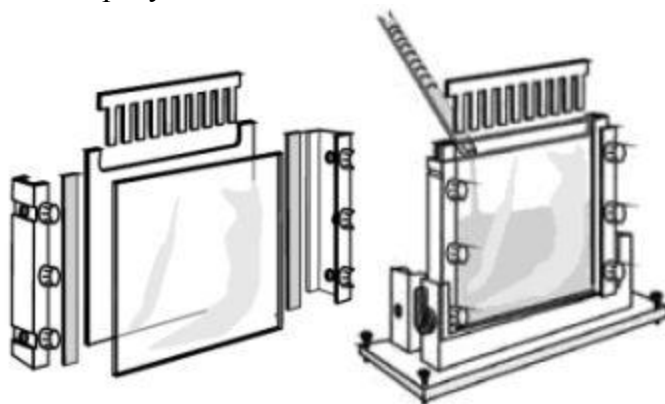
2.6.1 Elektroforéza v polyakrylamidovom géle

Podstatou elektroforézy je pohyb nabitých častíc vplyvom vloženého jednosmerného elektrického poľa. Ak je častica nesúca náboj Q vystavená vplyvu jednosmerného elektrického poľa o intenzite E , pôsobí na túto časticu sila F . Elektroforéza všeobecne predstavuje systém dvoch elektród, ktoré sú ponorené do vodivého elektrolytu. Ako elektrolyt sa najčastejšie používa tlmiaci roztok s iónovou silou asi 0,05 – 0,10. Vodivé spojenie medzi katódou a anódou je realizované poréznym materiálom obsahujúcim elektrolyt, ktorý zabezpečuje konštantnú hodnotu elektrického poľa v celom systéme. Pohyblivosť častice je daná jej rozmerom, tvarom, nábojom častice a viskozitou prostredia ktorým prechádza.

$$v = \frac{Q}{k} \cdot E = u \cdot E \quad (2)$$

Rýchlosť častice popisuje rovnica (2), kde k je konštanta a u je pohyblivosť častice. Zo vzťahu vyplýva, že rýchlosť iónu umiestneného v tomto systéme bude priamo úmerná pohyblivosti a tak je možné separovať ión s vyššou pohyblivosťou od iónu s pohyblivosťou nižšou [12].

Polyakrylamidový gél je využívaný kvôli jeho vysokej mechanickej stabilite, priehľadnosti a chemickej nereaktivite. Gél je pripravovaný v laboratórnych podmienkach z akrylamidového monoméru, a zosieťovadla, najčastejšie to býva N,N'-metylenbisakrylamid. Polymerizácia prebieha medzi dvoma sklami (obr. 3), bez prítomnosti vzduchu. Vlastnosti gélu môžu byť upravované pomocou zmeny koncentrácie monoméru v celkovom objeme gélu, ktorá sa môže pohybovať od 4 – 16 %.



Obrázok 3 Aparatúra pre polymerizáciu polyakrylamidového gélu obsahujúca dve sklá, plastový stojan, tesniace gumičky a umelohmotný hrebienok pre vytvorenie elektroforetických dráh v géle.

2.6.1.1 SDS-PAGE

Názov tejto metódy sa skladá z dvoch častí. SDS (dodecylsulfát sodný; z anglického sodium dodecyl sulfate) je detergent ktorý má negatívny náboj a rozpúšťa hydrofóbne molekuly. Polynukleotidové reťazce proteínov majú rôzny tvar vďaka svojej sekundárnej, terciárnej a kvartérnej štruktúre. Cieľom SDS-PAGE je rozdeliť molekuly na základe ich molekulovej hmotnosti a rozdielna priestorová štruktúra by spôsobovala rozdiely v rýchlosti migrácii týchto molekúl aj v prípade, že ich molekulová hmotnosť je rovnaká. Z tohto dôvodu je prvým krokom pri SDS-PAGE denaturácia bielkovín. Okrem toho že SDS zdenaturuje bielkoviny teda vytvorí lineárne polynukleotidové reťazce, bielkoviny nabije záporným nábojom a tie následne všetky putujú rovnakým smerom a to ku kladnej elektróde. PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovom gele z anglického polyacrylamide gel electrophoresis) naznačuje využívanie polyakrylamidového gélu v tejto metóde. Akrylamid je monomér polyakrylamidu a pri jeho zosieťovaní vzniká gél, ktorý vo svojej štruktúre obsahuje dutinky, ktorými pri pripojení elektrického prúdu putujú bielkoviny. Kvôli svojej veľkosti majú malé molekuly možnosť prechádzať ako veľkými, tak aj malými dutinkami v géle, na rozdiel od veľkých molekúl, ktoré sú pri pohybe gélom viac ovplyvnené odporom prostredia. Pri elektroforéze teda najďalej doputujú molekuly s malou molekulovou hmotnosťou [10].

2.6.1.2 A-PAGE

A-PAGE je elektroforéza prebiehajúca za natívnych podmienok. Proteíny sú analyzované v ich natívnom stave, bez denaturácie, kedy je zachovaná sekundárna a vyššie štruktúry bielkovín. Rýchlosť migrácie nezáleží len na molekulovej hmotnosti a náboji bielkovín, ale tiež na ich 3D štruktúre. Skratka A-PAGE znamená kyslá elektroforéza v polyakrylamidovom géle. Systém vykazuje pH okolo 3,0 a toto kyslé prostredie nabije bielkoviny kladným nábojom a tie následne putujú k zápornej katóde, čo je hlavný rozdiel oproti SDS-PAGE kde molekuly putujú ku kladnej anóde [10].

A-PAGE umožňuje delenie bielkovín o podobných molekulových hmotnostiach, na základe odlišností v náboji pri modifikovaných formách postranného reťazca. Do systému sa pridáva močovina rušiaci vodíkové väzby v proteínoch. Tiež mení elektroforetickú mobilitu na základe zvyšovania koeficientu trenia proteínov [11].

2.6.1.3 2-D Elektroforéza

Dvojrozmerná elektroforéza využíva dve po sebe nasledujúce elektroforetické metódy a to izoelektrickú fokusáciu a SDS-PAGE elektroforézu. Je vhodná pre delenie vysokokomplexných proteínových zmesí. Najskôr sa pomocou elektrickej fokusácie v jednom smere (rozmere), v gradiente pH, separujú látky podľa svojich izoelektrických bodov. Nasleduje SDS-PAGE v kolmom smere, kde sa delia látky podľa molekulovej hmotnosti. Týmto postupom vzniknú dvojrozmerné „mapy“ ktoré po skenovaní možno kategorizovať a použiť pre identifikáciu zlúčenín [13].

2.6.2 ELISA

Z anglického „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ je jedna z najpoužívanějších imunologických metód určená k detekcii nízkych koncentrácií protilátky a antigénu. Je založená na špecifickej interakcii medzi protilátkou a antigénom, pričom je na jednu z týchto látok kovalentne naviazaný enzým (peroxidáza alebo fosfatáza), ktorý katalyzuje premenu substrátu, ktorý je pridaný do reakčnej zmesi, na produkt. Produkt je farebný a jeho koncentrácia sa meria spektrofotometricky alebo fluorimetricky, v prípade fluoreskujúcich produktov. Koncentrácia produktu je priamoúmerná koncentrácii antigénu alebo protilátky vo vzorke. Metódy ELISA sa využívajú v diagnostike infekčných ochorení človeka a zvierat, ďalej k detekcii toxínov, hormónov a proteínov. Spoločným znakom metód ELISA je zakotvenie antigénu alebo protilátky na nerozpustný nosič, čo uľahčuje separáciu imunochemicky naviazaných molekúl. Nerozpustný nosič môže byť povrch titračnej nádoby alebo povrch mikrotitračnej doštičky [42,43].

2.6.3 Hmotnostná spektrometria

Je technika založená na delení iónov vo vákuu v plynnej fáze, na základe pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Analyzované molekuly sa musia najskôr ionizovať a následne, ak majú dostatočnú vnútornú energiu, rozdeľujú sa na určité fragmenty iónov podľa pomeru ich hmotnosti a náboja a sú detekované v spektrofotometri. Sú viaceré možnosti ionizácie ako napríklad elektrónová ionizácia a chemická ionizácia pri GC-MS, ionizácia elektrosprejom, fotoionizácia pri atmosferickom tlaku a chemická ionizácia pri atmosferickom tlaku pri LC-MS. Pre príklad, pri elektrónovej ionizácii sa elektróny zrýchlia v elektrickom poli na energiu asi 70 eV a následne interagujú s analyzovanými neutrálnymi molekulami. Nárazom neutrálne molekuly stratia elektrón a vzniká radikál kation. Ten sa vďaka dodanej prebytočnej energii rozpadá a tvorí viacero fragmentov. Každý takto fragmentovaný ión môže podliehať ďalšej fragmentácii. Takto fragmentované ióny ďalej postupujú do detektora. Pri ionizácii elektrosprejom je vzorka rozpustená v polárnom rozpúšťadle a nasatá cez oceľovú kapiláru. Aplikáciou napätia asi 2,5–4 kV to ústia kapiláry sa vytvorí silné elektrické pole a vzorka je rozprášená v podobe aerosoly v podobe nabitých kvapôčok. Teplý prúd dusíku odparuje rozpúšťadlo a tým sa kvapky zmenšujú až dôjde k explózií kvapky a vytvorí sa viacero menších. To sa opakuje, dokým v analyte nie sú samostatné ióny. Takto sa analyzujú zlúčeniny s molekulovou hmotnosťou menej než 100 až viac než 1 000 000 Da. Tento spôsob je vhodný pre analýzu veľkých molekúl, ako sú bielkoviny. Výstupom zo spektrofotometra je závislosť intenzity v tzv. hmotnostnom spektre (osa y) na pomere m/z (osa x). Najvyšší pík je potom označený ako základný pík a predstavuje 100 % intenzitu iónov. Zvyšok spektra je potom normalizovaný na základný pík. Hmotnostný spektrometer sa skladá z troch základných častí a to zdroj iónov, hmotnostný analyzátor a detektor. Pre voľné prechádzanie častíc analyzovanej látky z jedného konca zariadenia do druhej, aby nedochádzalo k zrážkam s molekulami vzduchu, je vnútri celého zariadenia, analyzátoru aj detektoru vákuum. Vzorka sa môže ionizovať priamo, alebo až po aplikácii inej separačnej metódy ako plynová chromatografia (GC) alebo vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC) [38].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

