



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

ZMĚNY V OBSAHU GLIADINOVÝCH FRAKCIÍ BÍLKOVIN U DVOU GENOTYPŮ OZIMÉ PŠENICE S ROZDÍLNOU DÉLKOU VEGETAČNÍ DOBY V REAKCI NA ZVÝŠENOU KONCENTRACI OXIDU UHLIČITÉHO.

CHANGES IN THE CONTENT OF GLIADIN PROTEIN FRACTIONS IN TWO
GENOTYPES OF WINTER WHEAT WITH DIFFERENT LENGTHS OF VEGETATION
TIME
IN RESPONSE TO AN ELEVATED CONCENTRATION OF CARBON DIOXIDE.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vlasta Janíčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1299/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Vlasta Janíčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Změny v obsahu gliadinových frakcí bílkovin u dvou genotypů ozimé pšenice s rozdílnou délkou vegetační doby v reakci na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého.

Zadání diplomové práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu délky vegetační doby a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na složení a obsah lepkových bílkovin u pšenice seté. Zvláště se zaměřit na změny v obsahu gliadinů.

V experimentální části sledovat obsah proteinů gliadinové frakce u dvou genotypů ozimé pšenice v závislosti na délce vegetační doby a zvýšené koncentraci oxidu uhličitého.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2019:

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

Bc. Vlasta Janíčková
student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem zvýšené koncentrace CO₂ (700 μmol·mol⁻¹) na obsah proteinů gliadinové frakce pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) rané odrůdy Avenue a pozdní odrůdy Tobac. Pro separaci gliadinových proteinů byla použita metoda A-PAGE a následná kvantifikace byla provedena počítačovou denzitometrií. Byl zjištěn významný vliv genotypu na gliadinovou frakci lepkových proteinů. Vlivem zvýšené koncentrace CO₂ došlo ke snížení obsahu gliadinových frakcí odrůdy Avenue, naopak obsah gliadinových frakcí odrůdy Tobac při zvýšené koncentraci CO₂ vzrostl. Působením zvýšené koncentrace CO₂ byl u odrůdy Avenue zaznamenán výrazný rozdíl v celkovém obsahu gliadinových frakcí a u frakce ω1,2-gliadinů. U odrůdy Tobac byl zjištěn výrazný rozdíl pouze u gliadinové frakce ω1,2.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with an influence of elevated concentration of carbon dioxide (700 μmol·mol⁻¹) on the protein content of gliadin fraction in winter wheat (*Triticum aestivum*) early var. Avenue and late var. Tobac. To separate gliadin, the A-PAGE method was used, proteins were quantified by computer densitometry. Significant influence of genotype on the gliadin fraction of the gluten proteins was found. Due to the increased concentration of CO₂, the content of the gliadin fraction of the Avenue variety was reduced, while the content of the gliadin fraction of the Tobac variety increased. Effect of elevated CO₂ concentration was at var. Avenue showed a significant difference in total content of gliadin fraction and fraction ω1,2-gliadins. A significant difference was found in the var. Tobac only in the fraction ω1,2-gliadin.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

KEYWORDS

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

JANÍČKOVÁ, Vlasta. *Změny v obsahu gliadinových frakcí bílkovin u dvou genotypů ozimé pšenice s rozdílnou délkou vegetační doby v reakci na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115837>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Miroslav Hrstka.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D., za veškerou pomoc, podporu, cenné rady a připomínky, za věnovaný čas a odborné vedení této práce. Dále by ráda poděkovala panu Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za poskytnutou pomoc při zpracování výsledků.

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Změny klimatu	8
2.1.1. Skleníkový efekt.....	9
2.1.2. Změna koncentrace CO ₂	9
2.2. Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny.....	10
2.2.1. Vliv na fotosyntézu	10
2.2.2. Vliv na fotorespiraci.....	13
2.2.3. Vliv na respiraci	14
2.2.4. Vliv na vodivost průduchů	14
2.3. Pšenice.....	15
2.3.1. Morfologie zrna pšenice.....	16
2.3.2. Pšeničné proteiny	17
2.3.2.1. Albuminy a globuliny.....	17
2.3.2.2. Lepek	17
2.3.2.2.1. Gliadiny	19
2.3.2.2.2. Gluteniny	20
2.4. Vliv CO ₂ na pšenici.....	20
2.4.1. Rozdíl mezi kultivary	21
2.5. Metody stanovení lepkových proteinů	22
2.5.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	22
2.5.1.1. SDS-PAGE.....	23
2.5.1.2. A-PAGE	24
2.5.1.3. 2D elektroforéza	24
2.5.2. Kapilární elektroforéza.....	24
2.5.3. Hmotnostní spektrometrie	24

2.5.4.ELISA	25
3.Experimentální část	26
3.1.Materiál	26
3.2.Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE.....	27
3.2.1.Přístroje	27
3.2.2.Chemikálie	27
3.2.3.Příprava roztoků	27
3.2.4.Příprava vzorků	28
3.2.5.Příprava polyakrylamidového gelu	28
3.2.6.Elektroforéza	29
3.2.7.Fixace a vizualizace bílkovin	29
3.3.Vyhodnocení gelů	29
3.4.Statistické zpracování.....	30
4.Výsledky	31
5.Diskuze	39
6.Závěr	41
7.Seznam použitých zdrojů	42
8.Seznam použitých zkratk a symbolů	47

1. ÚVOD

Růst koncentrace CO₂ v atmosféře je běžný jev, ke kterému docházelo od rané historie planety Země. Současná rychlost nárůstu koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře je jednou z nejdůležitějších globálních změn, ke které dochází také v souvislosti s lidskou činností. Koncentrace CO₂ na počátku průmyslové revoluce v polovině 18. století se pohybovala v rozmezí 270–280 μmol·mol⁻¹. V roce 2018 činila koncentrace CO₂ v atmosféře 400 μmol·mol⁻¹. S rostoucí koncentrací CO₂ dochází současně k růstu koncentrace dalších skleníkových plynů v atmosféře (vodní pára, oxidy dusíku, methan, ozon, freony), které ovlivňují klima. S rostoucí koncentrací CO₂ dochází ke zvyšování teploty ovzduší a změnám meteorologických jevů. Zvýšená koncentrace CO₂ stimuluje fotosyntézu, rychlost dýchání a růst rostlin. Lze tedy předpokládat, že v budoucnosti bude docházet ke zvyšování výnosů zemědělských plodin. Současně dochází vlivem zvýšené koncentrace CO₂ k ovlivnění také chemického složení rostlinných pletiv, což ovlivňuje obsah sacharidů, dusíku a bílkovin.

Jednou z nejvýznamnějších hospodářských plodin je pšenice, která představuje hlavní zdroj živin pro většinu populace, a proto se její produkce neustále zvyšuje. Z pšeničného zrna se získává mouka, která je hlavním zdrojem pro výrobu potravin, jako je chléb, těstoviny nebo nudle.

Kvalitu těsta ovlivňují především lepkové proteiny, které lze rozdělit na dvě skupiny: monomerní gliadiny a polymerní gluteniny. Lepek dopovídá za elasticitu a roztažnost těsta, soudržnost a schopnost udržovat vodu. Tyto parametry jsou ovlivněny vzájemným poměrem gliadinů a gluteninů a zastoupením jednotlivých proteinů gliadinové a gluteninové frakce.

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu proteinů gliadinové frakce u dvou odrůd ozimé pšenice s různou délkou vegetační doby pěstované při normální a zvýšené koncentraci CO₂. Práce měla rovněž přinést poznatky o tom, jak se mění obsah jednotlivých frakcí gliadinů v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂.

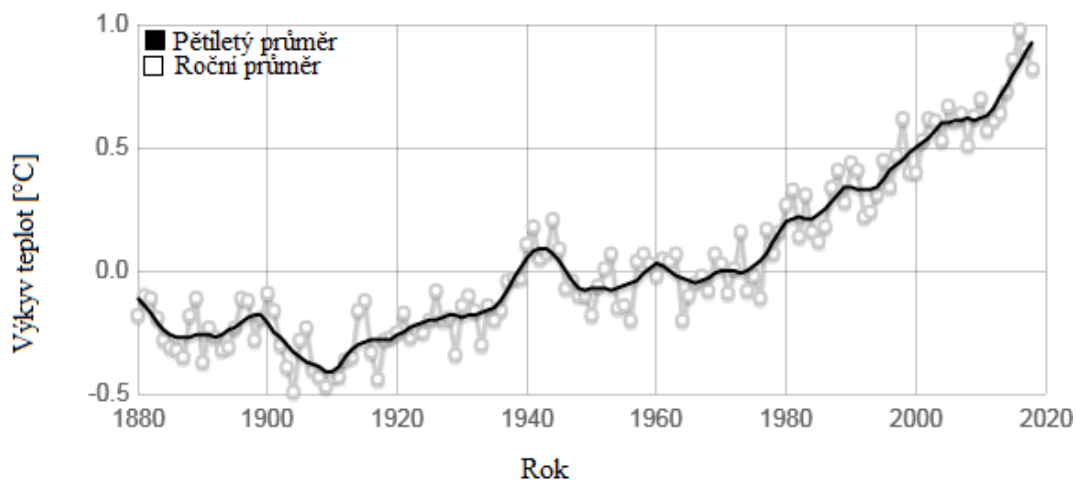
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Změny klimatu

Změnu klimatu lze definovat jako změnu meteorologických podmínek trvajících několik let, popř. déle. Tato změna se může týkat jednoho parametru, častěji je tato problematika komplexnější. [1].

Změny klimatu na Zemi sahají až k samotnému jejímu vzniku. Současné informace o klimatických změnách jsou však omezené, nejčastěji jsou získávány analýzou ledovců nebo mořských korálů. V období posledních 5 až 7 milionů let docházelo ke střídání glaciálů (doba ledová) s interglaciály (doba meziledová), a v důsledku toho docházelo k ochlazení Země. V průběhu období před 20 až 10 tisíci lety došlo k oteplení o 5 °C s průměrnou rychlostí 0,05 °C za 100 let [4]. Od konce 19. století vzrostla teplota vzduchu o 0,6 °C, obě polokoule vykazují stejné teplotní tendence a výkyvy. Současně dochází k řadě klimatickým jevům, jako je tání ledovců a zvyšování teploty hladiny moří. Od poloviny 20. století dochází k rychlejšímu zvýšení noční teploty oproti denní teplotě, což dokazuje zesílení skleníkového efektu [6]. Teplotní výkyvy na Zemi jsou zobrazeny na obrázku 1.

Změny v atmosféře vznikají převážně kumulací skleníkových plynů, mezi které patří oxid uhličitý, methan, oxid dusný, vodní pára, fluorované uhlovodíky aj. Tyto plyny zachycují záření vysílané do vesmíru a dochází tak k oteplování planety. Skleníkové plyny vznikají při spalování fosilních paliv, chovu dobytka, pěstování rýže, používání průmyslových hnojiv a jiných lidských činnostech. To bylo potvrzeno jednak pozorováním od roku 1958, tak i analýzou ledovců [3].



Obrázek 1: Graf znázorňující výkyvy teplot na Zemi v letech 1880 - 2018. Převzato a upraveno dle [7]

2.1.1. Skleníkový efekt

Skleníkový efekt je jev, při kterém krátkovlnné sluneční záření prochází atmosférou a dopadá na zemský povrch, který ohřívá. Ohřátý zemský povrch vyzařuje stejné množství energie o delší vlnové délce do kosmického prostoru. Část záření je pohlcena a vyzářena zpět na zemský povrch skleníkovými plyny [5].

Skleníkový efekt je důležitým jevem, neboť globální teplota zemského povrchu by byla bez skleníkového efektu o 30 až 40 °C nižší. Intenzita skleníkového efektu byla rozdílná v jednotlivých vývojových obdobích Země v závislosti na koncentracích skleníkových plynů. S nízkou koncentrací skleníkových plynů klesala také teplota povrchu Země a tato období se nazývají dobami ledovými [5].

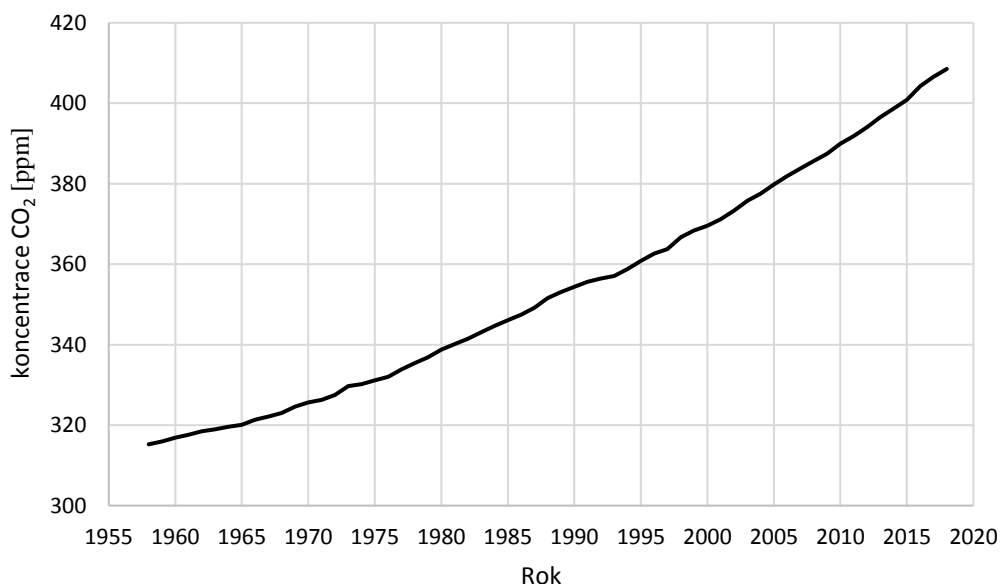
Tepelné záření, které je vysílané ze zemského povrchu, je zachyceno skleníkovými plyny v horních vrstvách atmosféry, kde je teplota mnohem nižší než na povrchu Země. Toto záření nemůže být vysíláno do kosmického prostoru, protože skleníkové plyny sálají při této teplotě velmi slabě. Většina záření je tedy odražena zpět k povrchu Země. Naopak skleníkové plyny v dolních vrstvách atmosféry zachycují tepelné záření, kdy část tohoto záření je pohlcena a dochází k ohřevu vzduchu v dolních vrstvách atmosféry, a část je vysílána jako difúzní záření všemi směry. V závislosti na vyšší teplotě oproti horním vrstvám atmosféry je intenzita difúzního záření vyšší [5].

