



OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE Ing. JANA VYDRY

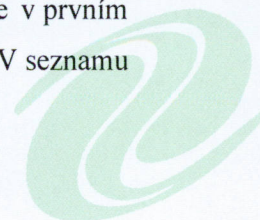
vypracované na téma

„VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK V ROSTLINĚ

***Echinacea purpurea* (L.) Moench“**

Disertační práce Ing. Jana Vydry je včetně literatury, obrázků, tabulek a seznamu zkratk prezentována na 112 stranách. Výše uvedené téma práce je velmi aktuální, protože shrnuje současné poznatky o působení elicitorů na růst a vývoj rostlin, dále na obsah sekundárních metabolitů s důrazem na léčivé rostliny, což je zvláště důležité při zvětšující se poptávce po přípravcích z léčivých rostlin a při zvyšující se poptávce ze strany farmaceutického průmyslu po látkách izolovaných z přírodního rostlinného materiálu, např. taxol. Kromě úvodu, závěru, literatury a seznamu zkratk je disertační práce rozdělena do čtyř hlavních kapitol. Cíle jsou uvedeny na str. 36. Literární část, která je velmi dobře zpracována, se dotýká všech aspektů potřebných pro pochopení problematiky, a to jak historie pěstování třapatky, tak příslušné agrotechniky, dále chemických látek izolovaných a popsanych jak v nadzemních částech rostliny, tak v kořenech různých druhů třapek. Rovněž kapitola Výsledky a diskuze je velmi dobře graficky a přehledně zpracována a v jejím závěru autor vyvozuje, že patrně nejúčinnějšími látkami v třapatce by mohly být některé typy polysacharidů, což je ve shodě s nejnovější patentovou literaturou v této oblasti. Snad možná v úvodní části kapitoly Výsledky a diskuse, kde se srovnávají literární údaje o obsahu cichorové, kaftarové, chlorogenové a kávové kyseliny, by byla vhodnější přehledná tabulka. Otázkou je, zda se vůbec dají tyto hodnoty exaktně srovnat, protože se jedná většinou o extrakce s rozdílnými parametry (čas, rozpouštědla, teplota atd.)?

Celá práce je velmi pěkně a přehledně sepsána s minimem gramatických prohřešků a chyb, snad bych upozornil pouze na jednotné psaní literárních odkazů (anglický a německý text a názvy časopisů), označení geometrických izomerů v posledním řádku na str. 6 (E a trans je totéž), k tabulkám č.1 na str. 32 a č. 2 na str. 33 by měly být uvedeny odkazy, Gramova reakce (str. 34). Dále bych chtěl upozornit na drobné nedostatky, a měl bych k uchazeči několik otázek. Jak se používá chemicky čistých prvků jako elicitorů (formulace v prvním odstavci na str. 26)? V celém textu není úplně jasný název jednoho elicitoru. V seznamu