Experiment bol realizovaný v Centre výskumu globálnej zmeny A VČR, konkrétne na ich experimentálnej stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Táto oblasť je charakteristická bohatými zrážkami. Priemerný ročný úhrn zrážok je tu 610 mm a priemerná ročná teplota 7,2 °C. Pôdny typ je modálna kambizol s geologickým podložím zvetraná rula v hĺbke 60 – 90 cm. Pôdnym druhom je pôda hlinito-piesčitá so zastúpením piesčitej frakcie 45 – 60 % a obsahom ílových častíc pohybujúcich sa od 16 %. Kyslosť pôdy sa pohybuje v rozmedzí pH_{KCl} 4 – 5.

Stanicu tvorí 24 komôr umožňujúcich sledovať niekoľko parametrov naraz (obr. 4, obr. 5). V komorách je zaistená automatická fumigácia CO_2 , regulácia zrážok a je tu tiež obmedzená priepustnosť pre UV žiarenie. Komory majú šesťuholníkový tvar, ktorého opísaná kružnica má priemer 4 m, výška komory je 2 m. Ich strop tvoria otočné lamely, ktoré na základe signálov zo zrážkomeru regulujú množstvo zrážok (dry vs. wet). Ako materiál lamiel boli použité dva typy transparentných akrylátov, prvý typ priepustný pre UV-A aj UV-B žiarenie (UV^+) a druhý priepustný čiastočne pre UV-A žiarenie (UV^-). Vzduch so zvýšenou (EC) alebo normálnou (AC) koncentráciou CO_2 bol vháňaný do komôr pomocou ventilačného systému po celom obvode komory. Vnútoraná plocha každej komory bola rozdelená na dve časti, z toho polovica bola hnojená dusíkatým hnojivom- vápenatým ledkom (N^+) a druhá polovica ostala bez prídavku hnojiva (N^-).

V experimente bola použitá ozimná pšenica odrody Bohemia. Vysiatá bola 10. – 11.10.2013 v hustote 4 MKS na ha (milióny klíčivých semien). Fumigácia zvýšenou koncentráciou CO_2 ($700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) bola zahájená v rastovej fáze v polovici mája. Polovica skleníku bola hnojená dávkou dusíku $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Celkovo bolo sledovaných 48 skleníkov, ktoré pokryli kombinácie všetkých skúmaných faktorov, pričom každá kombinácia bola založená na troch opakovaníach. Zber úrody bol prevedený ručne a následný výmlat prevedený pomocou maloparcelnej mlátičky (Wintersteiger).

3.2 Stanovenie obsahu glutenínovej frakcie metódou SDS-PAGE

3.2.1 Prístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® CZ Hradec Králové. Parametre: kapacita 120 g, najmenší dielik 0,1 mg, atest ČMI.
- Centrifúga MLW T52.1
- Vortex – Stuart firmy MERCI s.r.o.
- Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga
- Aparatúra pre elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD
- Zdroj Power Pac 300 od firmy BIO-RAD
- Trepačka LT2



Obrázok 4 Kultivačné komory na experimentálnej stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem.

(Obrázok láskavo poskytol Ing. Karel Klem. Ph.D.)



Obrázok 5 Detail pokusnej plochy v kultivačnej komore na experimentálnej stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Vľavo nehnojená (N^-), vpravo hnojená (N^+) varianta. (Obrázok láskavo poskytol Ing. Karel Klem. Ph.D.)

3.2.2 Chemikálie

- Akrylamid (SERVA)
- N, N'-methylenbisakrylamid (SERVA)
- TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)
- Kyselina chlorovodíková (Penta)
- SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma ALDRICH)
- Peroxodisíran amónny (SERVA)
- Bromfénolová modř Na sůl (SERVA)
- TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (SERVA)

- Glycin (SERVA)
- DTT – dithiothreitol (Sigma ALDRICH)
- Glycerol (Sigma ALDRICH)
- 2-merkapt ethanol (Sigma ALDRICH)
- Methanol (Lach-Ner)
- Brilantní modř G 250 – Coomasie Blue (SERVA)
- Kyselina octová (Lachema)
- Ethanol (Lachema)
- Butanol (Lachema)

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Roztoky na přípravu gélov

- Roztok A:* 29,2 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bolo rozpustených v 100 ml vody. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C.
- Roztok B:* 18,16 g TRIS bolo rozpustených v 50 ml vody, po rozpustení bolo pH upravené pomocou koncentrovanej HCl na 8,8, potom bol roztok doplnený na 100 ml. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C.
- Roztok C:* 18,16 g TRIS bolo rozpustených v 50 ml vody, po rozpustení bolo pH upravené pomocou koncentrovanej HCl na 6,8, potom bol roztok doplnený na 100 ml. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C.
- Roztok D:* 10 g SDS bolo rozpustených v 100 ml vody. Roztok je nutné chrániť pred svetlom, uchováva sa v temne.
- Roztok E:* 0,1 g peroxidisíranu amónneho bolo rozpustených v 1 ml vody. Roztok je nutné pripraviť pre každé stanovenie čerstvý.
- Roztok F:* 10 mg bromfénolovej modrej bolo rozpustených v 1 ml vody. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C.
- TEMED:* komerčne dodávaný roztok

3.2.3.2 Pomocné roztoky

- Elektrodový pufer:* V 1000 ml bolo rozpustených 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C. Tento roztok sa používa opakovane.
- TRIS pufer:* V 450 ml destilovanej vody bolo rozpustených 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5 ml merkapt ethanolu a 50 ml glycerolu. Po rozpustení bolo upravené pH pomocou koncentrovanej HCl na pH 6,8. Roztok sa uchováva pri laboratórnej teplote.
- Vzorkový pufer:* Bolo zmiešaných 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkapt ethanolu. Roztok sa uchováva pri teplote 4 °C.

3.2.3.3 Roztoky na vizualizáciu bielkovín

- Stabilizačný roztok:* Bolo zmiešaných 100 ml methanolu a 400 ml vody. Roztok bol opakovane používaný a uchovávaný pri laboratórnej teplote.

Barviacii roztok: Bolo zmiešaných 0,5 g Coomassie Blue G, 250 ml methanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 450 ml vody. Roztok bol opakovane používaný a uchovávaný pri laboratórnej teplote.

Odfarbovací roztok: Bolo zmiešaných 250 ml methanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 650 ml vody.

3.2.4 Príprava gélov

Elektroforetické sklá boli najskôr dôkladne odmastené, opláchnuté vodou a vyleštené buničinou namočenou v ethanole. Sklá boli upevnené do stojanu tak, že väčšie sklo bolo vzadu. Spodné hrany skiel boli pritlačené na gumenú podložku, ktorá zabráňovala vytečeniu gélu spomedzi skiel. K stanoveniu bol použitý 10% separačný gél a 5% zaostrovací gél.

3.2.4.1 *Separáčny gél*

Do kadičky boli pomocou automatických pipiet nadávkované požadované objemy jednotlivých roztokov, pre prípravu 10% separačného gélu podľa tabuľky 2.

Tabuľka 2 Objemy roztokov k príprave 10% separačného gélu

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

Roztok E a roztok TEMED bol pridaný tesne pred naliatím roztoku medzi sklá. Následne bol roztok naliaty medzi sklá do výšky asi 2 cm pod horný okraj. Zvyšný roztok bol ponechaný v kadičke ako kontrola tuhnutia gélu. Roztok medzi sklami bol ihneď prevrstvený asi 3 mm vrstvou butanolu, pre vyrovnanie hladiny a ako ochrana proti vyparovaniu vody. Gél sa nechal medzi sklami stuhnúť minimálne 20 minút. Po stuhnutí gélu bol butanol vyliaty spomedzi skiel a gél bol niekoľkokrát premytý destilovanou vodou.

3.2.4.2 *Zaostrovací gél*

Do kadičky boli pomocou automatických pipiet nadávkované požadované objemy jednotlivých roztokov, pre prípravu 5% zaostrovacieho gélu podľa tabuľky 3.

Tabuľka 3 Objemy roztokov k príprave 5% zaostrovacieho gélu

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po pridaní roztoku E a TEMED bol zaostrovací gél rovnomerne naliaty na vrstvu separačného gélu až takmer po okraj a do priestoru medzi sklá bol ihneď vložený elektroforetický hrebienok. Gél sa nechal opäť stuhnúť a hrebienok sa odstraňuje až pred nanášaním vzorkov, inak hrozí vysychanie gélu. Hotový gél je možné uchovávať v chladničke, najdlhšie však do ďalšieho dňa.

3.2.5 Príprava vzoriek

3.2.5.1 Extrakcia gliadínov

Pre extrakciu gliadínov bolo navážených 200 mg pšeničnej múky do označenej mikroskúmavky Eppendorf. Bol pridaný 1 ml 50 % vodného roztoku isopropanolu a mikroskúmavka bola 30 minút pretrepávaná pri laboratórnej teplote. Následne bol obsah odstredený (15 min pri 2 500 g za laboratórnej teploty). Sediment bol rovnakým spôsobom extrahovaný 50 % isopropanolom ešte dva krát.