2.1.2. Změna koncentrace CO₂

Změny koncentrace CO₂ v atmosféře nejsou novým úkazem. Podle analýz docházelo k pravidelnému kolísání koncentrace CO₂ při každém střídání dob ledových a meziledových. Za posledních 420 tisíc let kolísala koncentrace CO₂ v pásmu 190–280 μmol·mol⁻¹, ale nikdy nepřekročila hodnotu 300 μmol·mol⁻¹. Část minulého tisíciletí se koncentrace CO₂ pohybovala nepatrně v rozmezí 270–280 μmol·mol⁻¹ [4]. Koncentrace CO₂ v atmosféře se od poloviny 18. století zvýšila o 25 %, což bývá přisuzováno spotřebě fosilních paliv a změnám ve využívání půdy [2]. Na počátku roku 2007 dosáhla koncentrace CO₂ 381 μmol·mol⁻¹, což je asi o 35 % vyšší koncentrace než před začátkem průmyslové éry [4]. V roce 2018 činila koncentrace CO₂ v atmosféře 400 μmol·mol⁻¹.

Zvýšením koncentrace CO₂ dochází nejen ke zvyšování koncentrace dalších skleníkových plynů, ale také ke zvýšení depozice dusíku na souši i v mořích. [2]. Změny koncentrace CO₂ na Zemi v posledních letech jsou zobrazeny na obrázku 2. Množství CO₂ vzniklé spalováním fosilních paliv závisí na množství uhlíku v palivu. Část CO₂ vyprodukovaného lidskou činností je pohlcována v oceánech, zachycena biosférou a půdou

a část zůstává v atmosféře. Ročně jsou produkovány miliardy tun oxidu uhličitého intenzivní těžbou a spalováním fosilních paliv [4].



Obrázek 2: Graf znázorňující změny koncentrace CO₂ na Zemi v letech 1958 - 2018. Převzato a upraveno dle [7]

2.2. Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

Rostoucí koncentrace CO₂ ovlivní téměř všechny klíčové biologické procesy, zejména fotosyntézu a fotorespiraci a vodivost průduchů [8, 9]. Oxid uhličitý má na rostliny dva přímé účinky. Prvním funkcí CO₂ je role aktivátoru enzymatické aktivity primárního enzymu Calvinova cyklu, ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylázy/oxygenázy, tzv. RUBISCO. Během této reakce dochází k navázání jedné molekuly CO₂ na inaktivní enzym. Jde o pomalý vratný děj, karbamylyaci. V druhém kroku probíhá rychlá nevratná reakce, během které se naváže kation Mg²⁺ a vznikne aktivovaný komplex. Tento děj je katalyzovaný enzymem RUBISCO-aktivázou. Druhá funkce CO₂ spočívá v tom, že je reaktantem při karboxylaci, což je enzymatická reakce CO₂ s primárním akceptorem ribulosa-1,5-bisfosfátem (RuBP). Nejdříve dochází při karboxylaci k navázání CO₂ na aktivní místo enzymu RUBISCO a vzniklý komplex následně reaguje s molekulou RuBP. Tím vznikají triosafosfáty, které jsou primárními produkty Calvinova cyklu. Z popsaných reakcí vyplývá, že CO₂ je aktivátorem a zároveň substrátem fotosyntézy [9].

2.2.1. Vliv na fotosyntézu

Krátkodobé působení zvýšené koncentrace CO₂ vede k nárůstu intercelulární koncentrace CO₂ a tedy ke zvýšení asimilace u C₃-rostlin. Koncentrace CO₂ v atmosféře není

v současnosti schopna plně saturovat karboxylační aktivitu RUBISCO. Vyšší poměr mezi CO_2 a O_2 zvyšuje pravděpodobnost navázání molekuly CO_2 na aktivní místo enzymu RUBISCO, což vede k upřednostnění karboxylační aktivity enzymu před oxygenázovou aktivitou. To se projeví potlačením fotorespiračního cyklu [9].

Ke zvýšení rychlosti asimilace CO_2 dochází při intenzitě slunečního záření vyšší než je $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ [9]. Při nižších intenzitách světla je pro fotosyntézu limitující množství dopadajících fotonů. Za těchto podmínek se vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rychlosti asimilace neprojeví [11].

Odezvy rostlin na zvýšenou koncentraci CO_2 jsou rozdílné, závisí na rostlinném druhu, stupni minerální výživy, délky kultivace nebo synergického působení jiných stresujících faktorů. Stimulační efekt zvýšené koncentrace CO_2 klesá s délkou působení zvýšené koncentrace CO_2 . To lze pozorovat při nedostatečné minerální výživě rostlin. Stav, při kterém je rychlost asimilace při saturační ozáření a saturační intercelulární koncentraci CO_2 rostliny pěstované při zvýšené koncentraci CO_2 nižší než u rostlin kultivovaných v podmínkách přirozené koncentrace CO_2 , se nazývá aklimační deprese fotosyntézy.

Míra poklesu asimilační kapacity rostliny při aklimační depresi se liší pro různé druhy rostlin, a pohybuje se v intervalu 30 – 60 % původních hodnot asimilační kapacity. V literatuře lze nalézt několik hypotéz vysvětlující příčiny nástupu aklimační deprese fotosyntézy [9, 10, 12]:

- a) *Redistribuce nebo snížení koncentrace anorganického fosfátu.* S rostoucí rychlostí fotosyntézy dochází ke zvýšené akumulaci fosforylovaných meziproductů Calvinova cyklu a následně k redistribuci anorganického fosfátu (P_i) mezi vnitřním prostorem chloroplastu a cytosolem. Snížené množství P_i limituje syntézu adenosintrifosfátu (ATP), který je důležitý pro regeneraci akceptoru RuBP a dokončení Calvinova cyklu. Mimo tuto limitaci spotřebou triosafosfátů může snížené množství P_i a ATP vést i k zpětnovazebné limitaci aktivity enzymu aktivasy RUBISCO, což způsobuje pomalou aktivaci enzymu RUBISCO [9, 10].
- b) *Snížení obsahu nebo aktivity enzymu RUBISCO.* Pokles rychlosti asimilace CO_2 může být způsoben poklesem karboxylační aktivity enzymu RUBISCO. Při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 dochází k redukci množství enzymu RUBISCO i jeho vlastní aktivity in vitro. Lokální nedostatek P_i vede ke snížení karboxylační schopnosti RUBISCO v důsledku snížení aktivity RUBISCO-aktivázy. Dalším mechanismem deaktivace enzymu je potlačení jeho genové exprese jeho genů, na které se podílejí nestrukturní sacharidy, jako je glukosa nebo sacharosa. Třetím typem

mechanismu je snížení aktivity enzymu karbonátdehydratázy, a to v důsledku potlačení genové exprese. Enzym katalyzuje rovnováhu mezi CO_2 a HCO_3^- ve stromatu chloroplastů. Napomáhá tak difuzi CO_2 z intercelulárního prostoru listů k místu aktivního působení RUBISCO v chloroplastech. Při zvýšené koncentraci CO_2 v atmosféře může docházet ke zvyšování intercelulární limitace difuze CO_2 a tak k nepřímému snížení aktivity RUBISCO v důsledku nedostatečné karbamylace [9, 10].

- c) *Mechanické poškození tylakoidů v souvislosti s nadměrnou akumulací škrobu.* Transport asimilátů (glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu) z chloroplastu do cytosolu zajišťuje translokátor fosfátu fosfát-triosafosfát-fosfoglycerát-translokátor (TPT). Jelikož TPT pracuje jako striktní antiport s PO_4^{3-} , při nedostatku fosforu dochází k hromadění asimilátů ve stromatu ve formě škrobu. Působením zvýšené koncentrace CO_2 může docházet v delším časovém horizontu k nadměrné akumulaci škrobových zrn v chloroplastech, čímž může dojít k mechanickému poškození tylakoidních membrán [9, 10].
- d) *Inhibice transkripce genů.* Zvýšená akumulace volných sacharidů a tedy nízký poměr obsahu dusíku a uhlíku v listech vede ke snížení genové exprese enzymů, které se podílejí na karboxylaci, nebo proteinů zapojených v transportu elektronů přes tylakoidní membránu. Při zvýšené koncentraci CO_2 dochází k potlačení genové exprese enzymů zapojených v syntéze sacharidů, naopak genová exprese enzymů pro jejich využití je stimulována [9, 10].
- e) *Úroveň minerální výživy a efekt dusíku.* Stav minerální výživy, a zejména výživy dusíkem ovlivňuje stav a sílu aklimační deprese fotosyntézy v důsledku zvýšené koncentrace CO_2 . Nedostatek dusíku prohlubuje aklimační depresi fotosyntézy. Stres, který je způsobený nedostatečnou minerální výživou může eliminovat pozitivní účinek zvýšené koncentrace CO_2 . Z experimentů lze prokázat, že kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 vede ke snížení obsahu dusíku v pletivech listů. V některých případech je možné sledovat tzv. zředovací efekt, kdy je zachováno stejné množství dusíku, ale připadá na vyšší množství biomasy. Nižší obsah dusíku negativně ovlivňuje aktivitu fotosyntetických enzymů, zejména enzymu RUBISCO, který obsahuje 25–50 % listového dusíku. Nedostatek dusíku v listech může způsobit snižování syntézy chlorofylů [9, 10].
- f) *Změny ve struktuře světloběrných komplexů.* Depresi fotosyntetické asimilace CO_2 je možné spojit s poklesem obsahu chlorofylů. Při zvýšené koncentraci CO_2 dochází

k poklesu obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů, chlorofylů a karotenoidů. Rozpad světlosběrných pigmentproteinových komplexů souvisí s potlačením jejich fotorespirace. Ta hraje při vysoké ozáření a vysoké teplotě funkci „zhášeče“, excitací, které mohou nenávratně poškodit proteiny zapojené v transportu elektronů [9, 10].

- g) Změny poměru zdroj/úložiště CO₂ v rostlinách. Při kultivaci rostlin ve zvýšené koncentraci CO₂ jsou reakce fotosyntézy a růstu závislé na schopnosti rostliny vytvářet nová uhlíková úložiště. Obvyklými příklady jsou nárůst listové plochy, tvorba sekundárních letorostů nebo mezipřeslenových větví. Ty ovlivňují rychlost produkce a spotřebu asimilátů, systém zpětných vazeb i celkový metabolismus uhlíku a genovou expresi na úrovni listů nebo chloroplastů. V případě nepřítomnosti uhlíkových úložišť dochází k urychlení a prohlubování přirozeného vývoje aklimační deprese fotosyntézy. Model aklimace fotosyntézy na zvýšenou koncentraci CO₂ vychází z předpokladu, že fotosyntetická kapacita je řízena poměrem aktuálních biochemických změn a morfologických změn. Za biochemickou změnu je považována změna fixace CO₂ enzymem RUBISCO, regenerace RuBP s triosafosfátů. Morfologickými změnami jsou myšleny změny v rychlosti zabudování sacharidů do struktury buněk, nárůst šířky listů, nárůst počtu mezofylových buněk na jednotku listové plochy, nebo tvorbu uhlíkových úložišť. V případě dominance biochemických změn dochází k aklimační depresi fotosyntézy. Naopak v případě dominance morfologických změn dochází k stimulaci asimilačních procesů zvýšenou koncentrací CO₂ [9,10].

2.2.2. Vliv na fotorespiraci

Podstatou fotorespirace neboli glykolátové cesty je oxygenázová aktivita enzymu RUBISCO. V průběhu tohoto metabolického procesu se uvolňují molekuly CO₂ za současné spotřeby ATP a redukčních ekvivalentů NADPH. Fotorespirace je považována za významný ochranný mechanismus, snižuje ale kvantový výtěžek asimilačních reakcí. Slouží jako významný energetický propad a tím dochází k ochraně rostlin před fotoinhibičním poškozením. Některé produkty fotorespiračního cyklu jsou výchozími substráty pro syntézu látek, které se uplatňují při stresových reakcích. Zvýšená koncentrace CO₂ v atmosféře zvyšuje poměr koncentrací CO₂ a O₂ a tím se zvyšuje také pravděpodobnost navázání molekuly CO₂ na aktivní místo enzymu RUBISCO, čímž dochází k potlačení oxygenázové aktivity. Redukcí fotorespirace dochází ke zvýšení dostupnosti ATP a NADPH, což může stimulovat fotosyntetické procesy.

Lze ji také využít pro zajištění transportů produktů fotosyntézy a snížit tak možnost zpětnovazebné limitace asimilace. Potlačení fotorespirace je považováno za hlavní příčinu nárůstu rychlosti asimilace CO₂ u vyšších rostlin při krátkodobém vystavení zvýšené koncentraci CO₂ [9].

2.2.3. Vliv na respiraci

Kultivace rostlin v atmosféře s dvojnásobnou koncentrací CO₂ (700 μmol·mol⁻¹) vede k potlačení mitochondriální respirace o 15–20 % [13]. U některých obilovin byl zaznamenán nárůst respirace až 20 %. Udržovací respirace velmi úzce koreluje s obsahem dusíku v pletivech, a v porovnání s růstovou respirací je citlivější ke změnám teploty i ke změnám koncentrace CO₂ a vodnímu stresu. Možným mechanismem inhibice respiračních procesů je snížení aktivity cytochrom c-oxidázy, tj. redukce přenosu elektronů v dýchacím řetězci, nebo snížení aktivity enzymů na úrovni citrátového cyklu [9].

Rozdílná reakce dýchání na zvýšenou koncentraci CO₂ spočívá ve změnách obsahu nestrukturních sacharidů, ve změnách rychlosti růstu, struktury a složení rostlinné biomasy, v přímé chemické interakci mezi CO₂ a enzymy dýchacího řetězce, v přímé chemické vazbě CO₂ na buněčné komponenty, změny v míře temnotní fixace CO₂ a biosyntéze ethylenu [9].

2.2.4. Vliv na vodivost průduchů

Zvýšená koncentrace CO₂ v okolní atmosféře listu vyvolává pokles průduchové vodivosti, což zřejmě souvisí se zvýšením koncentrace CO₂ v intracelulárách. Snížení vodivosti průduchů při zvýšené koncentraci CO₂ způsobuje pokles rychlosti transpirace. Podrobný mechanismus není doposud dobře popsán. Jednou z možností je zvýšená akumulace sacharosy v apoplastu svěřacích buněk, což následně vede k pomalejšímu otvírání průduchů [9]. Vodivosti průduchů při zvýšené koncentraci CO₂ se věnoval Drake [14], který provedl 41 pokusů s 28 druhy rostlin. Z výsledků bylo patrné, že průměrné snížení vodivosti průduchů při dvojnásobné koncentraci CO₂ je 20 %.