zkratek je to kyselina methylsalicylová (chybí th), a tento název by spíše znamenal kyselinu se substitucí aromatického jádra methylovou skupinou, dále v seznamu chemikálií je to methylsalicylát, což je správný název podle IUPAC. Patrně se bude jednat spíše o methylsalicylát, což je methylester kyseliny salicylové. Podle údajů uvedených v experimentální části byla jak tato látka, tak dále uvedený askorbát titanu (správněji titanium askorbát podle IUPAC) připraveny v laboratoři. V tomto případě by experimentální část měla obsahovat krátký popis přípravy a měla by být uvedena data dokumentující autenticitu a čistotu příslušné látky, jak je ostatně uvedeno u katalogových chemikálií. Anebo se jednalo o aplikační postřiky, ale i tak se vycházelo z čistých látek? Dále v seznamu chemikálií chybí kyselina fosforečná a trifluoroctová kyselina je navíc. Obě kyseliny se používají pro okyselování mobilní fáze v kapalinové chromatografii. U tohoto typu disertační práce, která je celá zaměřena na extrakci účinných látek a jejich analýzu, postrádám v práci jeden až dva typické chromatogramy s uvedením retenčních dat a spekter příslušných látek. Nejpoužívanější způsob extrakce je extrakce podle německého lékopisu (str. 35 druhý odstavec), ale v experimentální části byl zvolen způsob, kdy výsledná koncentrace ethanolu byla nižší, patrně kvůli lepší extrakci polárnějších látek. Můžete to prosím krátce vysvětlit? U použitého zahradnického substrátu (Tab. č. 5 na str. 48) je patrně minerální složka velice nepatrná. Na str. 86 je velmi zajímavá diskuse ohledně rozdílu půdních podmínek na obou stanovištích (Protivín a Dolní Pěna). Možná by bývalo vhodné také stanovit další prvky, např. některé těžké kovy, které by mohly pravděpodobně mít rovněž elicitaci účinek, když vezmeme v úvahu dolní koncentrační hranici 10 ppm pro titanium askorbát. Tato koncentrace mě přivádí k dotazu, jak byly stanoveny v práci použité nízké koncentrace elicitorů, na základě empirických zkušeností, anebo byla měřena alespoň část křivky závislosti odezvy na koncentraci, což je časově velmi náročné? Mělo by podle Vašeho názoru smysl ověřit vliv ještě nižší koncentrace elicitorů?

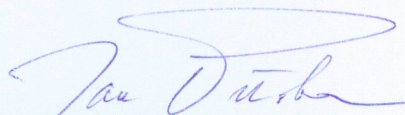
Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce pana Ing. Jana Vydry vypracovaná na téma „Vliv elicitorů na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* (L.) Moench“ dokládá odbornou úroveň jmenovaného s tím, že prokázal tvůrčí schopnosti a ovládá vědecké metody. Ing. Jan Vydra je spoluautorem jednoho článku v impaktovaném časopisu (IF byl přidělen podle WOSu pouze v roce 2004), 1 publikace ve Sborníku ZF, celé řady příspěvků na mezinárodních konferencích, přednášek v zahraničí a závěrečných zpráv. Práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru a může být podkladem pro obhajobu disertační práce ve smyslu §72 Sbírký zákonů č. 111/1998.

Závěrem konstatuji, že předloženou disertační práci jsem prostudoval a

doporučuji

ji k obhajobě.

České Budějovice 19. února 2008



Doc. Ing. Jan Triska, CSc.
ÚSBE AV ČR, v.v.i.
Laboratoř analytické chemie ŽP
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
tel.: 387 775 619
fax: 385 310 347
mail: triska@usbe.cas.cz

Oponentský posudek

doktorské disertační práce

Ing. Jana Vydry

"Vliv elicitorů na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* (L.) Moench "

Školitel: prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
Zemědělská fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Oponent: Prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.
Katedra agrochemie a výživy rostlin
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Česká zemědělská univerzita v Praze

Předložená disertační práce Ing. Jana Vydry se zabývá mimořádně aktuálním tématem a to regulací účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* (L.) Moench, která je známá jejich širokým spektrem a patří do skupiny nejprodávanějších léčivých rostlin ve vyspělých zemích.

Cílem doktorské práce bylo vyhodnotit změny obsahů vybraných účinných látek v rostlinách *Echinacea purpurea* (L.) Moench v modelových i reálných pěstebních podmínkách s využitím několika typů elicitorů.