3.2.5.2 Extrakcia glutenínov

Po extrakcii gliadínov sa plynule pokračovalo v extrakcii glutenínov. Sediment sa extrahoval jedným mililitrom 50 % vodného roztoku isopropanolu, ktorý obsahoval 50 mM Tris ktorého pH bolo upravené na hodnotu 7,5 a 1 % DTT. Extrakcia prebiehala 30 min pri 60 °C za pretrepania mikroskúmaviek v intervale každých 5 až 10 minút. Sediment bol odstredený (10 min pri 10 000 g za laboratórnej teploty). 0,5 ml výsledného supernatantu bolo odobraného do čistej mikroskúmavky Eppendorf a bolo k nemu pridaných 0,5 ml vzorkového pufru. Takto pripravené vzorky boli uchovávané v mrazničke pri teplote asi – 18 °C.

3.2.6 Elektroforéza

Sklá so stuhnutým gélom boli vytiahnuté z držiakov a boli očistené od zvyškov gélu na vonkajších stranách skiel. Elektroforetický hrebienok bol odstránený spomedzi siel. Bola zostrojená elektroforetická aparátúra do ktorej boli zasadené a zaistené sklá tak, že väčšie sklo bolo umiestnené smerom von. Do vnútornej časti, medzi dvojice skiel, bol naliaty elektródový pufer až po vrch skiel, tak že sa pufer dostal až ku gélu a vytvoril sa s elektródami uzavretý elektrický obvod. Do vonkajšej časti elektroforetickej aparátúry, do vaničky z vonkajšej

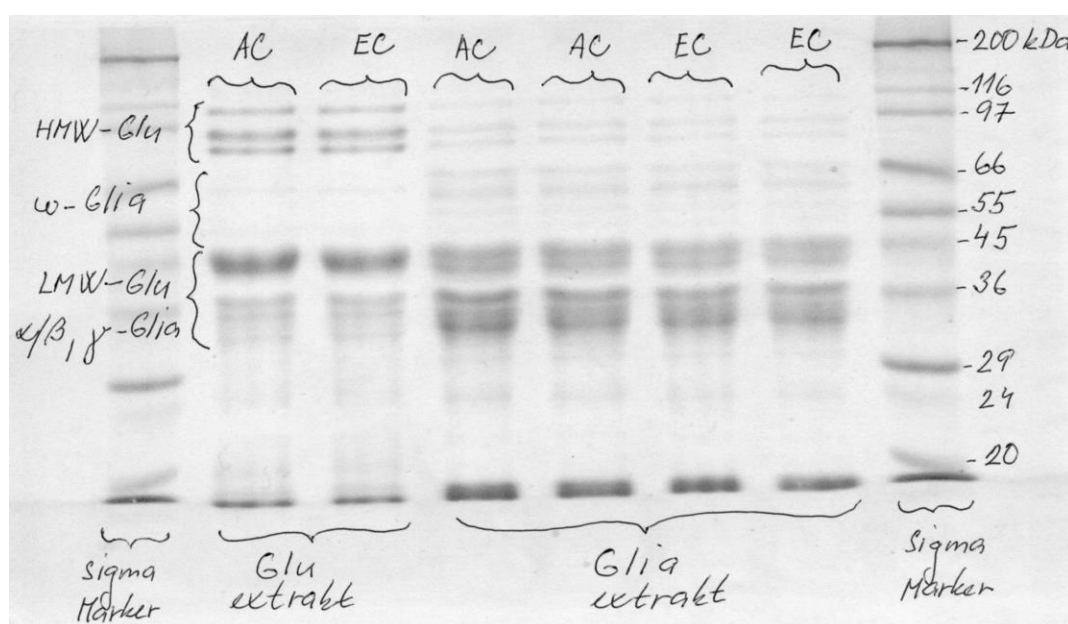
strany skiel, bol naliaty elektródový pufer asi do polovice výšky skiel. Pomocou automatickej pipety a dlhej špičky bolo dávkovaných 5 μ l vzorku glutenínov do každej rovnomernej jamky v géle. Prvú a poslednú jamku sme vždy preskakovali a vzorky do nich sme nenanášali. Takto pripravenú aparátúru sme napojili na zdroj napätia, kde bolo nastavené konštantné napätie 100 V. Elektroforézu sme nechali prebiehať 120 – 130 minút kým čelo vzorku doputovalo až na koniec skla. Počas elektroforézy bolo nutné pravidelne kontrolovať hladinu elektródového pufru. Ak pretekal pufer z vnútornej časti aparátúry do vonkajšej, tak bolo treba pufer dolievať, aby sa neprerušil obvod a tým sa následne nezastavila elektroforéza.

3.2.7 Vizualizácia bielkovín

Po ukončení elektroforézy boli sklá vytiahnuté z aparátúry a vložené do misky s destilovanou vodou. Odrezaním kúsku gélu na strane sme si spravili značku, aby sa nám nezamenila prvá stopa za poslednú. Z misky bola vyliala voda a tá bola nahradená stabilizačným roztokom v ktorom bol gél ponorený 5 minút. Následne bol stabilizačný roztok vymenený za farbiaci na 30 minút. Po zafarbení bol roztok zliaty a gél bol prevrstvený odfarbovacím roztokom, v ktorom ostával gél 90 minút. Celý proces vizualizácie bielkovín od stabilizácie až po odfarbovanie prebiehal na trepačke. Po zliatí odfarbovacieho roztoku bol gél premytý destilovanou vodou a zabalený do potravinárskej fólie s priloženým zodpovedajúcim popisom jednotlivých elektroforetických dráh. Gély boli uschovávané v chladničke pri teplote 4 °C. Celý proces vizualizácie bol vykonávaný v ochranných vinylových rukaviciach kvôli vysokej toxicite akrylamidu.

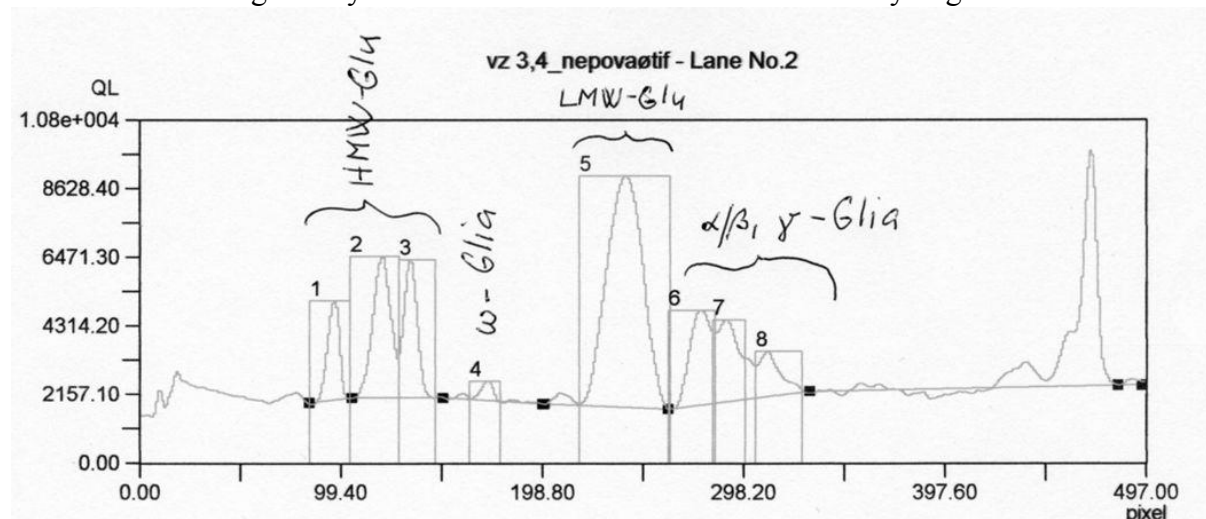
3.2.8 Vyhodnotenie gélov

Hotové gély boli naskenované a kvantifikácia glutenínov bola prevedená pomocou programu FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verzia 3.1. Vysokomolekulárne aj nízkomolekulárne gluteníny boli prevedené zo zón na píky a integráciou bola vypočítaná ich plocha.



Obrázok 6 Scan gélu s popisom pripraveného ku kvantifikácii

Na obrázku 6 môžeme vidieť jednotlivé zóny glutenínovej a gliadínovej frakcie bielkovín rozdelené podľa ich molekulových hmotností. Jednotlivé podjednotky putovali z hornej časti gélu dole. Najmenej vzdialené od začiatku sú vysokomolekulárne gluteníny, ktoré sú rozdelené na ďalšie tri podjednotky (HMW1, HMW2, HMW3). Najďalej doputovali nízkomolekulárne gluteníny. Po stranách na obrázku bol nadávkovaný Sigma-marker.