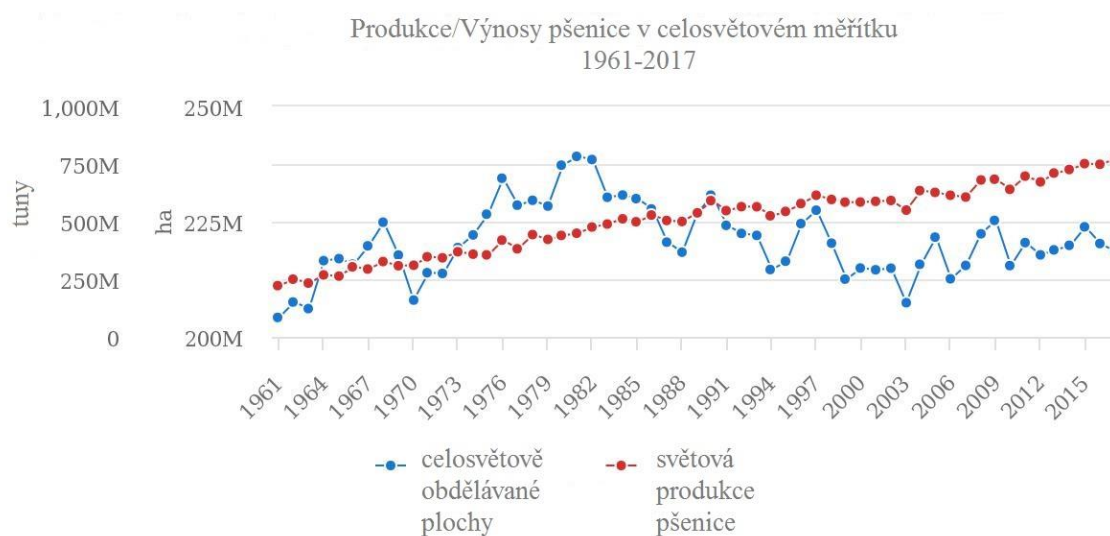
Aklimace vodivosti průduchů během kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO₂ nebyla prokázána. Naopak aklimaci je při zvýšené koncentraci CO₂ přisuzován pokles hustoty průduchů na listech [2].

2.3. Pšenice

Rod pšenice (*Triticum*) patřící do čeledi *Poaceae* (lipnicovité) je jednou z prvních domestikovaných potravinářských plodin [20].

Historie jejího pěstování sahá do Mezopotámie, a to zejména na území úrodného půlměsíce v oblasti Blízkého východu mezi řekami Eufrat a Tigris. Domestikace a kultivace pšenice bývá odborníky datována do období 7500-6500 př.n.l [22]. Toto období přechodu od společnosti lovců a sběračů se nazývá neolitická revoluce [21].

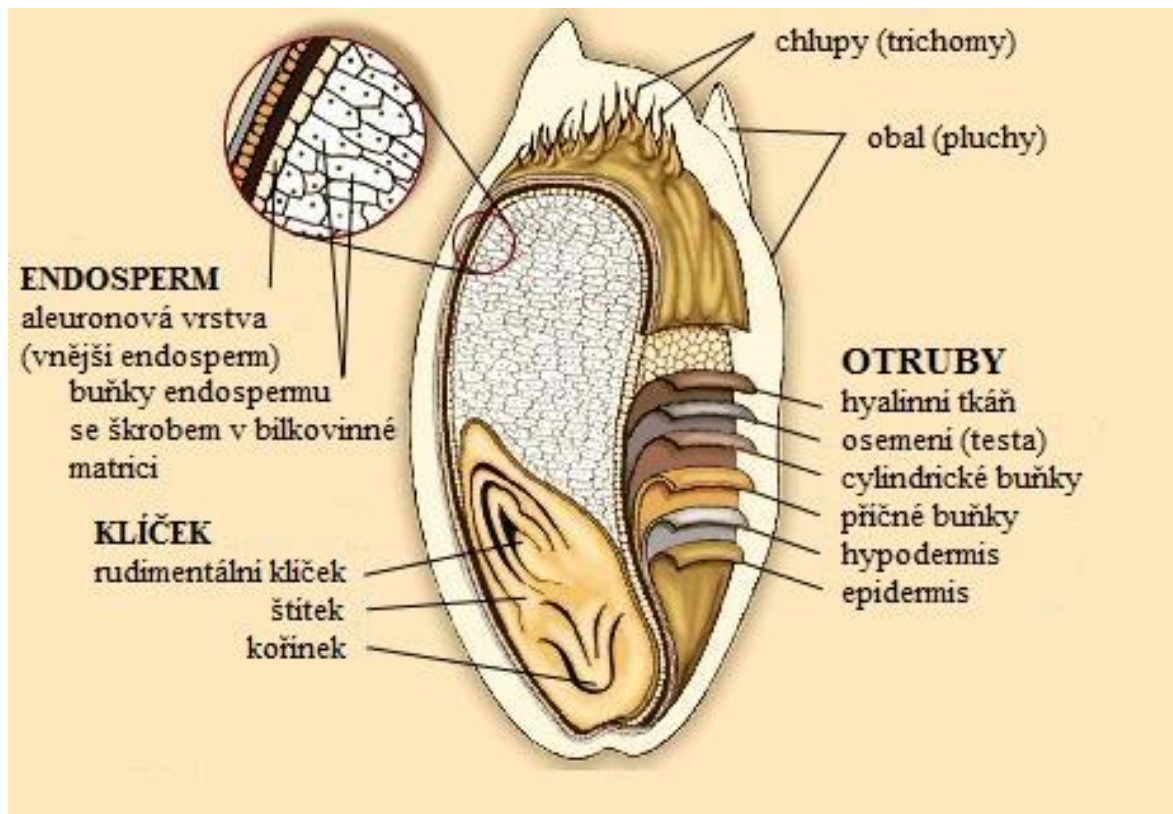
V současnosti je pšenice nejpěstovanější komerční plodinou a pěstuje se na více než 240 milionech hektarů. Její zrna mohou být zpracována na mouku, semolinu atd. Tvoří základní ingredience chleba, těstovin a dalších potravin. Jedná se o hlavní zdroj živin pro většinu populace, její produkce se tedy neustále zvyšuje. Z grafu na obrázku 3 je patrné, že od roku 1961, kdy bylo celosvětově vypěstováno 222 milionů tun pšenice, stoupla celosvětová produkce pšenice na 772 milionů tun pšenice v roce 2017 [20].



Obrázek 3: Celosvětová produkce pšenice v letech 1961 - 2014. Převzato a upraveno podle [20]

2.3.1. Morfologie zrna pšenice

Zrna obilovin se liší zejména tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Charakteristické pro obiloviny je, zda má zrno pluchy nebo je nahé. Pluchatá zrna mají přirostlé pluchy, je tedy nutné je před dalším zpracováním loupát, obušovat a přitom se odstraňují pluchy i s klíčky. Při mlácení nahých zrn lze snadno oddělit samotné zrno od obalu. Pšenice, spolu s žitem a kukuřicí, patří mezi obiloviny s nahými zrny [23]. Skladba pšeničného zrna je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4: Morfologie pšeničného zrna. Upraveno podle [37]

Nejvrchnější vrstvy obalu pšeničného zrna, oplodí, chrání zrno před mechanickým poškozením a krátkodobými účinky vody a škodlivých látek. Jsou tvořeny nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály, zejména celulózu. Pod oplodím se nachází osemení, které ve svých buňkách obsahuje barviva, která udávají barevný vzhled zrna. Některé následující vrstvy obsahují polysacharidické látky, které jsou schopné bobtnat a vázat vodu a udržovat rovnováhu vlhkosti zrna. Tyto vrstvy při mletí přechází do otrub [23].

Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází aleuronová vrstva, která bývá označovaná jako vnější endosperm. Jedná se o vrstvu velkých buněk, jež obsahují vysoký podíl bílkovin (téměř trojnásobek obsahu bílkovin v endospermu) a nejvyšší obsah minerálních látek ze všech buněk zrna. Podle podmínek mletí zůstává aleuronová vrstva

ulpělá na otrubách nebo může být vymleta společně s endospermem do mouk a zvyšuje tak obsah bílkovin a minerálů (popela) v mouce. Stanovení obsahu popela v mouce je jednou z hlavních metod kontroly vymletí zrna ve mlýně [23].

Uvnitř zrna se nachází endosperm a klíček. Klíček je zárodkem nové rostliny a zároveň nese genetickou informaci. Je bohatým zdrojem proteinů, lipidů, minerálních látek a vitaminů. Podléhá oxidaci a enzymatickým změnám. Endosperm představuje největší podíl zrna a technologicky nejvýznamnější část. Dále pak obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu. Chemické složení endospermu tvoří škrob (60–75 %), proteiny (13 %), lipidy (1,5 %) a malý obsah minerálních látek a vlákniny (0,5–1,5 %) [23,24,25,26].

2.3.2. Pšeničné proteiny

Pšeničná zrna obsahují asi 10–15 % suché hmotnosti bílkovin. V roce 1907 vytvořil Osborne [27] klasifikaci na základě rozpustnosti proteinů v rozpouštědlech na albuminy rozpustné ve vodě, globuliny rozpustné ve zředěných roztocích soli, gliadiny rozpustné ve vodném roztoku alkoholu a gluteniny rozpustné ve zředěných alkalických nebo kyselých roztocích [29].

2.3.2.1. Albuminy a globuliny

Albuminy a globuliny se řadí mezi nelepkové bílkoviny. Jsou to zejména strukturní proteiny a metabolicky aktivní enzymy. Albuminy a globuliny přispívají přibližně z 50 % k celkovému obsahu lysinu v semenech, který je u obilovin limitní esenciální aminokyselinou [28]. Některé vysokomolekulární albuminy a některé globuliny mají zásobní funkci [30].

2.3.2.2. Lepek

Lepek, je možné definovat jako „kaučukovitou bílkovinnou hmotu, která zůstává po omytí těsta, při kterém se odstraňují rozpustné složky a škrobové granule“ [31]. Podle Codex Alimentarius je lepek definován jako „bílkovinná frakce z pšenice, žita, ječmene, ovsa nebo jejich odrůd a derivátů, na kterou mají některé osoby nesnášenlivost a která je nerozpustná ve vodě a v roztoku NaCl (0,5 mol·dm⁻³)“ [32].

Jako lepek jsou často označovány gliadiny a gluteniny, které tvoří 75–78 % lepku. Kromě nich se v lepku nachází 3,5–6,8 % lipidů, 0,5–0,9 % minerálů a 7,0–16 % sacharidů [33,34]. Lepkové proteiny mají v rostlině zásobní funkci. Tyto proteiny se hromadí ve fázi plnění zrna a slouží jako zdroj dusíku při klíčení [35,36]. Lepek je zodpovědný za elasticitu a roztažnost těsta, soudržnost a schopnost udržovat vodu [33]. Elasticita určuje pružnost těsta, které je vystaveno působení síly a schopnost návratu do původního stavu po působení síly. Roztažnost těsta je vlastnost těsta, která je založena na protahování těsta ve směru aplikované

síly a následně setrvání v koncové poloze bez porušení struktury těsta. Tyto vlastnosti lepku vytváří z pšenice vhodný materiál v pekárenství [17].

Lepkové proteiny je možné rozdělit na dvě hlavní frakce podle jejich rozpustnosti ve vodném roztoku alkoholu na rozpustné gliadiny a nerozpustné gluteniny. Obě frakce jsou bohaté na prolin a glutamin a mají nízký obsah nabitých aminokyselin, což omezuje výskyt odpudivých sil a podporuje tvorbu agregátů [33, 17].

Gliadiny se vyskytují jako monomerní proteiny a bývají klasifikovány na základě různých parametrů do nejčastěji pěti skupin: ω 5-, ω 1,2-, α -, β -, γ - gliadiny. Gluteniny tvoří agregované proteiny, které jsou spojené disulfidickými vazbami. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 500 kDa do 10 MDa. Některé gluteniny patří k největším proteinům v přírodě. Po redukcí disulfidických vazeb se polymery rozpadají na gluteninové frakce, které lze rozlišit na vysokomolekulární (HMW) a nízkomolekulární (LMW) [33, 37]. Detailní hodnoty zastoupení jednotlivých lepkových proteinů jsou uvedeny tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika lepkových proteinů podle [32]

Frakce lepkových proteinů	Zastoupení mezi celkovými lepkovými proteiny (%)	Částečné aminokyselinové složení (%)				
		Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω 5-gliadiny	3-6	56	20	9	1	1
ω 1,2-gliadiny	4-7	44	26	8	1	1
α/β -gliadiny	28-33	37	16	4	3	2
γ -gliadiny	23-31	35	17	5	1	3
x-HMW-gluteninové podjednotky	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-gluteninové podjednotky	3-4	36	11	0	5	18
LMW-gluteninové podjednotky	19-25	38	13	14	1	3

Pro strukturu a funkčnost lepku je velmi důležitý cystein, třebaže patří k vedlejším aminokyselinám a jeho zastoupení v lepku je 2 % ze všech aminokyselin. Většina cysteinu se v lepku vyskytuje v oxidovaném stavu a tvoří disulfidické vazby uvnitř jednotlivých proteinů nebo mezi řetězci navzájem. Malé množství gliadinů má v důsledku bodových mutací lichý počet cysteinů a díky tomu jsou společně vázány nebo jsou spojeny s gluteniny. Objevují se jako součást gluteninové frakce ve formě polymerů nerozpustných v alkoholu nebo tvoří gliadinové polymery rozpustné ve vodném roztoku alkoholu [32, 38, 39].

Disulfidické vazby jsou hlavním místem většiny redoxních reakcí, které probíhají při zrání zrna, mletí, přípravě těsta a pečení. Při procesu přípravy chleba dochází ke vzniku další kovalentní vazby, kterých se účastní zejména tyrosin. Dále mohou vznikat kovalentní vazby dvou lepkových proteinů vazbou tyrosin-tyrosin. Může dojít k navázání arabinoxylanů a lepkových proteinů přes tyrosin a dehydroferulovou kyselinu a tím k vytvoření další síťové struktury v těstě [32, 40, 41]. Kovalentní struktura lepku je dále spojena iontovými vazbami nebo slabými nekovalentními vazbami jako jsou například vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Tyto vazby jsou začleněny do struktur proteinových agregátů a také ve struktuře těsta. Vodíkové vazby mohou být ovlivněny působením činidel, která štěpí tyto vazby, a dochází k oslabení těsta. Mezi takováto činidla patří např. močovina. Naopak při použití těžké vody (oxidu deuteria D_2O) docílíme zpevnění těsta. Přítomnost iontových vazeb ve struktuře těsta lze prokázat přidávkou soli NaCl nebo bipolárních iontů, mezi které patří aminokyseliny nebo dikarboxylové kyseliny, což těsto také posílí. Hydrofobní vazby jsou odlišné od ostatních vazeb, protože s rostoucí teplotou roste jejich vazebná energie a dochází ke stabilizaci lepkové struktury. To se projeví stabilizací produktu v průběhu pečení [32].