Doktorand zpracoval svoji práci v obvyklé struktuře, jasně formuloval cíle práce, v literárním přehledu se pečlivě věnoval studované rostlině a to z pohledu historického, botanického, obsahového, farmaceutického a pěstitelského. V této části práce se snažil shrnout dřívější i současné poznatky z několika oborů, a v některých podkapitolách se velmi široký záběr kapitoly odrazil na přesnosti předkládaného textu. Na str. 6 není přesně formulováno, které monosacharidy jsou základními stavebními jednotkami polysacharidů skupiny 1 a 2. Termín polyacetylenové sloučeniny již neodpovídá současnému systematickému chemickému názvosloví (str. 7). Jaký má vztah echinacein k echinacinu B (str. 9). Na str. 12 je třeba správně uvádět optimální „dávka“ místo „složení“ hnojiva. Jak souvisí bylinné léky (Radix... a Herba thujae) s Echinaceou. V této části práce bych přivítal prezentaci množství obsahových látek i živin v rostlinách stanovených dalšími vědeckými kolektivy. Další část rešerže se detailně zabývá problematikou elicitace a elicitory autor vhodně člení do dvou základních skupin, v této části bych ocenil větší důraz na využití sloučenin titanu, které byly již dříve testovány u mnoha rostlin s různým cílem jejich aplikace. Do této části bylo zařazeno i „čínské biologické hnojivo“, které sice není klasickým elicitem, ale autor na jeho příkladu uvádí i další možnosti regulace obsahu účinných látek. Tuto podkapitolu bych nazval obecněji a mezi dalšími látkami s podobnou aplikační strategií bych uvedl i toto hnojivo. V tabulkách této části bych uvítal zpřesňující popis experimentů, protože se jedná o významný nárůst výnosů dokumentující chování testovaných hnojiv, vhodné by bylo uvádět výnosy v obvyklých jednotkách.

V metodické části se doktorand pečlivě věnoval popisu všech realizovaných experimentů, jejich zpracování, analýzám a vyhodnocení. Je možno konstatovat, že popis stanovišť, jejich půdní charakteristiky, vlastní schéma pokusu i celá agrotechnika jsou zpracovány důkladně. Zamýšlel bych se nad prezentací této části, myslím si, že by bylo vhodnější ji strukturovat na část pěstitelskou, analytickou a vyhodnocovací, protože experimentů bylo založeno několik, ale zpracování a koncovka byly téměř identické. Mám

zde pouze několik poznámek, v tabulkách obsahu živin označených Mehlich III není vhodné uvádět N_{tot} . Z čeho byla odvozena dávka roztoku elicitoru v množství 1 l.m^{-2} . Mírně zavádějící je uvádění místa realizace pokusu bez dalšího vysvětlení do názvů podkapitol. Proč nebyl analyzován pěstební substrát běžnými postupy pro analýzy půd, odlišná prezentace jeho složení je mírně zavádějící. Je správně česky uveden termín Cambisol pro půdu pokusného pozemku?

Těžiště práce je ve výsledkové části, která je soustředěna na bezmála 50 stranách, je současně doplněna diskuzí a shrnuta do celkových závěrů. Několik realizovaných víceletých experimentů nebylo jednoduché přehledně zpracovat a vyvodit z nich obecné závěry. Autor zvolil metodu postupné prezentace výsledků z jednotlivých experimentů především grafickým způsobem. Jednotlivé experimenty jsou hodnoceny podle sledovaných účinných látek, podle použitých elicitorů, podle části sledované rostliny a podle jednotlivých pokusných let. Zde mohu odpovědně konstatovat, že již množství práce vykonané při realizaci, sklizních a zpracování pěstovaného materiálu bylo skutečně značné a časově náročné. Autorovi se ve většině pokusů podařilo získat tříleté výsledky, které umožňují zobecnění studované problematiky. V prvním experimentu (Protivín) se pravděpodobně autorovi zatoulaly výnosové výsledky a nebylo možno posoudit vliv elicitorů na tyto důležité parametry. V druhém experimentu (Dolní Pěna) se mi zdá nepřehledné uvádění všech opatření do jednoho grafu, jejich rozdělení do jednotlivých skupin dle použitého elicitoru by bylo přehlednější. V této části postrádám statistické vyhodnocení jednotlivých opatření. Závěrečná část prezentace tohoto experimentu je značně zestručněná a u grafů prezentovaných v této části postrádám konkrétní názvy a přesně definovaný hodnocený parametr. Tuto část by bylo vhodné rozdělit na podkapitoly stejně jako v předcházejícím experimentu. Na doktoranda mám otázku jak by vysvětlil velké rozdíly v sesychání kořenů v jednotlivých variantách (str. 82). Velmi dobře je vyhodnoceno chování aplikace acetylsalicylové kyseliny na obou stanovištích. Tímto způsobem mohlo být hodnoceno více sledovaných parametrů.