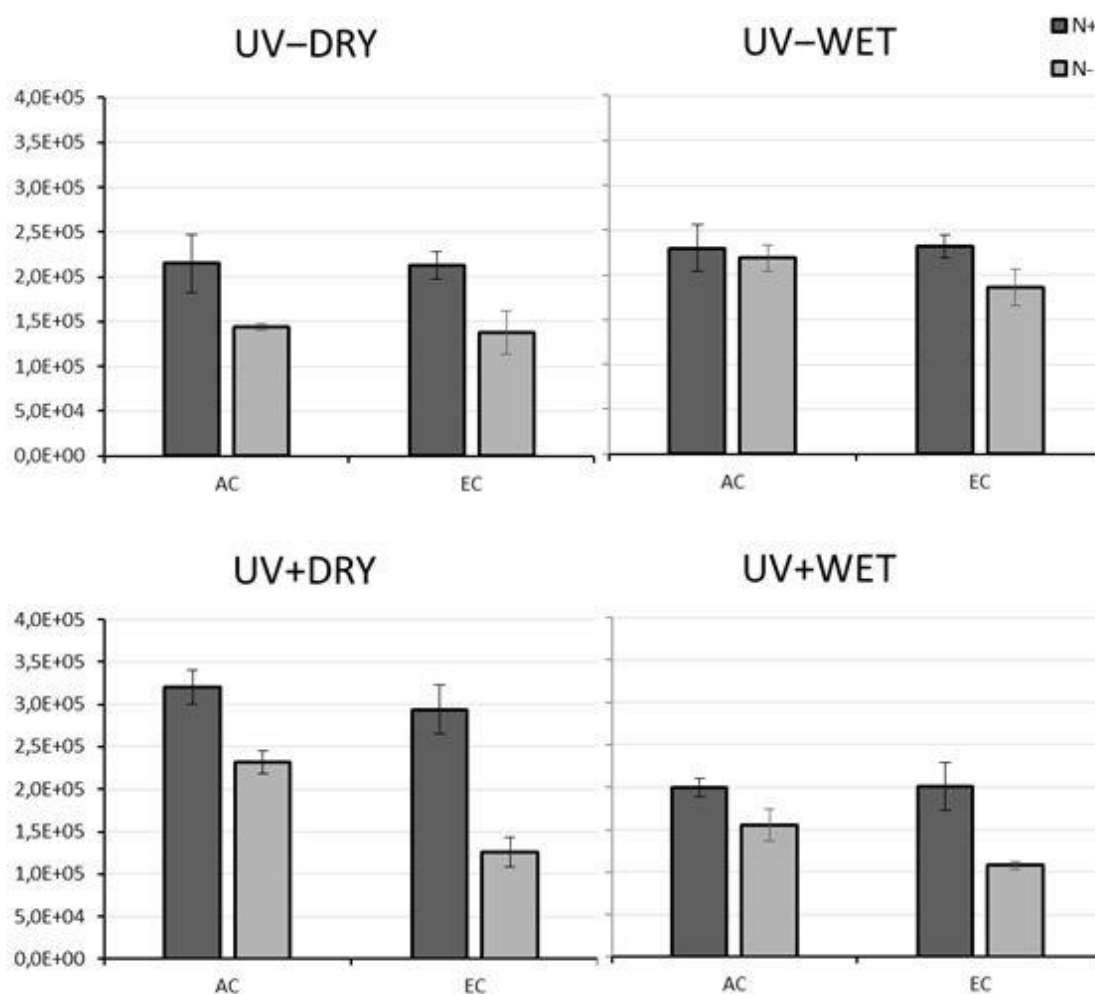
Obrázok 7 Výsledok kvantifikácie naskenovaných gélov

Výsledok kvantifikácie na obrázku 7 zobrazuje píky ktorých plocha popisuje obsah jednotlivých bielkovinových podjednotiek. Pozorovateľný je najväčší obsah LMW glutenínov.

3.2.9 Spracovanie výsledkov

Po tom čo boli zóny jednotlivých podjednotiek glutenínov prevedené na píky, boli hodnoty plôch jednotlivých zón vynášané do grafov. Porovnávané boli celkové množstvá proteínov za rozdielnych podmienok a následne aj jednotlivé podjednotky glutenínov navzájom. Pomocou funkcie STDEV.P sme vypočítali smerodiatnú odchýlku meraní, ktoré bolo vždy prevádzané tri krát. Na základe smerodatnej odchýlky sme následne mohli určiť relevantnosť nameraných údajov. V grafoch sme sledovali parametre ktoré najviac vplývali na koncentráciu glutenínovej frakcie proteínov a späťnosť zvýšenej koncentrácie CO₂ a obsahu glutenínov.

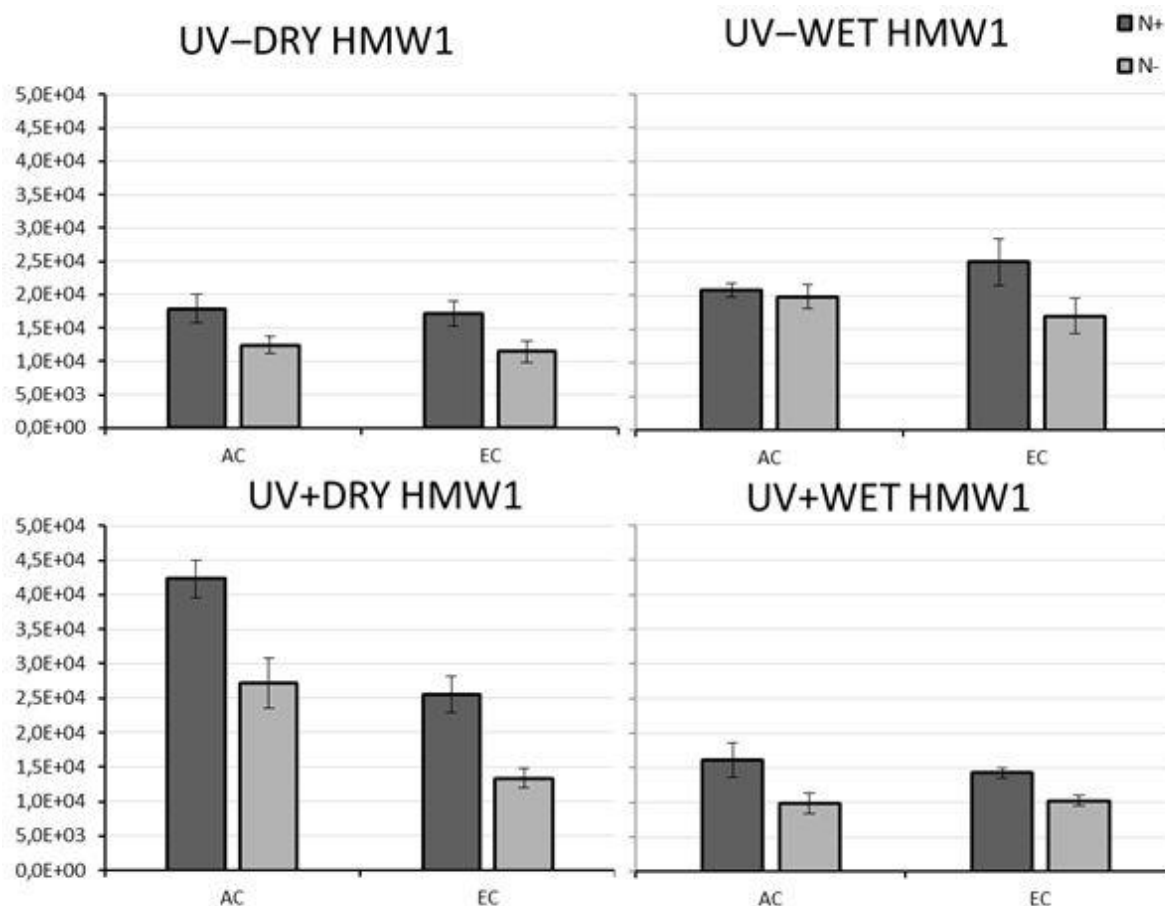
4. VÝSLEDKY



Obrázok 8 Graf zobrazujúci závislosť plochy pík celkového obsahu proteínov glutenínovej frakcie na rozličných podmienkach pestovania pšenice (koncentrácia CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojenie – N⁺ vs. N⁻, sucho – dry vs. wet, UV žiarenie – UV⁺ vs. UV⁻). Stĺpce znázorňujú aritmetický priemer a chybové úsečky so smerodajnou odchýlkou (SD) z troch opakovaní.

Z obrázku 8 je zrejmé, že najväčší vplyv na celkový obsah glutenínov mala dusíkatá výživa. S výnimkou varianty UV⁻ WET AC bol u nehnojovaných rastlín nárast obsahu glutenínov štatisticky významný (pri variante UV⁺ DRY EC N⁺ bol nárast dokonca o 134 % oproti variante UV⁺ DRY EC N⁻). Vplyv zvýšenej koncentrácie oxidu uhličitého sa prejavil len pri nehnojenej variante. Pri normálne zavlažovaných nehnojovaných rastlinách bol zistený väčší obsah glutenínov než v rastlinách trpiacich suchom. Naproti tomu pri hnojovaných rastlinách bol väčší obsah glutenínov pri súčasnom pôsobení sucha. Tento zdanlivý paradox je možné vysvetliť tak, že v podmienkach dostatku vlhky a dusíku rastliny vytvoria viac škrobu a tým relatívne menej proteínov (zriedovací efekt). Pri pôsobení UV žiarenia a sucha bol v zrnách väčší obsah glutenínov ako pri pôsobení UV žiarenia za normálnych zrážok. Pri kultivácii bez prístupu UV žiarenia bol väčší obsah glutenínov v zrnách pri normálnych zrážkach, ako pri kultivácii za sucha. Najvyšší obsah glutenínov sme zaznamenali pri kultivácii za sucha