Obě frakce lepkových bílkovin odlišně přispívají k reologickým vlastnostem pšeničného těsta. Hydratované gliadiny mají malou elasticitu a jsou méně kohezivní oproti gluteninům. Přispívají zejména k viskozitě a roztažnosti těsta. Naopak hydratované gluteniny jsou odpovědné za pevnost a pružnost těsta. Největší gluteninové polymery se označují jako gluteninové makropolymer a podílí se na vlastnostech pšeničného těsta a jejich množství v mouce ($20-40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ovlivňuje sílu těsta a objem pečiva [32].

2.3.2.2.1. Gliadiny

Gliadiny jsou většinou přítomny ve formě monomerů, výjimečně mohou tvořit agregáty, jak již bylo uvedeno. Gliadiny je možné rozdělit podle elektroforetické mobility na α -gliadiny s nejvyšší mobilitou, a dále s klesající mobilitou β -, γ -, a ω -gliadiny. Dále je možné gliadiny rozdělit na základě jejich molekulárních hmotností a aminokyselinového složení. Gliadiny typu α - a β - se vyznačují podobnými vlastnostmi, spadají tedy do jedné skupiny α/β -gliadinů. Spolu s γ -gliadiny mají podobné vlastnosti, které se pohybují v rozpětí 28-35 kDa. Naopak ω -gliadiny lze rozlišit na $\omega 5$ -gliadiny s molekulovou hmotností asi 50 kDa, a $\omega 1,2$ -gliadiny s molekulovou hmotností asi 40 kDa [32].

Zastoupení aminokyseliny v jednotlivých frakcích je zobrazeno v tabulce 1. Pro ω -gliadiny je typický nejvyšší obsah glutaminu, prolinu a fenylalaninu, což představuje asi 80 % celkového složení. Naopak neobsahují methionin a cystein, proto nejsou schopné

vytvořit disulfidické vazby. Na rozdíl od ω -gliadinů, ostatní gliadiny jsou schopné tvořit disulfidické můstky. To je umožněno u α/β -gliadinů přítomností šesti cysteinů a u γ -gliadinů přítomností osmi cysteinů na C-terminálním konci [42].

2.3.2.2.2. Gluteniny

Gluteninová frakce tvoří agregované proteiny, které jsou spojené disulfidickými vazbami. Redukcí disulfidických vazeb vznikají gluteninové podjednotky, které jsou podobně jako gliadiny rozpustné v alkoholu. Jak je zřejmé z tabulky 1, hlavní složku gluteninů tvoří z 19–25 % nízkomolekulární gluteninové podjednotky (LMW). Vysokomolekulární gluteninové podjednotky (HMW) tvoří pak asi 10 % gluteninů [32].

HMW podjednotky lze rozdělit do dvou skupin x-HMW s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 83–88 kDa, a y-HMW s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 67–74 kDa. Nomenklatura vysokomolekulárních gluteninů je založena na kódující části genomu (A, B, C, D), typu (x, y) a mobilitě při SDS-PAGE. HMW gluteniny se vyskytují v podobě polymerů a jejich řetězce jsou spojeny vzájemně disulfidickými vazbami. Podjednotka x-HMW obsahuje ve struktuře čtyři cysteiny, z nichž dva jsou zapojeny v intramolekulárních vazbách a další dva na meziřetězcových disulfidických vazbách. Výjimkou je podjednotka D5x, která obsahuje 5 cysteinů. Podjednotka y-HMW obsahuje sedm cysteinů, meziřetězcové vazby jsou známy u tří z nich. Dva cysteiny jsou spojeny paralelně s další jednotkou y a třetí je zapojen ve vazbě s LMW podjednotkou [32, 38, 43]. Pro dosažení vhodných vlastností pšeničného těsta je důležitější podjednotka x-HMW oproti typu y. Pro kvalitu těsta a objem chleba je důležitý příspěvek podjednotky Dx5, která obsahuje cystein navíc, a podjednotky Bx7, která se vyskytuje v největších množstvích [32].

2.4. Vliv CO₂ na pšenici

Zvýšená koncentrace CO₂ ovlivňuje metabolismus uhlíku a dusíku u zemědělských druhů rostlin C₃, mezi které patří pšenice. Vlivem zvýšené koncentrace dochází k redistribuci metabolitů pro vývoj obilí, což ovlivňuje výnos i kvalitu obilí. Díky experimentům s použitím systému FACE (Free Air CO₂ Enrichment) bylo dokázáno, že u C₃ rostlin dochází při zvýšené koncentraci CO₂, dostatku vody a živin k zvýšené produkci nadzemní biomasy [15, 16]. Z experimentálních výsledků jednotlivých pokusů vyplynulo, že zvýšením koncentrace CO₂ na 550 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dochází k zvýšení výnosu zrna v průměru o 10–16 % [15].

Experimenty studující účinky zvýšené koncentrace CO₂ na kvalitu pšenice jsou protichůdné. Některé studie dokazují, že zvýšená koncentrace CO₂ nemá vliv na kvalitu pšenice. Naopak jiné studie přinášejí důkazy o tom, že zvýšená koncentrace CO₂ má výrazný vliv na kvalitu pšenice, a to zejména na pokles koncentrace proteinů [17]. Podle novějších studií dochází při zvýšené koncentraci CO₂ k významným změnám chemického složení rostliny. Jedním z důsledků vyšší koncentrace CO₂ je snížení koncentrace dusíku jak v listech, tak i v zrnech [17]. Kromě koncentrace dusíku dochází ke snižování koncentrace fosforu a některých stopových prvků. Spolu se změnami v elementárním složení dochází ke změnám v makromolekulárním složení, a to zejména u proteinů, kde v důsledku snižování dusíku dochází k poklesu, a dále u sacharidů, jejich koncentrace roste vlivem zvýšené koncentrace CO₂ [17].

Celková koncentrace proteinů v pšenici koreluje s kvalitou chleba, a to zejména díky vlivu na sílu těsta. Podle studie Wiesera a kol. (2008) množství albuminů a globulinů není ovlivněné zvýšenou koncentrací CO₂ v atmosféře. Naopak koncentrace ω5-, ω1,2- a α-gliadinů a vysokomolekulárních gluteninů se zvýšenou koncentrací CO₂ klesá, což bude mít vliv na vlastnosti důležité pro výrobu chleba [18]. Pokles koncentrace bílkovin se pohybuje mezi 5 a 14 % [19]. Při studiích s použitím FACE systému byla koncentrace škrobu zvýšena vlivem zvýšené koncentrace CO₂, nebo zvýšena nebyla vůbec [15,19]. V experimentech FACE systému docházelo vlivem vyšší koncentrace CO₂ ke zvýšení koncentrace fruktosy a fruktanů [15].

Na kvalitu výroby chleba a mlecí vlastnosti mouky mají vliv také lipidy. Jejich koncentrace se zvýšila, došlo pouze ke zvýšení jejich množství sklizené na jednotku plochy. Dále bylo zaznamenáno zvýšení koncentrace draslíku, olova a molybdenu. Naopak vlivem zvýšené koncentrace CO₂ došlo ke snížení koncentrace železa, kadmia, hořčíku, křemíku, sodíku a chromu. Tyto výsledky mohou ovlivnit nutriční hodnotu pšeničného zrna [19].

2.4.1. Rozdíl mezi kultivary

V roce 1997 sledovali Batts et al. měnící se vývoj a fotosyntetické charakteristiky porostů dvou kultivarů pšenice při zvýšené koncentraci CO₂. Oba kultivary se lišily průběhem vývoje a rozdílným stupněm odnožování. Rozdíly mezi kultivary byly zjištěny pouze na počátku vegetace, později byla reakce na zvýšenou koncentraci CO₂ v atmosféře totožná. Zvýšená koncentrace CO₂ vyvolávala intenzivnější odnožování, což se projevilo na hustotě porostu a absorpci záření [2].

Manderscheid a Weigel (1997) porovnávali účinek zvýšené koncentrace CO₂ v atmosféře na fotosyntézu a růst starších a novějších kultivarů jarní pšenice obecné. Porovnávali 6 kultivarů. Byl sledován vliv zvýšené koncentrace CO₂ na růst a fyziologické charakteristiky. Při pokusu nebyl zjištěn vliv na rychlost fotosyntézy, ani na obsah bílkovin nebo obsah chlorofylu v listech. Naopak došlo ke zvýšení plochy listů a byl zjištěn pozitivní vliv na hmotnost sušiny starších kultivarů. U obilí bylo navýšení hmotnosti o 46 %, naopak u nových kultivarů činilo navýšení hmotnosti pouze 28 % [2].

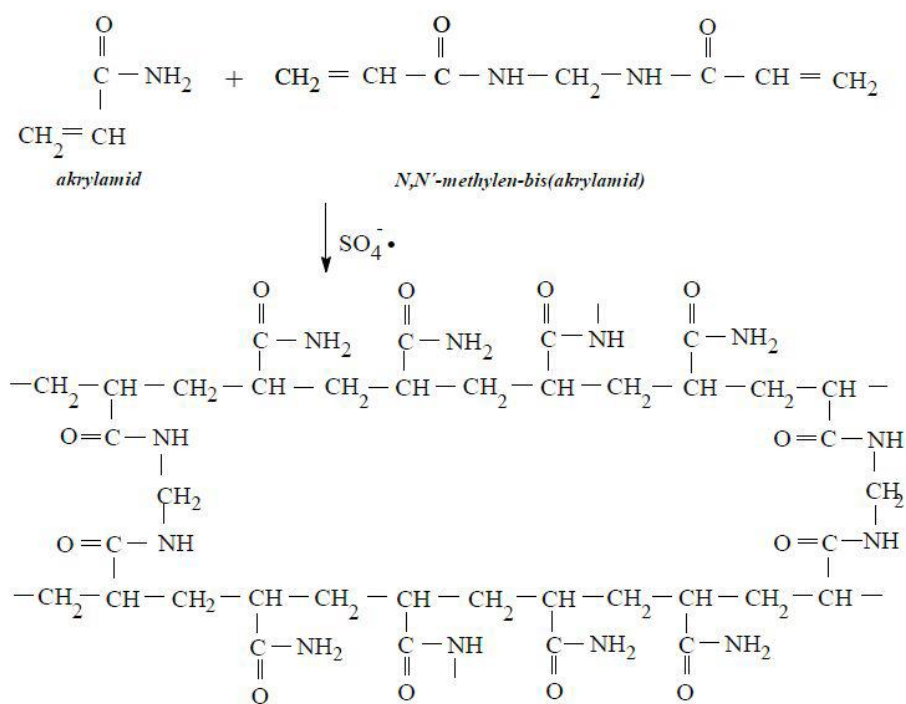
2.5. Metody stanovení lepkových proteinů

2.5.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza je standardní metodou používanou k separaci, identifikaci a purifikaci proteinů [43]. Jde o proces pohybu nabitých molekul v roztoku za použití elektrického pole. Pohyblivost molekul závisí na náboji, tvaru a velikosti molekul, typu, koncentraci a pH pufru, teplotě a intenzitě pole. Probíhá nanesením vrstvy vzorku na porézní matici, nejčastěji gel [44,45]. Použití porézních gelů umožňuje separaci molekul na principu síťového efektu a elektroforetické pohyblivosti látek. Při gelové elektroforéze dochází ke zpoždění velkých molekul oproti malým, protože gel zcela vyplňuje vymezený prostor [44, 46].

Polyakrylamidový gel je inertní, mechanicky pevný, průhledný nosič. Připravuje se kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu. Polymerace probíhá v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru peroxodisíranu amonného, nebo riboflavinu, a tetramethylethyldiaminu „TEMED“ v roli stabilizátoru. Výhodou polyakrylamidového gelu je stabilita gelu a schopnost separovat fragmenty s nízkou molekulovou hmotností do ostrých pásů. Naopak nevýhodou je toxicita monomeru a délka přípravy gelu [44, 46].

Strukturu gelu tvoří otevřené póry různé velikosti, které obsahují kapalinu s pufrem. Velikost pórů je nepřímo úměrná koncentraci N,N'-metylen-bis-akrylamidu. Poměr obou složek ovlivňuje fyzikální vlastnosti vzniklého gelu. Vyšší koncentrací obou složek vzniká tuhý, křehký gel, naopak nízká koncentrace vede ke vzniku gelů měkkým, slizkým. Struktura polyakrylamidového gelu je zobrazena na obrázku 5 [44, 46].



Obrázek 5: Chemická struktura polyakrylamidového gelu.[46]

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu může probíhat diskontinuálně, kdy vznikají velmi ostré zóny rozdělených bílkovin. Principem je využití dvou různých gelů, horního zaostřovacího gelu s velkými póry, ve kterém se bílkoviny zkoncentrují, a spodního dělicího gelu, ve kterém dochází k separaci bílkovin podle elektroforetických pohyblivostí. Pro detekci látek po elektroforéze se využívá barvení pro zviditelnění zón analytu. Proteiny se nejčastěji barví alkoholovým roztokem s barvivem Coomassie brilliant blue. Proteiny se tímto roztokem fixují, denaturují a tvoří komplexy barvivo-protein, které jsou odolné vůči vymývání přebytkem barviva kyselým roztokem nebo elektroforetickým barvením. Další detekcí pro nízkou koncentraci bílkovin (až 0,1 ng) se používá barvení stříbrem [46].

2.5.1.1. SDS-PAGE

Mezi nejběžnější metody pro separaci proteinů je SDS-PAGE, tedy elektroforéza za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), Dodecylsírán sodný má funkci redukčního činidla, které rozkládá disulfidické vazby, tím rozkládá protein na podjednotky a poskytuje záporný náboj, který překrývá náboj proteinu. Proteiny, které jsou pokryté SDS, mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a válcovitý tvar. Z toho důvodu se proteiny dělí na základě jejich rozdílných molekulových hmotností. Použitím SDS lze stanovit molekulovou hmotnost proteinových podjednotek při použití činidel, jako je 2-merkptoethanol nebo dithiothreitol (DTT). Tato metoda nepodává informace o nativním stavu bílkovin [44,46,47].

2.5.1.2. A-PAGE

Elektroforéza v kyselém prostředí (A-PAGE) probíhá za nativních podmínek a nedochází tedy k denuraci molekul a dochází k zachování sekundární a terciární struktury molekul. Tyto molekuly lze rozdělit v závislosti na velikosti i náboji v gelu [49, 50]. Pro separaci proteinů je pH udržováno okolo hodnoty 3 za použití pufru kyseliny octové s glycinem [50]. Důležitou roli hraje teplota gelu, protože pK pudrových iontů a analytů se mění v závislosti na teplotě [50]. Do systému se přidává močovina, která rozkládá vodíkové vazby v proteinech a zvyšuje tak koeficient tření proteinů a dochází ke změně jejich elektroforetické stability [51].