Výsledky práce jsou shrnuty v závěrech, které jsou poměrně obsáhlé a na konci jsou zestručněny a ještě jednou zopakovány. Právě závěrečné shrnutí jen mírně rozpracované by bylo jednoznačným vyjádřením výsledků celé práce.

Z výsledků práce se ukazuje, že jednotlivá opatření vedla nejen ke změně obsahů sledovaných účinných látek, ale i výnosových parametrů prezentovaných v některých pokusech. Bylo by velice zajímavé se pokusit vyhodnotit i extrahovatelné množství sledovaných látek závislé na obsahu a množství látky vyjádřené na jednotku sklizené plochy.

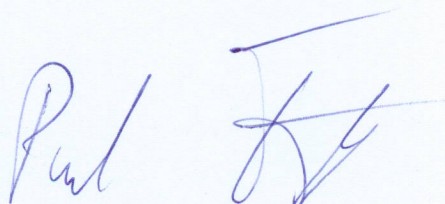
Dále bych se chtěl doktoranda zeptat zda sledoval i obsahy makro popřípadě i mikroživin ze kterých by bylo možné odvodit nároky rostlin na výživu.

I přes uvedené připomínky mohu s potěšením konstatovat, že předložená disertační práce splnila náležitosti na ní kladené. Doporučuji předloženou práci přijmout k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu

udělit doktorandovi titul

PhD

V Praze 10. února 2008

Two handwritten signatures in blue ink. The first signature is a stylized 'P' followed by 'ud', likely representing the name of the doctoral candidate. The second signature is a more complex, stylized signature, likely representing the name of the supervisor or the official granting the title.

Oponentský posudek disertační práce

Doktorand:	Ing. Jan Vydra
Název práce:	<u>Vliv elicitorů na obsah účinných látek v rostlině <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench</u>
Školitel:	Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
Práce předložena na:	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta, katedra agroekologie
Studijní obor:	Obecná produkce rostlinná
Studijní program:	Fytotechnika

Disertační práce se zabývá problémem zajímavým z hlediska vědního, který je zároveň hospodářsky významný s ohledem na možné aplikace ve farmaceutickém průmyslu. Téma poskytuje disertantovi široký prostor pro prokázání nabytých teoretických znalostí, získaných pokusnických a laboratorních dovedností a odpovídající prezentaci na očekávané vědecké úrovni. Výběr tématu proto považuji za zdařilý počín.

Práce obsahuje 112 stran textu pevně spojených v celoplátěné vazbě. Grafická znázornění naměřených hodnot s vyznačením statistického vyhodnocení, a také tabulky s číselnými podklady, jsou vřazeny na příslušných místech do textu. Práce se přidrželá struktury členění obvyklé u vědeckých publikací. Její celkový rozsah vzhledem k obsahu i formě prezentace považuji za přiměřený, přičemž vlastní práce představuje $\frac{2}{3}$ celkového rozsahu. Vyjadřování lze označit adjektivem výstižné a srozumitelné, po gramatické stránce bez větších připomínek. Formální stránka prezentace je přijatelná.

Zpracování disertační práce je zaměřeno výhradně na okruh otázek vymezený názvem. Po stručném úvodu je předložen literární přehled k problematice botaniky a obsahových látek v rostlině *Echinacea purpurea*, pěstování, sklizně a zpracování rostlinné hmoty, nástinu farmaceutického využití. Konečně je připojen i úsek, věnovaný problematice elicitorů. Tuto kapitolu hodnotím jako jednu z nejzdařilejších v celé práci.