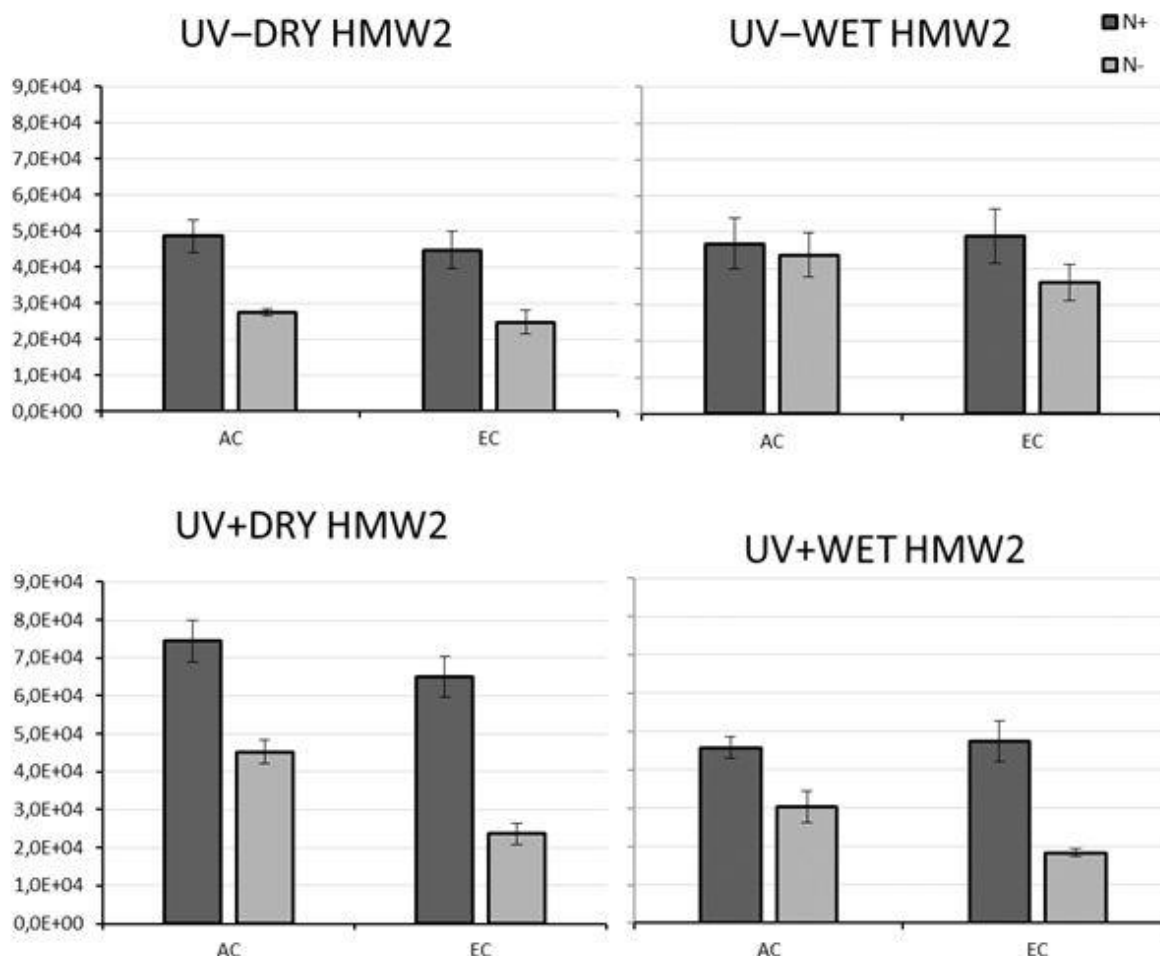
s UV žiarením, v atmosfére s normálnou koncentráciou oxidu uhličitého, za súčasného pôsobenia dusíkatého hnojenia. Za zvýšenej koncentrácie oxidu uhličitého bez dusíkatého hnojiva sa dosiahlo najväčšieho obsahu glutenínov vo variante pri normálnej vlaha bez prístupu UV žiarenia.



Obrázok 9 Graf zobrazujúci závislosť plochy píkov vysokomolekulárnych proteínov 1 glutenínovej frakcie na rozličných podmienkach pestovania pšenice (koncentrácia CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojenie – N⁺ vs. N⁻, sucho – dry vs. wet, UV žiarenie – UV⁺ vs. UV⁻). Stĺpce znázorňujú aritmetický priemer a chybové úsečky so smerodajnou odchýlkou (SD) z troch opakovaní.

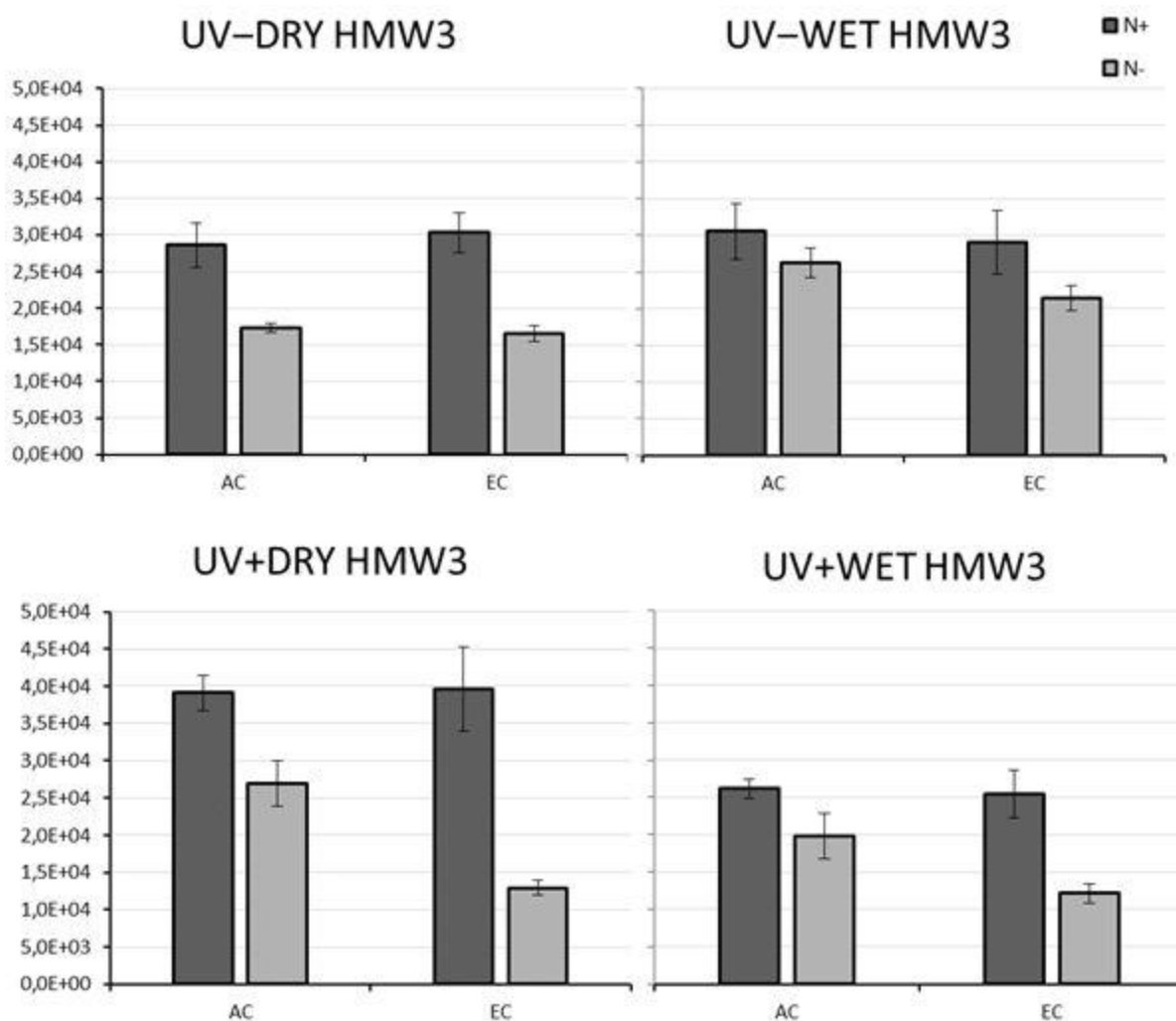
Vo frakcii HMW1 (Obrázok 9) malo tiež najväčší vplyv na zvýšenie obsahu glutenínov dusíkaté hnojenie. Okrem varianty UV⁻ WET AC dusíkaté hnojenie zvýšilo obsah glutenínov vo všetkých variantách. Najviac sa vplyv dusíku prejavil na variante UV⁺ DRY EC kde sa v hnojenej variante zvýšil obsah HMW1 až o 92 % oproti nehnojenej variante. Vplyv oxidu uhličitého sa prejavil len vo variante UV⁺ DRY, kde v hnojených rastlinách za kultivácie pri zvýšenej koncentrácie CO₂ poklesol obsah HMW1 o 40 % a v nehnojených rastlinách za zvýšenej koncentrácie CO₂ poklesli HMW1 o 51 % oproti podmienkam s normálnou koncentráciou CO₂. Obdobne ako pri obsahu celkových glutenínov, obsahovala varianta UV⁺ bez vlaha viac HMW1 ako varianta zavlažovaná, naopak pri UV⁻ bolo dosiahnutých vyšších koncentrácií HMW1 pri zavlažovaní ako pri kultivácii za sucha. Najvyšší obsah HMW1 bol zistený vo rastlinách pestovaných za sucha s UV žiarením, pri normálnej koncentracii CO₂ za prítomnosti dusíkatého hnojiva. Za zvýšenej koncentrácie oxidu

uhlíkatého bez dusíkatého hnojiva sa dosiahlo najväčšieho obsahu glutenínov vo variante pri normálnej vlaha bez prístupu UV žiarenia.