Tato metoda se využívá pro analýzu specifického zastoupení gliadinových frakcí jednotlivých odrůd cereálií, a to zejména pšenice. Dále ji lze využít pro separaci gluteninových proteinů nebo hordeinů ječmene [49].

2.5.1.3. 2D elektroforéza

2D elektroforéza kombinuje současně dvě separační metody, a to izoelektrickou fokusaci a elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s SDS. V první dimenzi se při izoelektrické fokusaci proteiny rozdělují podle izoelektrického bodu a následně jsou separovány v gradientu pH na ostré pásy. V druhé dimenzi se proteiny separují podle jejich molekulové hmotnosti. Tato metoda má vysokou rozlišovací schopnost a umožňuje rozlišit až několik tisíc proteinů na jednom gelu [44].

2.5.2. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační analytické metody a je založena na dvou elektrokinetických jevech, a to na elektroforéze a elektroosmóze. Pro analýzu se používají nejčastěji křemenné kapiláry o malém průměru (< 100 μm) s vrstvou polyimidu na povrchu. Dále se využívají elektrická pole s vysokým napětím [53].

Mezi výhody kapilární elektroforézy patří vysoká účinnost, nízká spotřeba vzorku, rychlost analýz a možnost automatizace. Nevýhodami jsou např. riziko adsorpce proteinů na stěnu separační kapiláry, nízké detekční limity, a to zejména u běžně používaných UV-VIS detektorů [52].

2.5.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je technika založená na separaci iontů v plynné fázi nebo ve vakuu, podle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z). Analyzované molekuly se ionizují, separují se podle poměru m/z , a následně jsou detekovány. Tato metoda je nejpřesnější při určování

hmotnosti iontů a molekul, a pomocí charakteristického hmotnostního spektra lze identifikovat různé látky [54].

2.5.4. ELISA

Heterogenní enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) zkráceně EIA (Enzyme Immuno Assay – enzymová imunoanalýza) umožňuje stanovit analyt v množství 10^{-9} až 10^{-12} g. Patří mezi citlivé neprecipitační imunochemické metody, které detekují nízké koncentrace antigenu a protilátky netvořící precipitáty. Nemohou být tedy stanoveny jinými precipitačními technikami. Vysoká citlivost stanovení je zajištěna navázáním vhodné značky na jeden z imunoreaktantů před interakcí antigen-protilátka. Pro značení se využívají kovalentně vázané enzymy, např. peroxidasa a alkalická fosfatasa. Změnu je možné změřit spektrofotometrickými nebo fluorimetrickými analýzami. Nejčastější typ pevného nosiče při ELISA se používají stěny jamek mikrotitračních destiček, které jsou vhodné pro analýzu většího souborů vzorků [46].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Experiment byl realizován v Experimentální stanici Centra výzkumu globální změny AV ČR. Stanice byla zbudována v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem, která se nachází ve východní části Českomoravské vrchoviny v nadmořské výšce 590 m. Tuto oblast charakterizují bohaté srážky s průměrným ročním úhrnem srážek 609 mm a průměrnou roční teplotou 7,2 °C.

Stanici tvoří 24 komor, které umožňují sledování několika parametrů současně. V komorách je zajištěna fumigace zvýšenou koncentrací CO₂, regulace srážek a omezená propustnost UV záření. Komory mají šestiúhelníkový tvar, jehož opsaná kružnice má průměr 4 m, a výška komor je 2 m. Strop komor je tvořen lamelami, které regulují množství srážek. Pomocí ventilačního systému v obvodu komory je do komory vháněn vzduch s normální (AC) a zvýšenou (EC) koncentrací CO₂.

Plocha uvnitř komor byla rozdělena na poloviny, přičemž jedna z nich byla hnojena dávkou dusíku 200 kg·ha⁻¹ (N⁺). Druhá část zůstala zcela bez hnojení (N⁻). V některých z komor byla zvýšená koncentrace CO₂ (700 μmol·mol⁻¹), v některých byla koncentrace CO₂ normální (400 μmol·mol⁻¹).

Příprava materiálu byla provedena Ústavem výzkumu globální změny Akademie věd České republiky. Pro experiment byly použity dva genotypy pšenice ozimé: Avenue (raná odrůda) a Tobac (pozdní odrůda).



Obrázek 6: Kultivační komora na experimentální stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Obrázek poskytl Ústav pro výzkum globální změny AV ČR.

3.2. Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE

Stanovení obsahu gliadinů bylo provedeno metodou Polišínské et al. [55] a ČSN 461085-2.

3.2.1. Přístroje

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

Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF

Vortex – Stuart, firma MERCI

Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE

Aparatura pro vertikální elektroforézu s možností chlazení – Owl Separation System, Inc., Portsmouth NH USA

Zdroj – Major Science MP-500P

Třepačka KS 130 BASIC, firma IKA

3.2.2. Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

N,N'-Methylenbisakrylamid (SIGMA ALDRICH)

Močovina (MERCK KGaA)

Kyselina askorbová (LACH-NER)

Síran železnatý heptahydrát (LACH-NER)

Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)

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

2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)

Pyronin Y (SIGMA ALDRICH)

Kyselina octová – ledová (SIGMA ALDRICH)

Glycin (SIGMA ALDRICH)

Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA ALDRICH)

3.2.3. Příprava roztoků

Extrakční roztok pro gliadiny: 25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu Y bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

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

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

Gelový tlumivý roztok: K 20 ml ledové kyseliny octové a 1,00 g glycinu bylo přidáno 1000 ml destilované vody. Roztok byl uchován při teplotě 4 °C.

Elektrodový tlumivý roztok: 8,0 ml ledové kyseliny octové a 0,8 g glycinu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 2000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchován při teplotě 4 °C. Elektrodotový tlumivý roztok nelze používat pro elektroforézu opakovaně.

Fixační roztok: 100 g kyseliny trichloroctové bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

Barvicí roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňky byla doplněna ethanolem po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C

3.2.4. Příprava vzorků

Pro extrakci gliadinů bylo do mikrozkuavek Eppendorf o objemu 1,5 ml naváženo 50 mg pšeničné mouky. Tato hmotnost odpovídá hmotnosti jednoho zrna. K navážce bylo přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny a obsah mikrozkuavek byl důkladně promíchán na vortexu. Uzavřené mikrozkuavky byly ponechány v chladničce do druhého dne. Následně byla směs odstředěna při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkuavky a následně byl použit k analýze. Extrakty vzorků byly uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.2.5. Příprava polyakrylamidového gelu

Do 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo přidáno v 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 na objem 100 ml gelovým tlumivým roztokem. Následně byla směs vychlazená na teplotu cca 6 °C. Do vychlazeného roztoku bylo současně přidáno 0,3 ml TEMED a 0,2 ml peroxidisíranu amonného. Roztok byl promíchán

a následně jím byla po okraj naplněna gelová kazeta vychlazená na 6 °C. Do horní části gelové kazety byl umístěn hřeben pro vytvoření prohlubní pro dávkování vzorku. Polymerace proběhla do 5 min. Gel je možné použít cca po 60 minutách od zpolymerování gelu nebo je možné jej uchovat do druhého dne v chladničce.

3.2.6. Elektroforéza

Z gelu byl vytažen hřeben a vytvořené prohlubně pro dávkování vzorku byly promyty elektrodoým tlumivým roztokem. Gely byly připevněny na aparaturu na elektroforézu a ta byla naplněna elektrodoým tlumivým roztokem. Zdroj byl připojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody – anody, k záporné elektrodě ve spodní části aparatury. Po dobu 60 minut byla spuštěna elektroforéza na prázdno (tzv. „předelektroforéza“) při konstantním napětí 480 V. Poté byla elektroforéza vypnuta a do prohlubní byly dávkovány připravené extrakty vzorků v množství 5 μ l. Přístroj byl opět zapnut a elektroforéza probíhala za stejných podmínek po dobu dvojnásobné doby běhu barviva pyroninu Y v čele. V souvislosti s velikostí vloženého napětí bylo nutné elektrodoý roztok v průběhu elektroforézy chladit.

3.2.7. Fixace a vizualizace bílkovin

Po ukončení elektroforézy byl gel uvolněn do misky s destilovanou vodou. Následně byla voda z misky vylita a gel byl převrstven 300 ml fixačního roztoku, ke kterému bylo přidáno 15 ml barvicího roztoku. Je nutné, aby byl gel v průběhu barvení zcela ponořen. Miska s gelem byla umístěna na třepačku a barvení probíhalo po dobu 24 hodin. Příliš dlouhý čas zapříčinil obarvení celého gelu. Po ukončení barvení byl gel promyt vodou z vodovodu za účelem odstranění přebytečného barviva. Gel byl uchováván na skle, zabalený do potravinářské fólie, která zabraňuje vysychání gelu, v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3. Vyhodnocení gelů

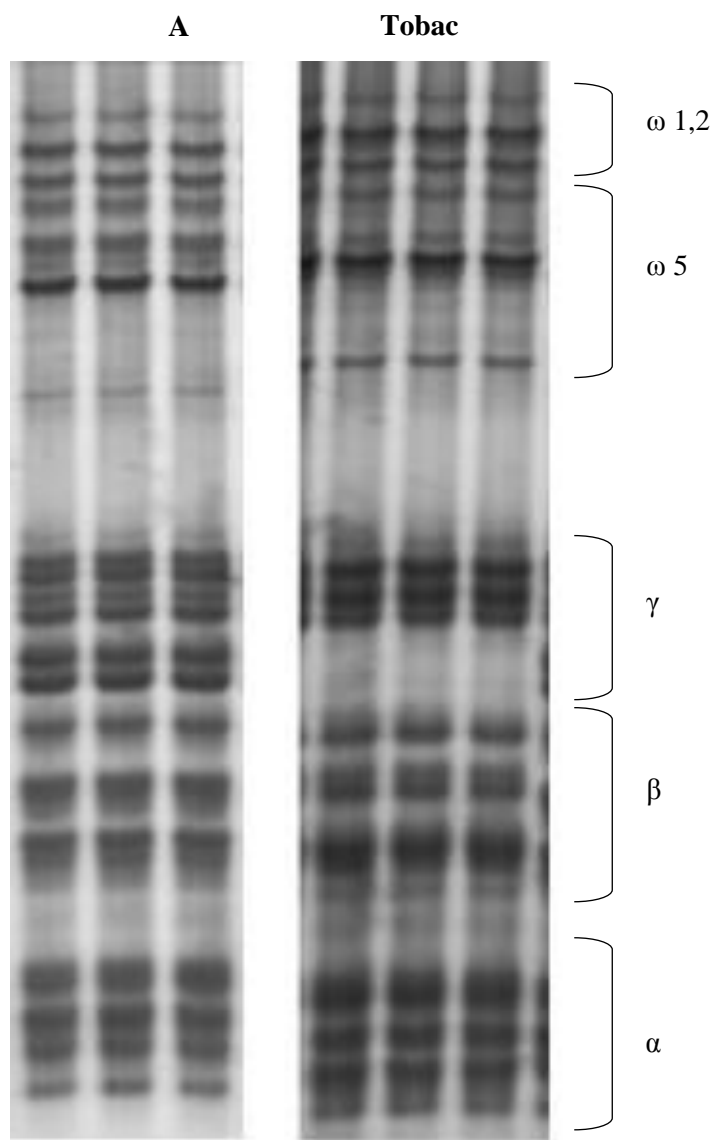
Hotové gely byly naskenovány a následně byly gliadinové podjednotky kvantifikovány počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.1). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána plocha těchto píků. Píky nebyly přepočítávány na koncentraci z důvodu absence standardu. Pro porovnání jednotlivých variant byly použity jednotlivé plochy píků.

3.4. Statistické zpracování

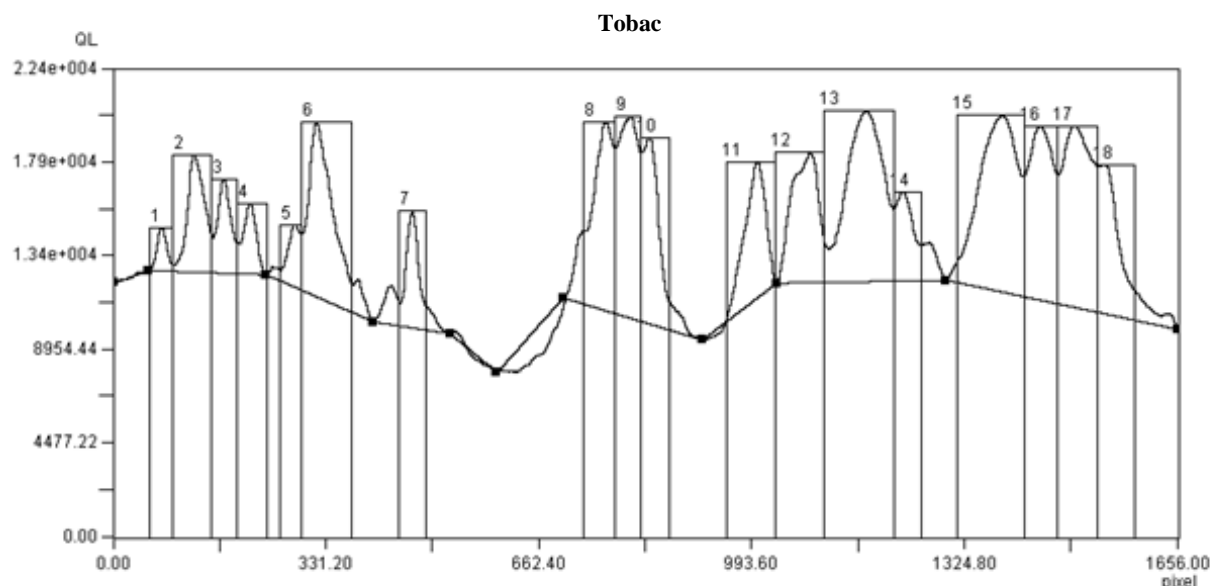
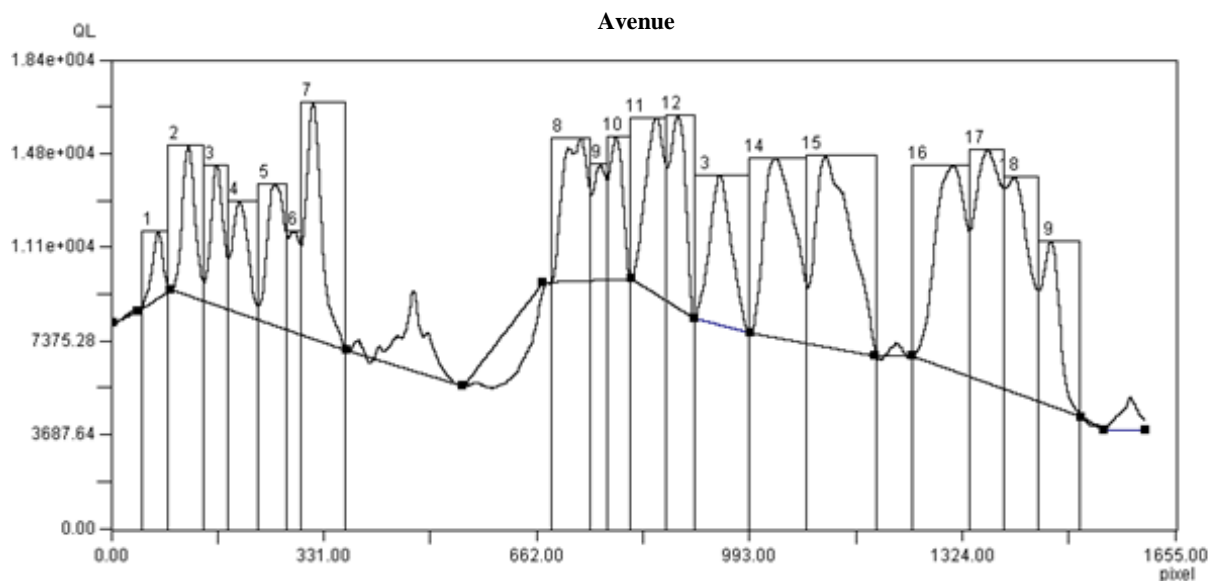
Statistická analýza dat byla provedena pomocí MS Excel. Pro vyhodnocení vlivu zvýšené koncentrace CO₂ bylo použito vícefaktorové analýzy variace (ANOVA). Pro vyloučení odlehlých výsledků byl využit Tukeyův test při hladině významnosti $p = 0,05$.