Cíle práce jsou formulovány v souladu s názvem disertační práce, a sice ve dvou bodech (str. 36). Pracovní hypotéza není uvedena. Autor předpokládá, že disertační práce přinese tyto nové vědecké výsledky: (1) ověření nové analytické metody stanovení ...látek, (2) prokázání pozitivního vlivu elicitorů na obsah ... látek.

Kapitola Materiál a Metodika je zpracována přehledně, vcelku výstižně a vyhovuje obecné premise, aby podle ní bylo lze pokus včetně měření případně zopakovat.

Sdružená kapitola Výsledky a Diskuse začíná opět literárním přehledem. To přece patří jinam! Podkapitoly jsou už věnovány výsledkům, bohužel prvního číselného primárního údaje se lze dobrat až za polovinou kapitoly (!), jinak se pojednává výhradně o procentických změnách a o hladinách statistické významnosti. Kapitola je zpracována takovým způsobem, aby bylo zřejmé, že naplnění stanovených cílů bylo dosaženo. Lze potvrdit, že se to disertantovi rámcově podařilo. Musím však konstatovat, že charakter kapitoly je převážně popisný, bez cílenějšího hledání souvislostí, větší snahy o vysvětlení jevů a trendů změn naměřených hodnot pod vlivem širšího spektra abiotických elicitorů, které v polních

podmínkách působilo na rostliny, než jsou ony 4 použité chemikálie. Nenašel jsem tu žádnou zmínku o ověřování nové analytické metody.. (viz str. 36).

Kapitola Závěr mohla být stručnější a přehlednější, ale budiž. Konečně její lapidární shrnutí „Závěrem...“ v bodech dostatečně výstižuje, k čemu disertant dospěl, čeho dosáhl. Jak už jsem v předchozím odstavci zmínil, cílů práce bylo rámcově dosaženo, nemohu však souhlasit s autorem, že „...*předpokládané vědecké výsledky jsou také splněny*“. V této kapitole se sice objevuje nesmělá zmínka o třech větvích, kde bez jediného číselného údaje a statistického srovnání se na samý konec doslovně praví „...*nedochází k žádné změně ve vyplavování. ani ke zhoršení separační schopnosti*“. I když je disertant citován v několika publikacích jako spoluautor nové metody, takto si „ověření“, pokud mělo být konáno speciálně v rámci disertační práce, nepředstavuji!

Ke kladům disertační práce patří konstatování (podle literárních údajů), (1) má se za to, že žádná část rostliny není jedovatá, hlavně však vlastní zjištění, že (2) distribuce vybraných 4 fenolických sloučenin v rostlině vykazuje zřetelné odlišnosti mezi orgány, resp. částmi rostliny a (3) na obsah těchto látek mají významný vliv jak faktory spojené s rostlinou (např. vegetační fáze), tak i podmínky prostředí (zde souborně vyjádřené termínem „*lokalita*“, „*ročník*“ atd.) včetně účinku elicitorů (na příkladu 4 vybraných látek ze 2 chemicky odlišných skupin).

Připomínky: 1. Absenci výsledků o ověřování nové metody je třeba napravit buď doplněním zpracované podkapitoly (a všítím do všech paré disertační práce) nebo vypuštěním příslušné formulace na str. 36 (ve všech paré). Provést před termínem obhajoby.

2. Technické: - Co autor rozumí pod jeho termínem „*suchá hmota*“ (tab. 7) a „*...hmoty usušené..*“ (str. 81). Jakou měly tyto produkty sušinu?