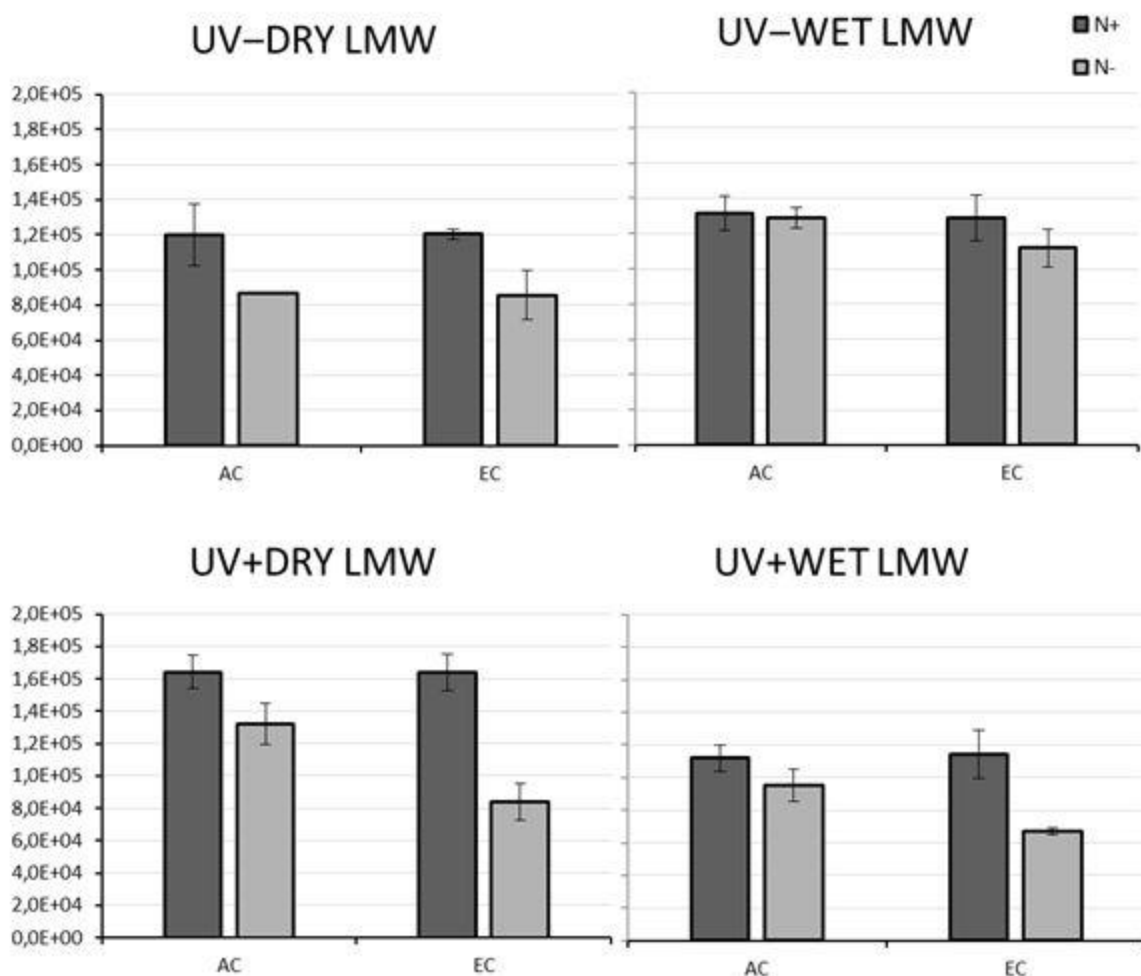
Obrázok 10 Graf zobrazujúci závislosť plochy pík vysokomolekulárnych proteínov 2 glutenínovej frakcie na rozličných podmienkach pestovania pšenice (koncentrácia CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojenie – N⁺ vs. N⁻, sucho – dry vs. wet, UV žiarenie – UV⁺ vs. UV⁻). Stĺpce znázorňujú aritmetický priemer a chybové úsečky so smerodajnou odchýlkou (SD) z troch opakovaní.

Z obrázku 10 je patrné zvýšenie obsahu HMW2 použitím dusíkatého hnojiva u všetkých variant okrem UV⁻ WET AC (pri variante UV⁺ DRY EC N⁺ je zvýšenie až 174 % oproti N⁻). Vplyv zvýšenej koncentrácie oxidu uhličitého sa prejavil len v nehnojených variantách UV⁺ DRY (pokles o 48 %) a UV⁺ WET (pokles o 39 %). Rovnako ako v HMW1, mala priaznivý vplyv na obsah glutenínov HMW2 v zrne, interakcia UV žiarenia so suchom a absencia UV žiarenia so zavlažovaním. Najviac vysokomolekulárnych glutenínov 2 sa zistilo pri hnojenej variante za pôsobenia sucha, UV žiarenia a pri normálnej koncentrácii CO₂. Bez dusíku za zvýšenej koncentrácii CO₂ bol najväčší obsah HMW2 pri zavlažovaní a súčasnej neprítomnosti UV žiarenia.



Obrázok 11 Graf zobrazujúci závislosť plochy píkov vysokomolekulárnych proteínov 3 glutenínovej frakcie na rozličných podmienkach pestovania pšenice (koncentrácia CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojenie – N⁺ vs. N⁻, sucho – dry vs. wet, UV žiarenie – UV⁺ vs. UV⁻). Stĺpce znázorňujú aritmetický priemer a chybové úsečky so smerodajnou odchýlkou (SD) z troch opakovaní.

Z grafov na obrázku 11 je vidieť, že hnojenie zvýšilo obsah glutenínov HMW3 vo všetkých variantách, okrem UV⁻ WET AC (v UV⁺ DRY EC mala hnojená varianta až o 206 % vyšší obsah HMW3 ako nehnojená varianta). Zvýšená koncentrácia CO₂ znížila obsah glutenínov vo variante UV⁺ DRY (-52 %) a UV⁺ WET (-39 %) oproti variantám so súčasnou koncentráciou CO₂. Pri pôsobení UV žiarenia môžeme pozorovať vyšší obsah HMW3 pri suchu, naopak pri absencii UV žiarenia bol obsah HMW3 vyšší pri normálnej vlaha. Najvyšší obsah HMW3 bolo nameraný v suchých podmienkach s prítomnosťou UV žiarenia, s dusíkatým hnojením a zvýšenou koncentráciou oxidu uhličitého. Bez dusíkatého hnojenia, za zvýšenej koncentrácie CO₂ bol najväčší obsah HMW3 pri zavlažovaní a súčasnej neprítomnosti UV žiarenia.



Obrázok 12 Graf zobrazujúci závislosť plochy pík nízkomolekulárnych proteínov glutenínovej frakcie na rozličných podmienkach pestovania pšenice (koncentrácia CO₂ – AC vs. EC, dusíkaté hnojenie – N⁺ vs. N⁻, sucho – dry vs. wet, UV žiarenie – UV⁺ vs. UV⁻). Stĺpce znázorňujú aritmetický priemer a chybové úsečky so smerodajnou odchýlkou (SD) z troch opakovaní.

Ako je patrné z Obrázok 12, dusíkaté hnojenie spôsobuje zvýšenie obsahu nízkomolekulárnych glutenínov u všetkých variant okrem UV⁻ WET (AC aj EC) a UV⁺ WET AC. Oxid uhličitý znižuje koncentráciu glutenínov len v nehnojených variantách UV⁺ DRY (–36 %) a UV⁺ WET (–29 %). Vplyv UV žiarenia a sucha je analogický ako pri HMW3 na Obrázok 12. Najvyšší obsah LMW bol nameraný v suchých podmienkach s prítomnosťou UV žiarenia, s dusíkatým hnojením a normálnou koncentráciou oxidu uhličitého. Bez dusíkatého hnojenia, za zvýšenej koncentrácie CO₂ bol najväčší obsah HMW2 pri zavlažovaní a súčasnej neprítomnosti UV žiarenia.

5. DISKUSIA

Na základe výsledkov nášho experimentu bol vyhodnotený vplyv jednotlivých faktorov na obsah glutenínov v pšeničnej múke. Najvýznamnejší vplyv malo dusikaté hnojenie, ktoré samostatne, aj pri interakcii s ostatnými faktormi významne zvyšovalo obsah glutenínov. Obsah HMW glutenínov pri UV⁺WET AC (čo zodpovedá pestovaniu v súčasnej klíme) bol o 47 % vyšší pri hnojení dusíkom 200 kg.h⁻¹ oproti nehnojenej variante. Výskum z roku 2010 [39] sa zhoduje s našimi výsledkami a potvrdzuje zvýšenie obsahu glutenínov v pšeničnom zrne pri kultivácii za pôsobenia dusikátého hnojenia. Analyzovaných bolo osem kultivarov pšenice, pestovaných pri rôznych koncentráciách dusikátého hnojiva. Pri variante Sremica (kultivar s vynikajúcimi reologickými vlastnosťami) bola zvýšená koncentrácia HMW o 10 % pri hnojení dusíkom 180 kg.h⁻¹ oproti nehnojenej variante. Veľký vplyv dusikátého hnojenia na zvýšenie obsahu bielkovín v pšeničnom zrne preukázali aj Pleijel a kol. [27], ktorí kultivovali pšenicu v tzv. „open-top“ komorách. Dusík, potrebný na produkciu aminokyselín, získavajú rastliny z pôdy. Dusikátym hnojením sa zvyšuje obsah dusíku v pôde, čo priamo zvýši produkciu aminokyselín a následnú proteosyntézu bielkovín.