4. VÝSLEDKY

Na obrázku 7 jsou znázorněny gely, které byly získány v experimentální části diplomové práce. Představují spektrum gliadinů dvou odrůd pšenice ozimé: Avenue a Tobac. Převedení jednotlivých zón gelů na píky, jejichž plochy byly použity pro vyhodnocení, je uvedeno na obrázku 8.



Obrázek 7: A-PAGE gliadinových proteinů dvou odrůd pšenice ozimé - Avenue, Tobac – s popisem gliadinových frakcí



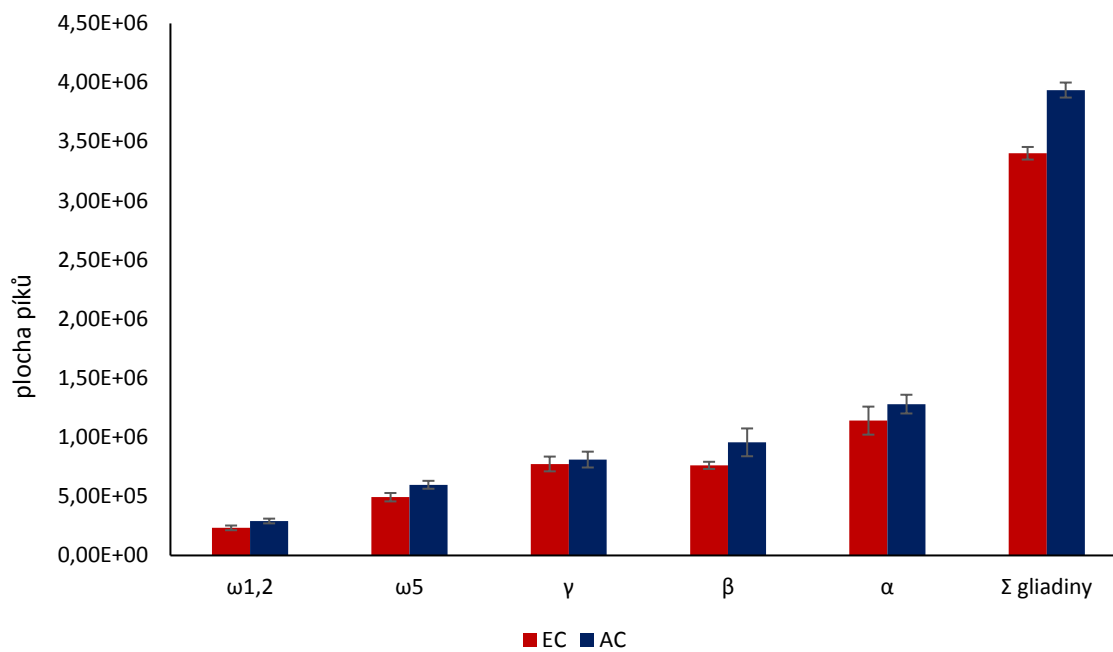
Obrázek 8: Převedení zón na píky v rámci A-PAGE gliadinové frakce odrůd pšenice ozimé.

Z obrázku 7 je patrné, že mezi odrůdami jsou viditelné rozdíly v jednotlivých gliadinových frakcích. Chromatogramy na obrázku 8 toto potvrzují.

Odrůda Avenue je bohatší na gliadinové frakce než odrůda Tobac. Liší se zejména počtem frakcí γ -gliadinů. Má tři frakce ω 1,2-gliadinů, čtyři frakce ω 5-gliadinů, pět frakcí γ -gliadinů, tři frakce β -gliadinů a čtyři frakce α -gliadinů. Celkově má tedy odrůda Avenue devatenáct frakcí gliadinů. Odrůda Tobac má pouze tři frakce γ -gliadinů a čtyři frakce β -gliadinů. Celkově má odrůda Tobac 18 frakcí gliadinů.

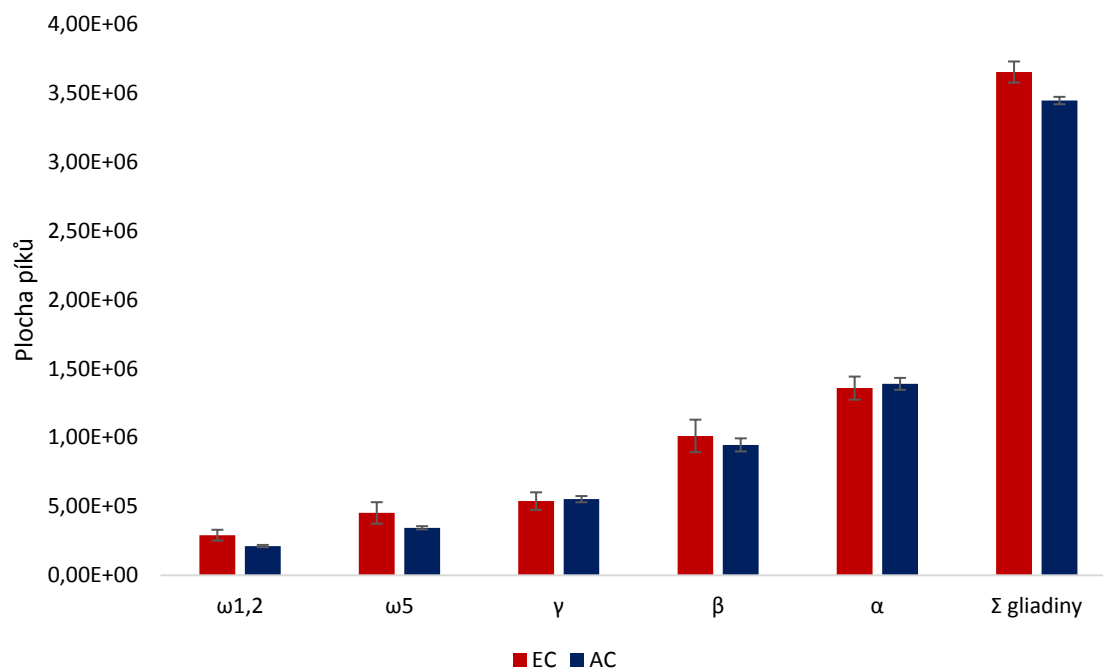
Graf na obrázku 9 znázorňuje srovnání obsahu gliadinů odrůdy Avenue v závislosti na koncentraci CO_2 . Celkový obsah gliadinů pšenice pěstované při zvýšené koncentraci CO_2 byl o 13,6 % nižší než u pšenice pěstované při normální koncentraci CO_2 , a při porovnání byl

tento rozdíl je statisticky významný. Rozdíl mezi obsahem gliadinů pšenice pěstované za zvýšené koncentrace CO₂ a pěstované při normální koncentraci CO₂ je statisticky významný u frakce ω_{1,2} (19,9 %). U frakce β je rozdíl mezi obsahem gliadinů pěstovaných za zvýšené koncentrace CO₂ značný (20,4 %), není však statisticky významný. Nejmenší rozdíl je pak u frakce γ (4,6 %).



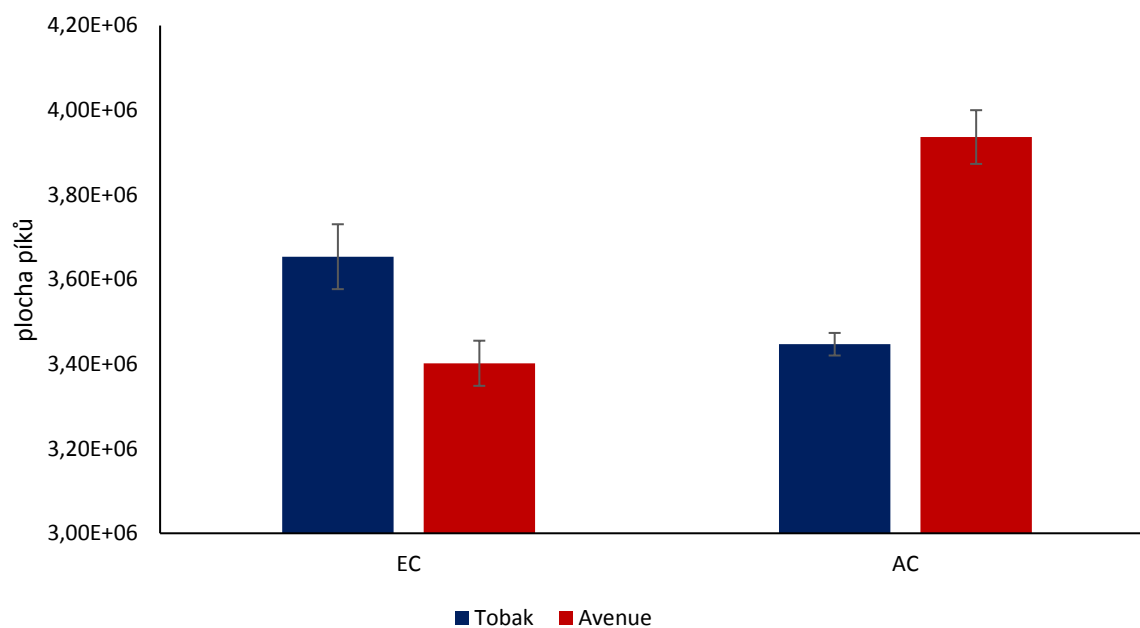
Obrázek 9: Vliv koncentrace CO₂ na obsah gliadinů u odrůdy Avenue

Graf na obrázku 10 ukazuje srovnání obsahu gliadinů odrůdy Tobac v závislosti na koncentraci CO₂. Celkový obsah gliadinů pšenice pěstované při zvýšené koncentraci CO₂ byl o 5,7 % vyšší než u pšenice pěstované při normální koncentraci CO₂, tento rozdíl není dle analýzy statisticky významný. Značný rozdíl je zřejmý u frakce ω_{1,2}, kdy se obsah gliadinů liší o 27 %, a tento rozdíl je statisticky významný. U frakce ω₅, činil rozdíl obsahu gliadinů při pěstování za zvýšené koncentrace CO₂ a normální koncentrace CO₂ 23,8 %. Naopak u frakce γ (2,6 %) a α (2,3 %) je vzájemný rozdíl malý. Rozdíly obsahu gliadinů u frakcích ω₅, γ, β a α nejsou statisticky významné.



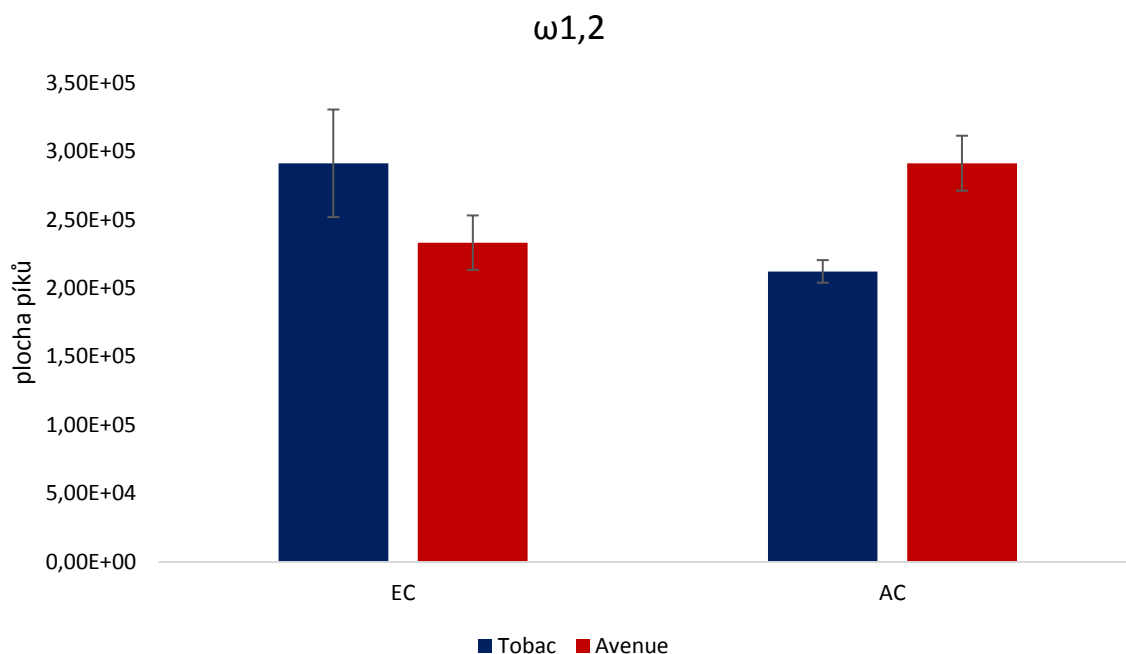
Obrázek 10: Vliv koncentrace CO_2 na obsah gliadinů u odrůdy Tobac

Srovnáním gliadinových frakcí obou odrůd pšenice (obrázek 11) bylo zjištěno, že celkový obsah gliadinové frakce odrůdy Tobac je vyšší v porovnání s odrůdou Avenue při pěstování za zvýšené koncentrace CO_2 . Naopak celkový obsah gliadinové frakce odrůdy Tobac byl nižší oproti odrůdě Avenue při normální koncentraci CO_2 .