- „*drobná semínka*“ (str. 11) je pojem z lidové mluvy, při obhajobě chci slyšet odborný termín

3. Formální: - české názvy rostlin se píší malým počátečním písmenem (viz str. 3), od str. 16 jsou už napsány správně

- v celé práci se české názvy pro *Echinacea* střídají, proč se nedrží jeden, např. ten, který se uvádí v názvu práce? Jednou se mluví o třapatce, podruhé o *Echinacea*, jinde o počestěném echinacea. Jazykově je nepřípustné k latinskému základu přidávat české koncovky (str. 17).

- co disertant míní tvrzením „*množství kyseliny chlorogenové se příliš neshodovalo s publikovanými hodnotami*“, aniž by tu uvedl jeden číselný údaj či odvolávku na tabulku nebo graf. Při obhajobě požaduji vysvětlení.

4. Otevřené otázky a jiné náměty:

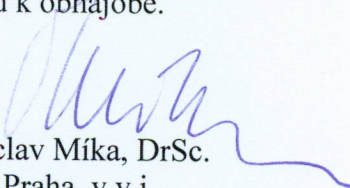
- v Literárním přehledu je široce pojednáno o agrotechnice polního pěstování rostliny *Echinacea purpurea* pro farmaceutické využití, dokonce včetně schematu stroje na sklizeň kořenů. Nikde však ani zmínka o možnosti pěstování ve vodních kulturách, v kontextu produkce snadno čistitelných kořenů. Přitom je obecně známé, že produkce kořenů v nich ve srovnání s pěstováním v polních kulturách bývá více než dvojnásobná, kořeny dorůstají do „*sklízňové fáze*“ již za 6 – 8 měsíců, zatímco na poli až za cca 36 měsíců. K tomu při sklizni na poli přistupují mechanické ztráty na jemných kořenech a při zdlouhavém vypírání a čištění ztráty na obsahových látkách (podle literárních údajů) - vztažené k množství získaných biologicky aktivních látek – v celkovém objemu větším než 20 %. Přitom disertant na str. 7 poukazuje na vysokou hodnotu kořenů, kde uvádí, že pouze 4 ze 13 látek detekovaných v kořenech se vyskytují také v nati.

Na závěr posudku je třeba připomenout, že téma disertační práce směřuje dál, než je pouhé pokusničení, disertantovi skýtá vsutku široké možnosti pro rozvinutí nabytých teoretických poznatků v podobě nových přístupů, hlubokého rozpracování problematiky elicitorů na příkladu perspektivní léčivé rostliny v pohledu komerčního pěstování pro rychle se rozvíjející farmaceutický průmysl. Škoda, že se tu disertant nepokusil o srovnání účinnosti 2 skupin testovaných elicitorů na obsah vybraných fenolických kyselin. Nebo si ve své práci povšimnout též možností standardizace a stabilizace obsahu vybraných látek ve farmaceutické surovině. Zcela stranou už ponechávám aspekty biochemické a fyziologické.

K dispozici byl předložen i autoreferát. Rovněž i ten má všechny náležitosti, předepsané pro tento typ prací. Stručnou formou jsou v něm zachyceny všechny podstatné nálezy a vývody z disertační práce. V závěrečné pasáži autoreferátu se dokladuje pozoruhodně bohatá publikační aktivita disertanta: V soupisu publikovaných vědeckých prací (2), závěrečných zpráv (3), příspěvků na mezinárodních konferencích (7) a přednášek přednesených v zahraničí tématicky blízkých názvu disertační práce (7) vystupuje jeho jméno - s jednou výjimkou - vždy jako spoluautor. Tuto aktivitu hodnotím velice kladně.

I přes uvedené připomínky prohlašuji, že disertační práce vyhovuje požadavkům kladeným na tento typ prací daným zákonnou normou. Proto komisi pro obhajobu při JČU ZF v Českých Budějovicích **doporučuji** práci přijmout jako podklad k obhajobě.

V Táboře, dne 27. ledna 2008


Ing. Václav Míka, DrSc.
VÚRV Praha, v.v.i.