Högyová a kol. [26] preukázali zníženie celkovej koncentrácie pšeničných proteínov o 7,9 % pri pestovaní za zvýšenej koncentrácie CO₂, zatiaľ čo naše meranie ukázalo pokles glutenínovej frakcie až o 30,5 % pri zvýšenej koncentrácii CO₂ vo variante UV+WET, čo zodpovedá kultivačným podmienkam experimentu Högyovej a kol. Högyová a kol. dokázali aj zníženie obsahu lepku o 11,3 %. Pomer gliadínov a glutenínov, rovnako ako pomer LMW a HMW podjednotiek glutenínu však zostal nezmenený. Zníženie celkového obsahu proteínov vo svojej práci potvrdili aj Nimesha a kol. [28], ktorí zistili pokles až 12,7 % pri zvýšenom obsahu CO₂. Iný výskum Nimeshy a kol. [29] tiež potvrdzuje vplyv CO₂ na nutričné hodnoty obsahu pšeničného zrna, a ukazuje aj vplyv na reologické vlastnosti múky spôsobené znížením obsahu proteínov. Wieser sa vo svojej analýze [30] zaoberá aj zvlášť glutenínmi, gliadínmi, albumínmi a globulínmi. Na gliadíny (+54 %) malo dusikaté hnojenie väčší vplyv ako na gluteníny (+41 %), zatiaľ čo albumíny (+5 %) a globulíny (+4 %) boli sotva ovplyvnené. Zvýšená koncentrácia CO₂ znížila všetky proteíny s výnimkou albumínov a globulínov. Týmto faktorom bola viac ovplyvnená HMW podjednotka glutenínov (-23 %) než LMW podjednotka (-12 %). Naša analýza ukazuje, že pokles LMW podjednotky sa najviac prejavil vo variantách UV⁺WET (-29 %) a UV⁺DRY (-36 %). V HMW podjednotke klesol obsah glutenínov v UV⁺WET (-32 %) a v UV⁺DRY (-50 %). Z čísel vyplýva, že kultivácia pšenice pri zvýšenej koncentrácii CO₂ vo vzduchu viac ovplyvnila HMW podjednotku ako LMW podjednotku. To potvrdzuje hypotézu, že LMW podjednotky sú v rastline syntetizované skôr ako HMW podjednotky, a tým CO₂ ovplyvní obsah glutenínov v podjednotke LMW menej ako HMW.

Vo výskume Alexieva a kol. [31] bol skúmaný vplyv sucha a UV žiarenia na rast pšenice. Sucho znížilo všetky sledované parametre, a to výšku aj váhu rastlín, suchú váhu rastlín, povrch listov aj relatívny obsah vody v listoch (RWC). Triboi a kol. [40] preukázali pokles proteínov vplyvom sucha až o 18 %. V našich výsledkoch pri kultivácii za sucha je obsah glutenínov nižší ako pri zavlažovaní, len pri súčasnej absencii UV-B žiarenia. S UV-B žiarením je za sucha v pšenici viac glutenínov ako pri zavlažovaní. Pri hnojenej variante je

rozdiel v obsahu glutenínov vo variantách UV-DRY a UV-WET zanedbateľný. V hnojenej variante UV⁺DRY AC N⁺ je obsah glutenínov najväčší a UV⁺WET AC N⁺ sa oproti nej výrazne líši (-37 %). Toto výrazné zníženie obsahu glutenínov v hnojenej variante zásobovanej prirodzenou vlhkosťou, oproti hnojenej variante rastlín trpiacich suchom možno vysvetliť zriedčiacim efektom, kedy sa pri dostatku vlhky a dusíkatého hnojiva začne produkovať v pšeničnom zrne viac škrobu na úkor bielkovín. Kultivácia za sucha je jeden z faktorov skracujúcich obdobie plnenia zrna a tým mení pomer proteínových frakcií na základe rozličnej doby akumulácie rôznych frakcií.

UV-B žiarenie spôsobilo v štúdiu z roku 2009 [41] významný pokles obsahu proteínov. Zistené v nej bolo aj zníženie obsahu chlorofylu pri kultivácii za obmedzenia UV-B žiarenia, čo znamená že UV-B má negatívny vplyv na parametre spojené s fotosyntézou. Teramura a kol. [34] preukázal zníženie výnosu semien o 8 %. Naše výsledky ukazujú zníženie obsahu glutenínov pri UV-B žiarení v spojení s vlhkosťou oproti variante bez UV-B žiarenia. Pri kultivácii za sucha je však obsah glutenínov vyšší pri pôsobení UV-B žiarenia ako bez neho. Pri sledovaní vplyvu UV žiarenia na obsah nutričov v pšenici sa ukázalo, že čím väčšie bolo ožarovanie UV počas kultivácie, tým väčší bol obsah dusíku v koreni, stonke, listoch aj zrnách. Zmeny v raste a obsahu bielkovín v pšenici sú čiastočne spôsobené v dôsledku zmien štruktúry nukleových kyselín [32]. DNA silne absorbuje žiarenie v UV oblasti, a je preto náchylná na poškodenie UV-B žiarením. Najbežnejšie poškodenia sa vyskytujú v zlomoch DNA, ktoré ovplyvňujú presné párovanie dusíkatých báz, čo vedie k narušeniu transkripcie a replikácie DNA. Výsledkom je literatúrou opísaný a nami pozorovaný pokles obsahu proteínov pri kultivácii za prítomnosti UV-B žiarenia.

V prostredí pôsobí pri kultivácii na pšenicu viacero faktorov, a preto je dôležité sa venovať nielen vplyvu faktorov jednotlivo, ale aj vzájomným interakciám týchto faktorov. Napríklad pri sledovaní UV-B žiarenia v interakcii so zvýšenou koncentráciou CO₂ sa výnos semien sa zmenšil (-8 %) pri UV žiarení, zväčšil pri zvýšenej koncentrácii CO₂ (+51 %) a pri spojení oboch faktorov sa výnos zvýšil (+14 %), ale menej ako pri pôsobení samotnej zvýšenej koncentrácie CO₂ [34].

Z výsledkov celkových glutenínov, tak aj z výsledkov ich jednotlivých frakcií sa ukázalo že najpriaznivejšie na vysoký obsah glutenínov vplyva kultivovanie pšenice v suchom prostredí, za prístupu UV žiarenia a dusíkatého hnojenia. Najmenšie množstvo glutenínov sme pozorovali u variant bez dusíkatého hnojiva so zavlažovaním a s prístupom UV žiarenia. Zavlažovanie malo pozitívny vplyv na obsah glutenínov pri obmedzení UV žiarenia.

Pri zvýšenej koncentrácii CO₂ v atmosfére je prvou a najefektívnejšou možnosťou zachovania, alebo navýšenia obsahu glutenínov v pšeničnom zrne, dusíkaté hnojenie. Pri nehnojených variantách so zvýšeným obsahom CO₂ v atmosfére dosahovali najväčšie koncentrácie glutenínov kultivary UV-WET, následne UV-DRY, potom UV+DRY a najmenších koncentrácií sa dosahovalo pri variante UV+WET. Po vylúčení dusíkatého hnojenia sa ako ďalšie efektívne podmienky kultivácie ukázalo obmedzenie UV žiarenia spolu s dodávaním vlhky. Pri pestovaní za prístupu UV žiarenia sa však ukázalo ako výhodnejšia suchá kultivácia.

6. ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo vyhodnotiť vplyv zvýšenej koncentrácie oxidu uhličitého v atmosfére na obsah glutenínov v pšenici a taktiež zistiť aký vplyv má dusíkaté hnojenie, sucho a UV žiarenie.

Vzorky ozimnej pšenice odrody Bohemia boli pestované na Experimentálnej stanici Centra výskumu globálnej zmeny Akadémie vied ČR v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Výskumnú stanicu tvorí 24 komôr, umožňujúcich automatickú fumigáciu zvýšenou koncentráciou CO_2 $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, polovica z komôr je nepriepustná pre UV-B žiarenie a otočné lamely na strope komôr umožňujú reguláciu prirodzených zrážok. K tomu bola polovica každej komory hnojená dusíkatým hnojivom v dávke $200 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$. Pšenica bola vysiatá 10. – 11.10.2013 v hustote 400 MKS na hektár a fumigácia zvýšenou koncentráciou CO_2 bola zahájená v rastovej fázi v polovici mája. Týmto spôsobom bolo vysadených a sledovaných 16 unikátnych variant rôznych kombinácií vplyvov prostredia na pšeničné gluteníny, každý v troch opakovaníach, čo umožnilo štatistické vyhodnotenie výsledkov. Glutenínová frakcia bielkovín bola z múky extrahovaná pomocou isopropanolu a DTT, separovaná metódou SDS-PAGE a následne kvantifikovaná pomocou počítačovej denzitometrie.

Najväčší vplyv na pšeničné bielkoviny malo dusíkaté hnojenie, ktoré významne zvyšovalo obsah glutenínov v pšeničnom zrne. Dusíkaté hnojenie a súčasné zavlažovanie však znížilo obsah glutenínov, čo je spôsobené tzv. zried'ovacím efektom, teda akumuláciou škrobu na úkor bielkovín. Vplyv zvýšenej koncentrácie CO_2 na obsah glutenínovej frakcie bielkovín u ozimnej pšenice varianty Bohemia bol vyhodnotený ako preukázateľný v podmienkach kultivácie s UV-B žiarením. HMW podjednotky boli zvýšenou koncentráciou CO_2 vo vzduchu ovplyvnené viac ako LMW podjednotky, čo bolo spôsobené tým, že LMW podjednotky glutenínov sa syntetizujú počas plnenia pšeničného zrna skôr, ako HMW podjednotky. V kombinácii sucha a UV-B žiarenia bol vyšší obsah glutenínov, než pri kultivácii s prirodzenými zrážkami. Pri obmedzení UV-B žiarenia bolo viac proteínov v zrne pri kultivácii za prístupu vlhky. UV-B žiarenie v podmienkach normálnej vlhky znížilo obsah glutenínov, zrejme kvôli citlivosti DNA na žiarenie z UV oblasti, ktorá následne ovplyvňuje proteosyntézu.

7. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] MAREK, M. V. Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011, 253 s. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [2] ZACHOS, J. Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science*. 292(5517), 686-693. DOI: 10.1126/science.1059412. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1059412>
- [3] COHMAP Members. Climatic Changes of the Last 18,000 Years: Observations and Model Simulations. *Science*. 1988-08-26, vol. 241, issue 4869, s. 1043-1052. DOI:10.1126/science.241.4869.1043. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.241.4869.103>
- [4] JOOS, F. a R. SPAHNI. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008-02-05, vol. 105, issue 5, s. 1425-1430. DOI: 10.1073/pnas.0707386105.
- [5] NÁTR, L. Koncentrace CO₂ a rostliny. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-858-6662-5.
- [6] FORSTER, P. V. et al Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., Miller, H. L. (Eds)]. Cambridge university Press, Cambridge, United Kingdom a New York, NY, USA, p207.
- [7] Gliadin and Glutenin, the unique balance of wheat quality
- [8] Guthrie, F.B. 1896. The absorption of water by gluten of different wheats. *Agric. Gazette, New South Wales* 7:583-589.
- [9] Dijkstra P., Schapendonk H. M. C., Seasonal Changes in the response of winter wheat to elevated atmospheric CO₂ concentration grown in open-top chambers and field tracking enclosures. *Global Change Biol.* 5:563-576, 1999.
- [10] SCHEIBE, B. a R. WESTERMEIER. Gel Electrophoresis in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008-09-09. DOI: 10.1201/9781420045673.ch19. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420045673.ch19>
- [11] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular Info®* [online]. 2011 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html>
- [12] VOLKA, Karel. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [13] MAGDELDIN, S. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.

- [14] Cereální suroviny. In: KUČEROVÁ, Jindřiška. *Zpracování zemědělských produktů - rostlinná část* [online]. 2015 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3576
- [15] WRIGLEY, C. W, F. BÉKÉS a W. BUSHUK. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACC International, c2006, x, 466 p. ISBN 978-189-1127-519.
- [16] SCHNOOR, Jerald L. The IPCC Fourth Assessment. *Environmental Science*. 2007, 41(5), 1503-1503. DOI: 10.1021/es072475x. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es072475x>
- [17] STEHNO, Z., V. DVOŘÁČEK a L. DOTLAČIL. Wheat protein fractions in relation to grain quality characters of the cultivars registered in the Czech Republic 2004-2006. In: *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*, 24-29 August 2008, Brisbane, Qld., Australia. Sydney: Sydney University Press, 2008, s. 556-559. ISBN 9781920899141.
- [18] SOCHA, Peter, Barbara MICKOWSKA, Elżbieta MAZUR, Dana URMINSKÁ a Ewa CIEŚLIK. APPLICATION OF WESTERN BLOT ANALYSIS FOR DETECTION OF PROLAMIN PROTEINS IN CEREAL GRAINS AND BREAD. *Potravinářstvo*. 2011, 5(1), -. DOI: 10.5219/115. ISSN 1337-0960. Dostupné také z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/115>
- [19] DAY, L., M.A. AUGUSTIN, I.L. BATEY a C.W. WRIGLEY. Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science*. 2006, 17(2), 82-90. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.10.003. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405002487>
- [20] SMITH, T. M., CRAMER, W. P., DIXON, R. K., LEEMANS, R., NEILSON, R. P a SOLOMON, A. M. The global terrestrial carbon-cycle. *Water Air and Soil Pollution*. 1993, roč. 70, s. 19-37.
- [21] ETHERIDGE, D. M., STEELE, L. P, LANGENFELDS, R. L., FRANCEY, R. J., BARNOLA, J.-M. a MORGAN, V. I. Natural and anthropogenic changes in atmospheric CO₂ over the last 1000 years from air in Antarctic ice and firn. *Journal of Geophysical Research*. 1996, roč. 101, s. 4115-4128.
- [22] CANADELL, J. G., LEQUERE, C., et al. Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, roč. 104, s. 18866-18870.
- [23] Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. *National Oceanic and Atmospheric Administration* [online]. 2007 [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>
- [24] ŽILIĆ, S., M. BARAC, M. PEŠIĆ, D. DODIG a D. IGNJATOVIĆ-MICIĆ. Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011c, vol. 12, issue 12, s.

5878-5894. DOI: 10.3390/ijms12095878. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5878/>

- [25] GOESAERT, H., K. BRIJS, W.S. VERAVERBEKE, C.M. COURTIN, K. GEBRUERS a J.A. DELCOUR. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science*. 2005, 16(1-3), 12-30. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.011. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224404001906>
- [26] HÖGY, P., M. BRUNNBAUER, P. KOEHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, J. FRANZARING, D. ZHUNUSBAYEVA a A. FANGMEIER. Grain quality characteristics of spring wheat (*Triticum aestivum*) as affected by free-air CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany*. 2013, vol. 88, s. 11-18. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847211003145>
- [27] PLEIJEL, Håkan a Petra HÖGY. CO₂ dose–response functions for wheat grain, protein and mineral yield based on FACE and open-top chamber experiments. *Environmental Pollution*. 2015, 198, 70-77. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.12.030. ISSN 02697491. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749114005302>
- [28] FERNANDO, Nimesha, Joe PANOZZO, Michael TAUSZ, Robert NORTON, Glenn FITZGERALD a Saman SENEWEERA. Rising atmospheric CO₂ concentration affects mineral nutrient and protein concentration of wheat grain. *Food Chemistry*. 2012, 133(4), 1307-1311. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.105. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612001574>
- [29] FERNANDO, Nimesha, Joe PANOZZO, Michael TAUSZ, et al. Wheat grain quality under increasing atmospheric CO₂ concentrations in a semi-arid cropping system. *Food Chemistry*. 2012, 133(4), 1307-1311. DOI: 10.1016/j.jcs.2012.07.010. ISBN 10.1016/j.jcs.2012.07.010. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012001385>
- [30] WIESER, Herbert, Remy MANDERSCHIED, Martin ERBS, et al. Effects of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Food Chemistry*. 2012, 133(4), 1307-1311. DOI: 10.1021/jf8008603. ISBN 10.1021/jf8008603. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>
- [31] ALEXIEVA, V., I. SERGIEV, S. MAPELLI a E. KARANOV. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*. 2001, 24(12), 1337-1344. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x. ISSN 0140-7791. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- [32] YUE, Ming, Yuan LI, Xunling WANG a E. KARANOV. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on plant nutrients and decomposition of spring wheat under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 1998, 40(3), 187-196. DOI:

- 10.1016/S0098-8472(98)00036-7. ISSN 00988472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847298000367>
- [33] YUAN, Li, Yue MING, Wang XUNLING a E. KARANOV. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on crop structure, growth and yield components of spring wheat under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 1998, 40(3), 187-196. DOI: 10.1016/S0378-4290(97)00138-X. ISBN 10.1016/S0378-4290(97)00138-X. ISSN 00988472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842909700138X>
- [34] TERAMURA, A. H., J. H. SULLIVAN a L. H. ZISKA. Interaction of Elevated Ultraviolet-B Radiation and CO₂ on Productivity and Photosynthetic Characteristics in Wheat, Rice, and Soybean. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1990, 94(2), 470-475. DOI: 10.1104/pp.94.2.470. ISSN 0032-0889. Dostupné také z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.94.2.470>
- [35] TIAN, X. R., Y. B. LEI a L. H. ZISKA. Physiological responses of wheat seedlings to drought and UV-B radiation. Effect of exogenous sodium nitroprusside application. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007, 54(5), 676-682. DOI: 10.1134/S1021443707050160. ISSN 1021-4437. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443707050160>
- [36] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [37] KODÍČEK, M. ELISA. *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2013-04-13]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa
- [38] YATES, J. R. Mass Spectral Analysis in Proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004-06-09, vol. 33, issue 1, s. 297-316. DOI: 10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538>
- [39] VESELINKA, Djuric, Kondic-Spika ANKICA, Hristov NIKOLA a Popov-Raljic JOVANKA. The effects of nitrogen nutrition and glutenin composition on the gluten quality in wheat genotypes. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2010, 16(1), 73-78. DOI: 10.2298/CICEQ090709007D. ISSN 1451-9372. Dostupné také z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721000007D>
- [40] TRIBOI, E. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*. 2003, 54(388), 1731-1742. DOI: 10.1093/jxb/erg183. ISSN 1460-2431. Dostupné také z: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erg183>
- [41] BALOUCHI, H.R., S.A.M.M. SANAVY, Y. EMAM a A. DOLATABADIAN. UV radiation, elevated CO₂ and water stress effect on growth and photosynthetic characteristics in durum wheat. *Plant, Soil and Environment*. 2009, 2009(55), 10. ISSN 1214-1178.

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AC	normálna koncentrácia CO ₂
A-PAGE	kyslá elektroforéza v polyakrylamidovom géle
COHMAP	Cooperation Holocene Mapping Project
DTT	dithiothreitol
EC	zvýšená koncentrácia CO ₂
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
GC	plynová chromatografia
HMW	vysokomolekulárne podjednotky glutenínu
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LMW	nízkomolekulárne podjednotky glutenínu
MS	hmotnostná spektrometria
OSN	Organizácia spojených národov
SD	smerodatná odchýlka
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom géle s použitím SDS
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
UV	ultrafialové žiarenie