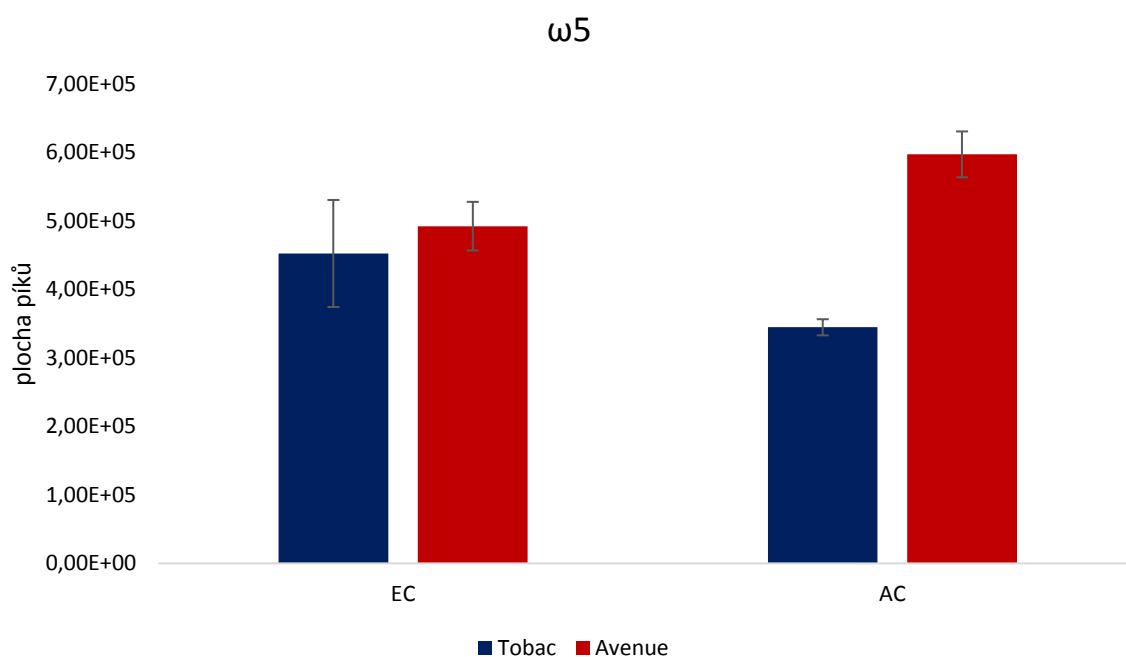
Obrázek 11: Srovnání celkového obsahu gliadinové frakce pro obě odrůdy

Při srovnání (obrázek 12) jednotlivých frakcí obou odrůd pěstovaných při zvýšené koncentraci CO₂ lze pozorovat, že obsah gliadinové frakce $\omega_{1,2}$ je vyšší u odrůdy Tobac pěstované při zvýšené koncentraci CO₂. Naopak při normální koncentraci CO₂ je obsah gliadinové frakce vyšší u odrůdy Avenue.



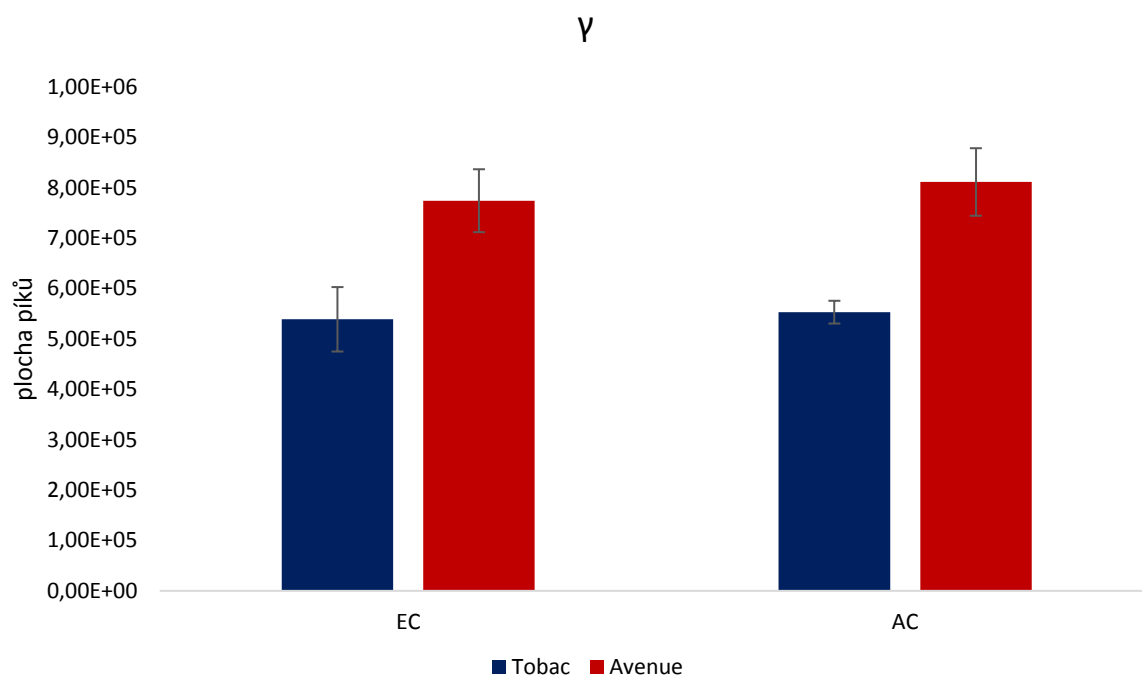
Obrázek 12: Srovnání obsahu gliadinové frakce $\omega_{1,2}$ u obou odrůd

Srovnáním obsahu gliadinové frakce ω_5 u obou odrůd (obrázek 13) je zřejmé, že při zvýšené koncentraci CO₂ je obsah gliadinové frakce ω_5 vyšší u odrůdy Avenue než u odrůdy Tobac. Tento rozdíl není výrazný (8 %). Při normální koncentraci CO₂ je obsah frakce ω_5 nižší u odrůdy Tobac.



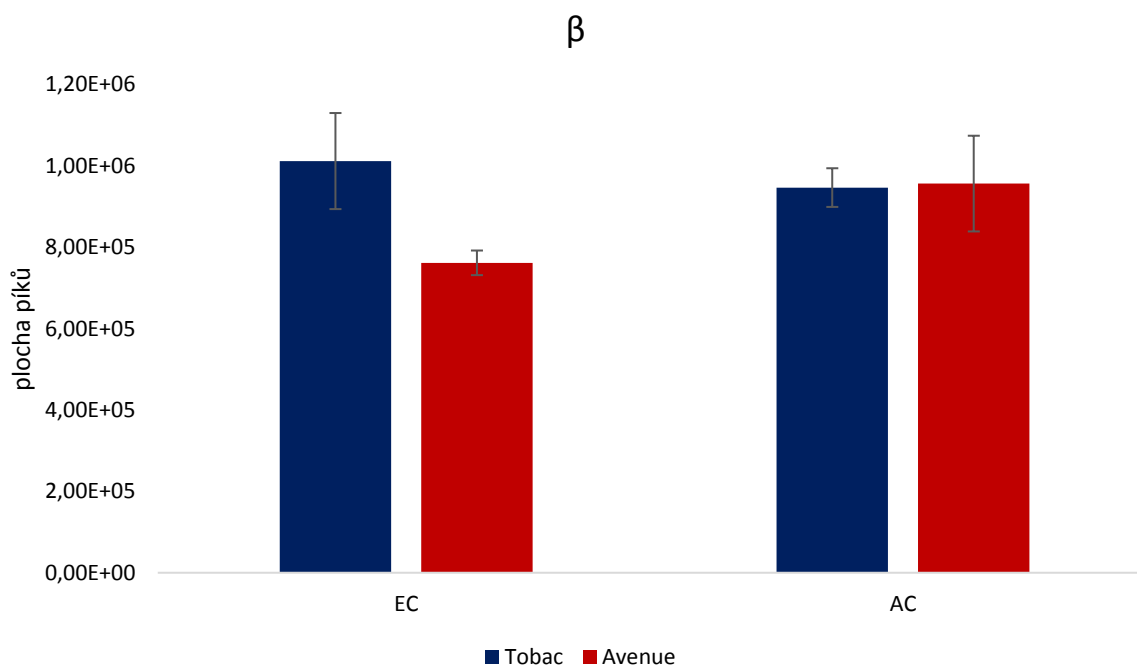
Obrázek 13: Srovnání obsahu gliadinové frakce ω_5 obou odrůd

Z grafu na obrázku 14 je patrné, že obsah gliadinové frakce γ je nižší u odrůdy Tobac, a to jak v případě zvýšené koncentrace CO_2 , tak i při normální koncentraci CO_2 .



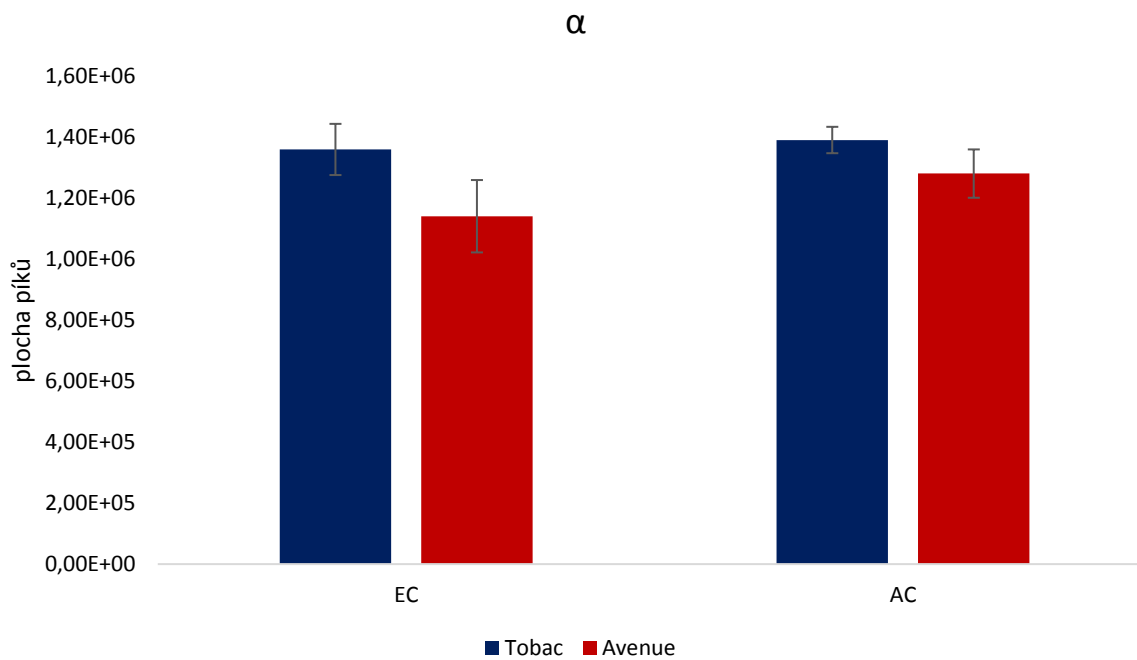
Obrázek 14: Srovnání obsahu gliadinové frakce γ obou odrůd

Ze srovnání obsahu gliadinové frakce β obou odrůd (obrázek 15) je zřejmé, že při zvýšené koncentraci CO_2 je obsah gliadinové frakce vyšší u odrůdy Tobac. Při normální koncentraci CO_2 je rozdíl obsahu gliadinové frakce β obou odrůd velmi malý (1 %).



Obrázek 15: Srovnání obsahu gliadinové frakce β obou odrůd

Obsah gliadinové frakce α (obrázek 16) je vyšší u odrůdy Tobac pěstované jak při zvýšené koncentraci CO_2 tak při normální koncentraci CO_2 . Rozdíl mezi oběma odrůdami je větší u zvýšené koncentraci CO_2 .



Obrázek 16: Srovnání gliadinové frakce α obou odrůd

Ze srovnání jednotlivých frakcí obou odrůd pěstovaných při normální koncentraci CO₂ je zřejmé, že obsah gliadinových frakcí ω 1,2; ω 5, β a γ je nižší u odrůdy Tobac. Obsah gliadinové frakce α je naopak nižší u odrůdy Avenue.

5. DISKUZE

V diplomové práci byl sledován vliv genotypu a zvýšené koncentrace CO₂ na obsah gliadinů a jejich frakcí u dvou druhů pšenice ozimé: Avenue a Tobac.

Významným faktorem je vliv genotypu. Mezi odrůdami byly zaznamenány rozdíly již u separace lepkových bílkovin na polyakrylamidových gelech. Nejvíce gliadinových frakcí bylo zaznamenáno u odrůdy Avenue, odrůda Tobac měla o jednu gliadinovou frakci γ méně. Zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí se mezi odrůdami lišilo. Nejvyšší podíl zastoupení měla frakce α -gliadinů, která činila u odrůdy Tobac asi 39 %, a u odrůdy Avenue 33 %. Podíl zastoupení frakce β -gliadinů byl stanoven na 28 % u odrůdy Tobac a 23 % u odrůdy Avenue. Vysoký podíl zastoupení byl zjištěn u gliadinové frakce γ odrůdy Avenue, který činil 22 %, u odrůdy Tobac byl pouze 15 %. Frakce ω 5-gliadinů byla zastoupena u odrůdy Tobac 11 % a u odrůdy Avenue 15 %. Podíl zastoupení frakce ω 1,2-gliadinů byl pro obě odrůdy totožný (7 %).

Složení lepkových bílkovin se s odrůdami liší, některé výsledky se liší od hodnot, které udává Wieser [32]. Z výsledků je zřejmé, že obsah frakce ω 1,2-gliadinů obou odrůd odpovídá 7% zastoupení, které uvádí Wieser. Naopak hodnoty ω 5-gliadinové frakce překročily u obou odrůd uváděný obsah 6 %. Současně Wieser uvádí, že zastoupení frakce α -gliadinu by měl být 30 % z celkových lepkových proteinů. Tuto hodnotu splnila odrůda Avenue a odrůda Tobac ji dokonce překročila (38 %). Frakce γ -gliadinů a β -gliadinů obou odrůd byly zastoupeny v menší míře, než uvádí Wieser ve své práci. Vliv genotypu na gliadinové složení potvrzují také Madurangi a kol. [56].

U jednotlivých odrůd byla zaznamenána různá odpověď na zvýšenou koncentraci CO₂. Nejvýznamnější změny byly pozorovány u odrůdy Avenue. Při zvýšené koncentraci CO₂ docházelo významnému poklesu obsahu gliadinových frakcí. Rozdíl ω 1,2-gliadinové frakce byl statisticky významný. Významný pokles byl pozorován také u frakce β -gliadinů. Nejmenší rozdíl byl zjištěn u frakce γ -gliadinů. Naopak u odrůdy Tobac bylo zjištěn růst celkového obsahu gliadinových frakcí při zvýšené koncentraci CO₂. Významný rozdíl obsahu gliadinů byl pozorován u frakce ω 1,2-gliadinů, který byl vyhodnocen jako statisticky významný, a u frakce ω 5-gliadinů. Srovnáním obsahu jednotlivých frakcí obou odrůd bylo zjištěno, že při zvýšené koncentraci CO₂ byl obsah gliadinových frakcí α , β , a ω 1,2 odrůdy Tobac vyšší než u odrůdy Avenue. Naopak u gliadinových frakcí ω 5 a γ byl zaznamenán pokles obsahu gliadinové frakce u odrůdy Tobac. Při normální koncentraci CO₂ byl zaznamenán trend nižšího obsahu gliadinových frakcí odrůdy Tobac oproti odrůdě Avenue.

Výjimku tvořila frakce α -gliadinů, při které byl obsah vyšší u odrůdy Tobac v porovnání s odrůdou Avenue.

Zjednodušeně lze tedy pro odrůdu Avenue tvrdit, že obsah gliadinů s rostoucí koncentrací CO₂ klesá v porovnání s normální koncentrací CO₂. Naopak u odrůdy Tobac s rostoucí koncentrací CO₂ dochází k nárůstu obsahu gliadinů.

Tady by mělo přijít vysvětlení, proč s rostoucí konc. CO₂ se snižuje obsah gliadinů (rostliny vyrobí více škrobu a tím klesne procentové zastoupení gliadinů v zrna).

Výsledky u odrůdy Avenue se shodují s literaturou [18, 57], která uvádí, že s rostoucí koncentrací CO₂ dochází k poklesu celkového obsahu gliadinů. Podle Högyho [18] dochází při zvýšené koncentraci CO₂ ke znatelnému poklesu obsahu gliadinů, a to zejména u gliadinových frakcí ω_5 , α , $\omega_{1,2}$ a γ . Celkový obsah gliadinových frakcí se podle Högyho liší o 17,1 %, což převyšuje výsledky experimentu o 3,5 %. Tento rozdíl je v porovnání s literaturou malý. Madurangi a kol. [56] udává rozdíl celkového obsahu gliadinů 12 %. Obdobné výsledky zjistil Högy v další práci [57], kdy byl obsah gliadinové frakce snížen vlivem rostoucí koncentrace CO₂. Gliadinové frakce α , γ a $\omega_{1,2}$ byly vlivem zvýšené koncentrace CO₂ sníženy a naopak frakce ω_5 vzrostla. Pokles obsahu gliadinové frakce při zvýšené koncentraci CO₂ potvrzují dále také Zhang [58] a Panozzo [19]. Výsledky odrůdy Tobac jsou oproti dané literatuře značně odlišné. Při porovnání s dostupnou literaturou docházelo k mírnému poklesu frakce γ -gliadinů a α -gliadinů, což odpovídá Högyho výsledkům v obou jeho pracích. Naopak zvýšení ostatních gliadinových frakcí bylo v rozporu s dostupnou literaturou. Tento fakt nebyl dosud v literatuře dostatečně popsán.

Ze zjištěných výsledků je patrné, že se ve zvýšené koncentraci CO₂ mění nejen celkový obsah gliadinů, ale také obsah jednotlivých frakcí, a tedy i kvalita gliadinů. Tím je ovlivněna kvalita těsta, zejména viskozita a roztažnost těsta, jak udává Högy [59], Fido [60] i Wieser [32].

6. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah proteinů gliadinové frakce dvou odrůd ozimé pšenice, a rozdíly těchto frakcí mezi odrůdami.

Pro experiment byly vybrány odrůdy Avenue a Tobac, které byly kultivovány ve speciálních kultivačních komorách na Experimentální stanici Centra výzkumu globální změny Akademie věd ČR v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem. Stanici tvoří 24 komor, ve kterých je možné regulovat srážky nebo zvýšenou koncentraci CO₂. Atmosféra se zvýšenou koncentrací CO₂ obsahovala oxid uhličitý v koncentraci 700 μmol·mol⁻¹. Plocha uvnitř komor byla rozdělena na poloviny, přičemž jedna polovina byla hnojena dávkou dusíku 200 kg·ha⁻¹. Druhá polovina hnojena nebyla.

Separace proteinů gliadinových frakcí byla provedena metodou A-PAGE podle Polišíenské et al. [55] a ČSN 46 1085-2. Obsah gliadinových proteinů byl stanoven počítačovou denzitometrií.

Významný vliv na gliadinové frakce měl genotyp. U rané odrůdy Avenue byl zjištěn vyšší obsah gliadinové frakce při normální koncentraci CO₂ oproti pozdní odrůdě Tobac. Naopak při zvýšené koncentraci CO₂ došlo ke znatelnému poklesu obsahu gliadinové frakce odrůdy Avenue. Obsah gliadinové frakce odrůdy Tobac při zvýšené koncentraci CO₂ vzrostl.

U obou odrůd byl pozorován vliv na zvýšenou koncentraci CO₂. U rané odrůdy Avenue došlo vlivem zvýšené koncentrace CO₂ výraznému k poklesu obsahu všech gliadinových frakcí. Významný pokles byl zaznamenán u obsahu gliadinové frakce ω_{1,2} a ω₅. U pozdní odrůdy Tobac naopak došlo k značnému zvýšení obsahu gliadinových frakcí, výjimku tvoří obsah gliadinové frakce γ a α, u kterých došlo k nepatrnému snížení obsahu gliadinové frakce. Významný rozdíl byl zjištěn u obsahu gliadinové frakce ω_{1,2}.

Při porovnání vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na obě odrůdy pšenice ozimé se jako perspektivnější jeví raná odrůda Avenue, než odrůda Tobac.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BURROUGHS, W. J. *Climate change: a multidisciplinary approach*. Cambridge University Press, 2007, xi, 378p. ISBN 05-218-7015-1.
- [2] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257s. ISBN 80-85866-62-5.
- [3] KARL, T. R.; TRENBERTH, K. E. Modern global climate change. *Science*, 2003, 302.5651: 1719-1723.
- [4] KADRNOŽKA, J. *Globální oteplování Země: příčiny, průběh, důsledky, řešení*. Brno: VUTIUM, 2008, 467 s. ISBN 978-80-214-3498-1.
- [5] KADRNOŽKA, J. *Energie a globální oteplování: Země v proměnách při opatřování energie*. Brno: VUTIUM, 2006, 189 s. ISBN 80-214-2919-4
- [6] BARROS, V. *Globální změna klimatu*. Praha: Mladá fronta, 2006. ISBN 80-204-1356-1.
- [7] *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet* [online]. California: NASA, 2019 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/>
- [8] XU, Z.; JIANG, Y.; ZHOU, G. Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in plant science*, 2015, 6: 701.
- [9] MAREK, M. V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Praha: Academia, 2011, 253 s. ISBN 978-80-904351-1-7
- [10] URBAN, O. Physiological impacts of elevated CO₂ concentration ranging from molecular to whole plant responses. *Photosynthetica*, 2003, 41.1: 9-20.
- [11] ŠPUNDA, V., et al. Diurnal dynamics of photosynthetic parameters of Norway spruce trees cultivated under ambient and elevated CO₂: the reasons of midday depression in CO₂ assimilation. *Plant Science*, 2005, 168.5: 1371-1381.
- [12] AINSWORTH, E. A.; ROGERS, Alistair. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, cell & environment*, 2007, 30.3: 258-270.
- [13] GONZÁLEZ-MELER, M. A.; SIEDOW, J. N. Direct inhibition of mitochondrial respiratory enzymes by elevated CO₂: does it matter at the tissue or whole-plant level?. *Tree Physiology*, 1999, 19.4-5: 253-259
- [14] DRAKE, B. G.; GONZÁLEZ-MELER, M. A.; LONG, S. P. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂?. *Annual review of plant biology*, 1997, 48.1: 609-639.

- [15] HÖGY, P., et al. Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. *Plant Biology*, 2009, 11: 60-69.
- [16] KIMBALL, B. A., et al. Elevated CO₂, drought and soil nitrogen effects on wheat grain quality. *New Phytologist*, 2001, 150.2: 295-303.
- [17] WIESER, H., et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentrations on the quantitative protein composition of wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56.15: 6531-6535.
- [18] HÖGY, P., et al. Does elevated atmospheric CO₂ allow for sufficient wheat grain quality in the future?. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2009, 82.2: 114-121.
- [19] PANOZZO, J. F., et al. Elevated carbon dioxide changes grain protein concentration and composition and compromises baking quality. A FACE study. *Journal of Cereal Science*, 2014, 60.3: 461-470
- [20] FAOSTAT [online]. ©2019 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.fao.org/home/en>
- [21] KHAN, K. *Wheat: chemistry and technology*. Amer Assn of Cereal Chemists, 2016. ISBN: 97-8012-8104-545
- [22] LUPTON, F. *Wheat breeding: its scientific basis*. Chapman & Hall, 2014. ISBN: 0-412-24470-5
- [23] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M.. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. Praha: VŠCHT, 2003, 202 s. ISBN 80-7080-530-7
- [24] PŘÍHODA, J., HUMPOLÍKOVÁ P., NOVOTNÁ, D., *Základy pekárenské technologie*. Praha: Pekař a cukrář, 2003, 363 s. ISBN 80-902922-1-6.
- [25] CAUVAIN, S. P. (ed.). *Breadmaking: improving quality*. Woodhead Publishing, 2012, 832 s. ISBN: 978-0-85709-060-7
- [26] ŠRAMKOVÁ, Z.; GREGOVÁ, E.; ŠTURDÍK, E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2009, 2.1: 115-138.
- [27] OSBORNE, T. B. *The vegetable proteins*. Longmans, *Green and Company*, 1916.
- [28] BATAIS, F., RICHARD, C.; JACQUENET, S.; DENERY-PAPINI, S.; MONERET-VAUTRIN, D. A. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2008, 40(3), 67-76. Dostupné také z: <http://www.eurannallergyimm.com/cont/journals-articles/122/volume-wheat-grain-allergies-update-allergens-321allasp1.pdf>

- [29] SINGH, J., M. BLUNDELL, G. TANNER aj. H. SKERRITT. Albumin and Globulin Proteins of Wheat Flour: Immunological and N-terminal Sequence Characterisation. *Journal of Cereal Science* [online]. 2001, 34(1), 85-103 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1006/jcrs.2001.0380. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521001903807>
- [30] SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities—an overview. *Journal of Cereal Science*, 2016, 67: 2-11.
- [31] Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten (Codex Alimentarius Standard 118-1979). Revised 2008. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%252FBSTAN%252B118-1979%252FCXS_118e_2015.pdf
- [32] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 2007, 24.2: 115-119.
- [33] SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in food science & technology*, 2007, 18.3: 132-138.
- [34] SHEWRY, P. R., et al. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2002, 357.1418: 133-142.
- [35] SHEWRY, P. R. a N. G. HALFORD. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2002, 53(370), 947-958 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1093/jexbot/53.370.947. ISSN 00220957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>
- [36] COSTA, M. S.; SCHOLZ, M. B.; FRANCO, C. M. L. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Food Science and Technology*, 2013, 33: 163-170
- [37] ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA [online]. ©1996 [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/>
- [38] SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 1997, 25.3: 207-227.

- [39] LUTZ, E.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Identification of disulfide bonds in wheat gluten proteins by means of mass spectrometry/electron transfer dissociation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60.14: 3708-3716.
- [40] TILLEY, K. A., et al. Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49.5: 2627-2632.
- [41] PIBER, M.; KOEHLER, P.. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53.13: 5276-5284.
- [42] ŽILIC, S. Wheat gluten: Composition and health effects. *Gluten*, 2013, 71-86.
- [43] LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Structure function relationships of wheat proteins. *Food Proteins and their Applications*. Marcel Dekker, NewYork, USA, 1997, 293-324.
- [44] MAGDELDIN, S., ed. Gel Electrophoresis - Principles and Basics. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.
- [45] NIELSEN, S. S., et al. (ed.). Food analysis. New York: Springer, 2010, 602 s. ISBN: 978-1-4419-1478-1
- [46] KÁŠ, J.; KODÍČEK M.; VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- [47] HAMES, B. D. (ed.). Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. OUP Oxford, 1998, 376 s, ISBN: 978-019936-3640-2
- [48] BEAN, S. R.; LOOKHART, G. L. Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*, 2000, 881.1-2: 23-36.
- [49] HULÈN, P.; DOSTÈLEK, P.; HOCHEL, I. METODY STANOVENÍ LEPKOVÝCH BÍLKOVIN V POTRAVINÁCH. *Chem. Listy*, 2008, 102: 327-337.
- [50] OTLES, S. Gel Electrophoresis in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.
- [51] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Molecular Info® [online]. ©2001 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html>
- [52] MICHALCOVÁ, L.; GLATZ, Z. Nové směry ve studiu biomolekulárních interakcí pomocí kapilární elektroforézy. *Chemické listy*, 2016, 110.4: 249-257.
- [53] OTLES, S. Capillary Electrophoresis in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.

- [54] OTLES S. Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.
- [55] POLIŠENSKÁ, I., L. NEDOMOVÁ a S. CUPÁK. Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforézy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 2010, 12 s. ISBN 978-80-86888-08-8.
- [56] ARACHCHIGE, P. Madurangi S., et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome response to elevated [CO₂] varies between genotypes. *Journal of cereal science*, 2017, 75: 151-157.
- [57] HÖGY, P., et al. Grain quality characteristics of spring wheat (*Triticum aestivum*) as affected by free-air CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 88: 11-18.
- [58] ZHANG, X., et al. Independent and combined effects of elevated CO₂ and post-anthesis heat stress on protein quantity and quality in spring wheat grains. *Food chemistry*, 2019, 277: 524-530.
- [59] HÖGY, P.; FANGMEIER, A. Effects of elevated atmospheric CO₂ on grain quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48.3: 580-591.
- [60] FIDO, R. J., et al. Effects of α -, β -, γ - and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 1997, 26.3: 271-277.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AC	normální koncentrace CO ₂
ANOVA	analýza variace (rozptylu)
A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
ATP	adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
CE	kapilární elektroforéza
ČSN	česká technická norma
DTT	dithiothreitol
EC	zvýšená koncentrace CO ₂
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
FACE	Free Air CO ₂ Enrichment
HMW	vysokomolekulární podjednotky gluteninů
kol.	kolektiv
LMW	nízkomolekulární podjednotky gluteninů
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TPT	trifosfát-fosfoglycerát-translokátor
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie